

Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts of Dried Lettuce (*Lactuca sativa* L.)

Eun-Joo Lee¹, Yu-Mi Seo¹, Yong-Hyun Kim¹, Chungwook Chung¹, Hwa-Jung Sung², Ho-Yong Sohn², Jong-Yi Park³ and Jong-Sik Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

³Gyeongbuk Institute for Bio Industry, Andong 36728, Korea

Received December 19, 2018 / Revised January 25, 2019 / Accepted January 28, 2019

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most popular green leafy vegetables, and it contains various beneficial components including polyphenolic compounds and has been known to possess various biological functions such as anti-microbial, anti-oxidative, and anti-inflammatory activities. In the present study, we prepared ethanol extract of dried lettuce (DLE) and investigated its anti-inflammatory activity. To evaluate the anti-inflammatory activity of DLE, nitric oxide (NO) production was measured in LPS-activated mouse macrophage RAW 264.7 cells. DLE significantly suppressed NO production in these cells without affecting cell viabilities while resveratrol was used as a positive control. DLE dramatically decreased the expression of pro-inflammatory genes such as iNOS and COX-2 at the mRNA and protein levels and reduced the expression of several cytokines including *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-1F6*, *TNF- α* , *CSF2* and *CXCL10*. In addition, DLE suppressed phosphorylation of MAPKs and the nuclear translocation of NF- κ B p65 indicating DLE shows its anti-inflammatory activity via regulating MAPKs pathway and NF- κ B pathways. And also, DLE reduced the production of reactive oxygen species in a dose-dependent manner. DLE increased HO-1 protein expression, and also increased the nuclear translocation of Nrf2. Overall, our results suggest that lettuce down-regulate various pro-inflammatory genes and have its anti-inflammatory activity via regulating MAPKs, NF- κ B, and Nrf2/HO-1 pathways.

Key words : Anti-inflammation, *Lactuca sativa*, MAPK, NF- κ B, Nrf2/HO-1

서론

염증은 병원성 미생물이나 조직 손상과 같은 자극에 대응하는 생체의 중요한 방어시스템 중의 하나이다[2, 18]. 그러나, 급성 혹은 만성 염증은 암, 관절염, 염증성 bowel 질환 같은 다양한 염증성 질환을 유발한다[3, 7, 12]. 대식세포는 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 그램 음성 세균의 구조물에 의해 자극이 이루어지면, interleukin-1 β 나 tumor necrosis factor- α 와 같은 염증유도 사이토카인과 nitric oxide (NO)등을 분비함으로써 염증반응에 있어서 중요한 역할을 한다[11, 13]. NO 생산은 많은 염증 관련 질환의 병원성과 관련이 있으며, NO는 주로 유도성 nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생산되며, iNOS의 발현은 nuclear factor kappa B (NF- κ B)와 같은 전사

조절인자에 의해 조절될 수 있다[10, 16]. 활성화된 NF- κ B는 핵속으로 이동하여 iNOS, COX-2, TNF- α 와 같은 염증유도 유전자의 발현을 조절한다[8, 14]. 또한, 대식세포의 염증반응에 있어서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 경로도 활성화 되어 염증반응에 관여한다[4, 5].

Hemeoxygenase-1 (HO-1) 유전자는 염증 자극에 대응하여 전사조절인자인 Nrf2에 의해 발현이 조절된다[21]. 즉, 활성화된 Nrf2는 핵속으로 이동하여 HO-1과 같은 ARE (antioxidant response element)-중재 유전자들의 발현을 조절한다[9, 15]. 따라서, 면역반응에 관련된 신호 물질을 targeting 하는 것은 항염증 활성을 가지고 있는 물질들을 선별하는데 있어서 중요하다고 생각된다.

상추(*Lactuca sativa*)는 폴리페놀 화합물을 포함하여 다양한 유용 성분을 가지고 있으며, 항균, 항산화, 항염증 등의 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다[1, 17]. 그러나, 상추의 항염증 활성의 작용 기전에 대한 연구는 여전히 미미하다. 따라서, 본 연구에서는 상추 에탄올 추출물(DLE)을 제조하고 이들의 항염증 활성과 작용기전에 대하여 *in vitro* 모델에서 연구하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

상추 에탄올 추출물의 제조

본 실험의 건조 상추는 2017년 안동지역에서 하우스 재배된 적상추를 구입 후 이물질 제거 후 80℃의 열풍건조기를 이용하여 건조하였다. 건조 상추의 ethanol 추출물 조제를 위해 건조 상추를 50-100 mesh로 분쇄하여 추출에 사용하였으며, 95% ethanol (Deajung Chemical & Metals Co. Ltd., Korea)을 시료 무게의 10배 되도록 가하여 상온에서 24시간 추출하였으며, 상기 추출을 3회 반복하였다. 이후 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축 (Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan) 하여 분말로 조제하였다. 조제된 시료는 DMSO에 적당한 농도로 녹여 항염증 활성 평가에 사용하였다.

마우스 대식세포 RAW 264.7 배양

마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Fredrick, MD, USA) 에서 구입하였다. 세포주 배양에는 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (Wel Gene, Korea)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)을 사용하였다. 세포배양은 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 실시하였다.

Nitric oxide (NO) 생성 분석

상추 에탄올 추출물이 LPS로 자극된 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주에서 NO 생산에 미치는 영향을 측정 하였

다. 즉, RAW 264.7 세포주를 96 well plate의 각 well에 2x10⁵개를 접종한 후 19시간 동안 배양하였다. 그 후 LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 0.2 µg/ml의 농도로 1시간 동안 처리하고, 상추 추출물을 농도 별로 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 그 후 상등액 100 µl와 Griess reagent (Sigma) 100 µl를 혼합하여 15분 동안 상온에서 반응시키고 Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성 분석은 독립적인 4개의 well에서 수행되었으며, 통계 분석은 Sigma plot을 이용하여 mean ± SD 값으로 나타내었다.

세포생존율 분석

상추 추출물에 의한 세포독성을 측정하기 위해 Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. RAW 264.7 세포주를 96 well plate의 각 well에 2x10⁵개를 접종하여 19시간 동안 배양한 후 LPS (Sigma)를 0.2 µg/ml의 농도로 1시간 동안 처리하고, 상추 추출물을 농도 별로 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 그 후 RAW 264.7 세포주에 MTS 용액을 20 µl 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시키고 Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 분석은 독립적인 4개의 well에서 수행되었다.

Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

세포주로부터 total RNA 추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used for reverse-transcription PCR

Gene Name	GeneBank Acc No.	Sequences
<i>iNOS</i>	NM_010927.3	F : 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' R : 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'
<i>COX-2</i>	NM_011198.3	F : 5'-CCGTGGTGAATGTATGAGCA-3' R : 5'-CCTCGCTTCTGATCTGTCTT-3'
<i>IL-1α</i>	NM_010554.4	F : 5'-CATGAATGATTCCTCAACCAA-3' R : 5'-CCCACGAGTAGGCATACATGT-3'
<i>IL-1β</i>	NM_008361.4	F : 5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3' R : 5'-AGGCCACAGGTATTTTGTGCG-3'
<i>IL-1F6</i>	NM_019450.3	F : 5'-CACTGCAGTCCCAAGGAAAGAG-3' R : 5'-GGCCTTTGCACTCCCATGTA-3'
<i>TNF-α</i>	NM_013693.3	F : 5'-CGTCAGCCGATTGCTATCT-3' R : 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
<i>CSF-2</i>	NM_009969.4	F : 5'-AGGAGGATGTGGCTGCAGAA-3' R : 5'-TTCTTGATGGCCTCTACATGCT-3'
<i>CXCL10</i>	NM_021274.2	F : 5'-CCCAAGTGCTGCCGTCAT-3' R : 5'-ATTCTCACTGGCCCGTCATC-3'
<i>GAPDH</i>	NM_008084.4	F : 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-5' R : 5'-GGATGCAGGGATGATGTT-5'

하였다. 각 세포주로부터 추출한 total RNA 3 µg을 주형으로 PrimeScript™ RT-PCR kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 합성된 cDNA를 주형으로 하여 각 유전자 특이적인 oligo primer를 이용하여 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같으며 Bioneer 사(Korea)와 Macrogen 사(Korea)에서 구입하였다. PCR은 TaKaRa Ex Taq (TaKaRa)을 이용하여 수행하였으며, PCR 반응은 94°C에서 5분간 denaturation하고 94°C에서 30초, 이용된 primer의 적정 온도에서 30초, 72°C에서 30초의 cycle을 27회 정도 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동 하고 ethidium bromide (EtBr, Bioneer, Korea)로 염색하여 gel image analysis system (Corebio, Korea)을 이용하여 사진 촬영하였다.

Western Blot Analysis

마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주를 60 mm dish에 접종한 뒤 19시간 동안 배양한 후, 0.2 µg/ml 농도의 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하였다. 염증반응 유도 1시간 후, 상추 추출물을 처리하고 다시 6시간 배양한 뒤 세포를 수확하였다. MAPKs와 phospho-MAPKs 단백질, NF-κB와 phospho-NF-κB 단백질의 경우, 상추추출물을 serum free media에 혼합하여 처리하고 4시간 후, LPS를 1.0 µg/ml의 농도로 30분 동안 처리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 얼음을 이용하여 세포활동을 정지시킨 뒤 10X RIPA buffer (Cell signaling, Beverly, MA, USA)를 4배 희석하여 처리한 후 sonication 하였다. Sonication 된 cell lysate는 15분 간 3,000 rpm에서 원심분리하고 상층액을 취한 뒤 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 핵 추출은 Nuclear Extract kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 단백질 정량은 Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하였다. 본 실험에서 사용된 항체 중 iNOS, COX-2, HO-1, p38, p-p38, Erk1/2, p-Erk1/2, JNK, p-JNK, NF-κB p65, NF-κB p-p65에 대한 항체는 모두 Cell signaling사 (USA)에서 구입하였으며, Nrf2, Actin, Lamin A/C 항체와 2차 항체는 모두 Santa Cruz 사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

Reactive oxygen species (ROS) 측정

상추 추출물에 의한 ROS 생산에 미치는 영향을 연구하기 위하여 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주에 LPS를 처리하여 ROS의 발생을 유도한 후 DCF-DA assay를 수행하였다. 즉, RAW 264.7 세포주를 Black 96 well plate의 각 well에 2×10^5 개 접종한 후 19시간 동안 배양한 후, LPS (Sigma, USA)를 0.2 µg/ml의 농도로 1시간 동안 처리하고, 상추 추출물 농도 별로 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양액을 모두 제거한 후 DCF-DA (Sigma, USA)를 25 µM 농도로

phenol-free DMEM (Gibco, USA)에 희석하여 45분간 세포주에 처리한다. 다시 배양액을 모두 제거하고 phenol-free DMEM를 세포주에 분주한 뒤 10분간 대기 후, Tecan Infinite F200 pro plate reader (Austria)를 사용하여 excitation: 510 nm, emission: 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. ROS의 측정은 독립적인 3개의 well에서 수행되었으며, 통계 분석은 Sigma plot을 이용하여 mean ± SD 값으로 나타내었다.

통계 분석

모든 실험은 최소 3회 이상 실시하였으며, 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 각 실험결과의 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조구와 비교하여 Student's *t*-test에 의해 판정하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

건조 상추 에탄올 추출물 처리에 따른 NO 생성 억제 및 세포생존율 분석

건조 상추 에탄올 추출물(DLE, ethanol extracts of dried lettuce)이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 생산과 세포성장 에 미치는 영향을 연구하였다. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에 0.25, 0.5 그리고 1.0 mg/ml의 DLE 시료를 각각 처리한 결과, DLE에 의해 농도의존적으로 NO의 생성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 한편, 양성 대조구로서 동일한 세포주 모델에서 NO 생산을 억제하는 것으로 알려진 레스베라트롤(resveratrol, RES)을 사용하였다 [19]. 그리고, 세포생존율 측정 결과 처리한 DLE와 RES가 세포생존율에는 큰 영향을 주지 않은 것으로 측정되었다(Fig. 1B). 따라서, DLE는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 세포독성을 나타내지 않으며, 농도의존적으로 NO의 생성을 저해한다. 이를 바탕으로, 이후 연구는 DLE의 처리 농도를 1 mg/ml로 선정하여 진행하였다.

건조 상추 추출물에 의한 염증 유전자 및 단백질 발현 감소

건조 상추 에탄올 추출물(DLE)에 의한 pro-inflammatory 유전자인 iNOS와 COX-2의 유전자와 단백질의 발현 분석을 수행하였다. 염증 유전자의 발현을 분석하기 위해 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에 1 mg/ml의 DLE를 처리한 후 그 수준을 확인하였다(Fig. 2A). 그 결과, iNOS와 COX-2 유전자의 발현이 DLE에 의해 현저하게 감소한 반면, 양성 대조구로 사용한 resveratrol에 의해서는 iNOS 유전자의 발현이 약간 감소되는 것을 확인하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 분석한 결과 유전자의 발현 변화와 유사한 결과를 보여 주었다. 즉, DLE를 처리한 경우 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 현저하게 감소하였다. 또한, DLE

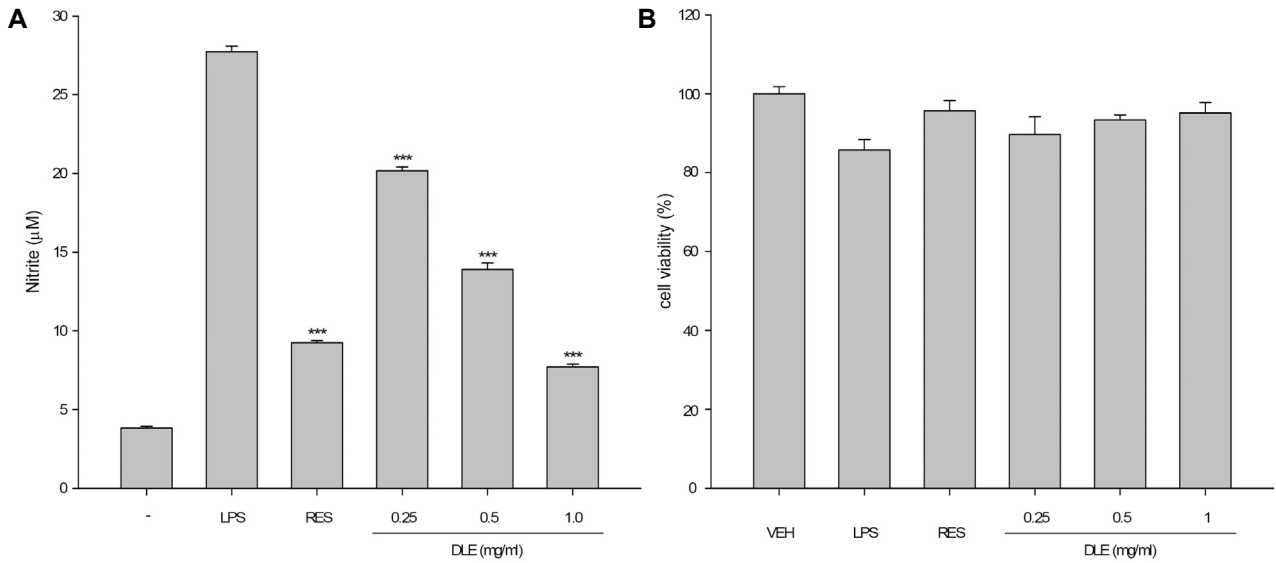


Fig. 1. Effects of Dry-Lettuce ethanol extract (DLE) on nitric oxide (NO) production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage. RAW 264.7 cells were plated 2×10^5 cells/well in a 96-well plate and incubated with different concentrations (0.25, 0.5 and 1.0 mg/ml) of DLE for 16 hr. After treatment, (A) NO production was measured by NO production assay. (B) Cell viability was measured by using MTS proliferation assay kit. [LPS: 0.2 µg/ml, RES: 50 µM resveratrol]. Values indicate means \pm SD (n=4). *** $p < 0.001$ vs LPS.

치리에 의해 6종류의 pro-inflammatory cytokine 유전자의 발현을 확인한 결과, 모두 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 2C). 이러한 연구결과는 DLE가 iNOS와 COX-2를 비롯한 다양한 염증관련 유전자의 발현을 조절함으로써 염증을 억제한다는 사실을 시사한다. LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포주에서 천연물 및 천연물 유래의 순수물질에 의한 염증 반응의 억제 및 iNOS와 COX-2 유전자의 발현억제에 대한 연구들이 보고된 바 있다[6, 20].

건조 상추 에탄올 추출물에 의한 MAPKs 와 NF-κB 신호 전달 감소

DLE가 MAPKs 경로를 통해 염증 반응을 조절하는지 확인하기 위해 MAPKs 발현과 인산화 분석을 수행하였다. DLE를 1 mg/ml의 농도로 RAW 264.7 세포에 4시간 동안 처리한 후 LPS로 30분 동안 자극하여 p38, ERK1/2와 JNK 총 단백질과 각 MAPK의 인산화 변화를 측정하였다. Western blot 분석 결과 1 mg/ml 농도의 DLE 처리군에서 p38, ERK1/2 및 JNK의 총 단백질의 발현 변화 없이 인산화가 모두 억제되었다(Fig. 3A). 이러한 결과는 DLE가 MAPKs 신호전달경로를 억

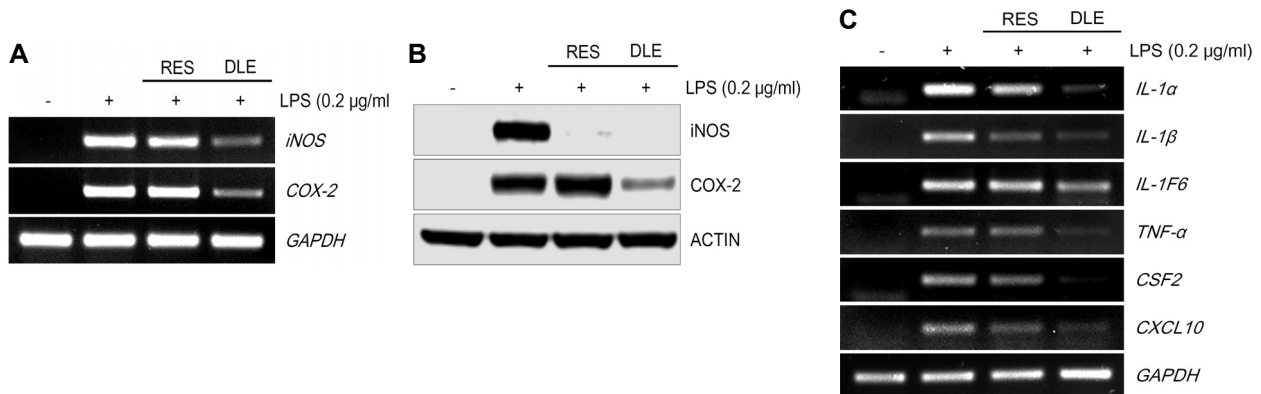


Fig. 2. Down-regulation of pro-inflammatory mediators such as iNOS and COX-2 genes by the treatment of DLE. RAW 264.7 cells were treated with 1.0 mg/ml DLE for 6 hr. Subsequently, total RNAs and cell lysates were prepared from treated cells. (A) Total RNA was used to perform the reverse-transcription PCR with iNOS and COX-2 gene specific primers. (B) Western blot was carried out by using iNOS, COX-2 and ACTIN antibodies. (C) The reverse-transcription PCR was done using various cytokine gene-specific primers.

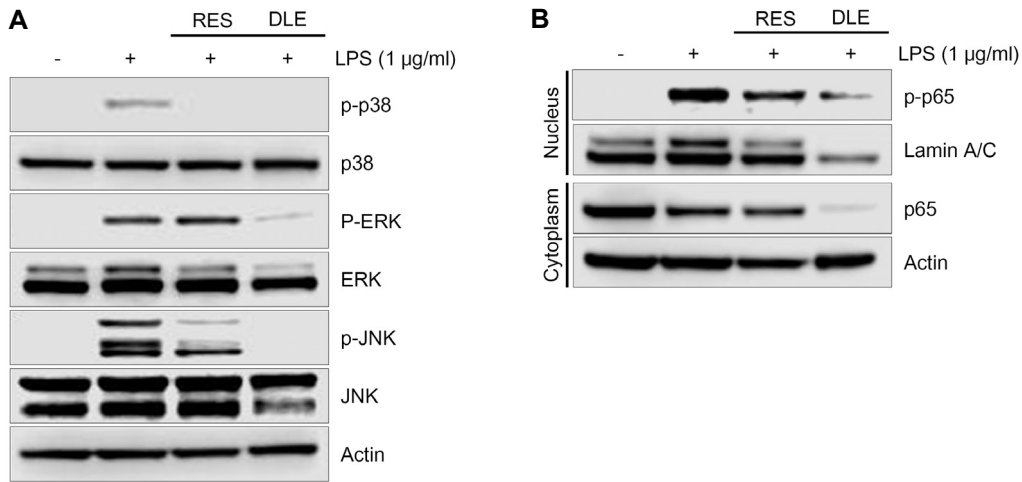


Fig. 3. Inhibition of phosphorylation of MAPKs and the nuclear translocation of NF-κB by DLE treatment. RAW 264.7 cells were pre-treated with 1.0 mg/ml DLE for 4 hr and then stimulated with LPS (1 μg/ml) for 30 min. (A) Western blot was carried out by using p38, phospho-p38, ERK, phospho-ERK, JNK, phospho-JNK and ACTIN antibodies. (B) Western blot analysis was performed by using NF-κB p65, phospho-NF-κB p65, Lamin A/C, and Actin antibodies.

제함으로써 LPS로 유도된 염증반응을 억제한다는 것을 시사한다. 또한, 염증 유전자 발현 조절에 중요한 전사조절인자인 NF-κB p65에 대하여 세포질에서 핵 속으로의 이동을 검증하였다. Fig. 3B에서 보는 바와 같이, LPS만 처리한 경우 세포질에서의 NF-κB p65 발현 수준이 감소되었으며, 핵 속으로의

이동 수준은 증가하였다. 반면 LPS만 처리한 대조구에 비해 DLE 처리군에서는 세포질에서 NF-κB p65의 발현이 감소되었으며, 핵 속으로 활성화된 NF-κB p-p65의 이동도 감소되었다. 대조군으로 사용한 resveratrol 처리군에서는 LPS만 처리한 군에 비해 세포질에서 NF-κB p65의 발현은 비슷하나, 핵 속으로

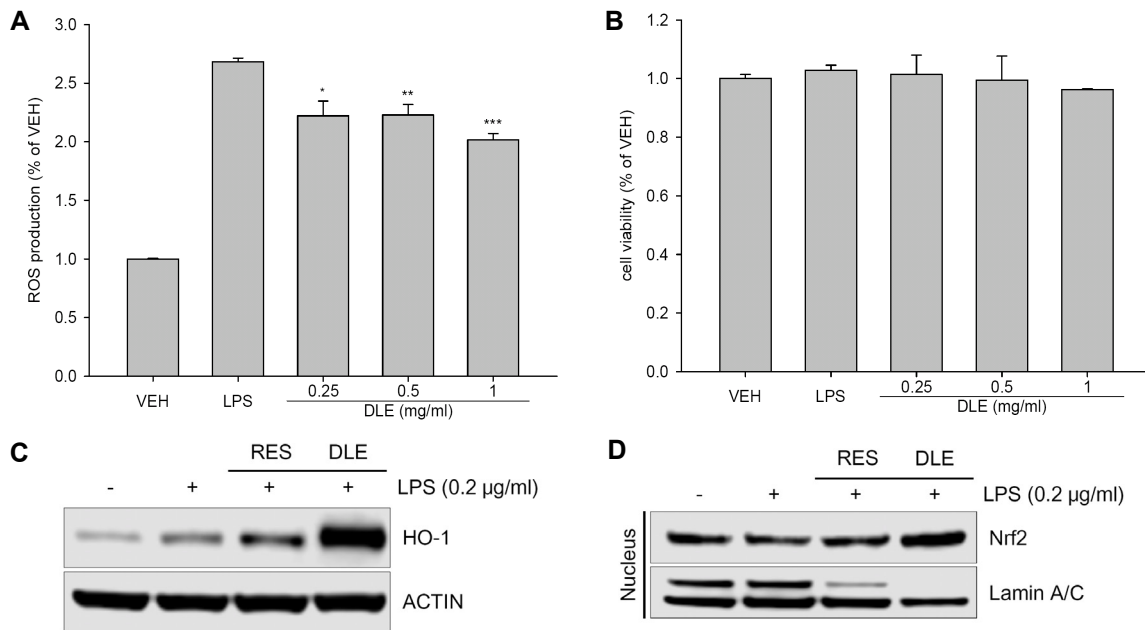


Fig. 4. ROS scavenging effects of DLE and up-regulation of HO-1 via increased nuclear translocation of Nrf2 by DLE treatment. RAW 264.7 cells were plated 2×10^5 cells/well in a 96-well plate and incubated with different concentrations (0.25, 0.5 and 1.0 mg/ml) of DLE for 16 hr. (A) ROS production was measured by DCF-DA assay. Values indicate means \pm SD (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS. (B) And, cell viability was measured by using MTS proliferation assay kit. (C) RAW 264.7 cells were treated with 1.0 mg/ml DLE for 6 hr. Subsequently, cell lysates were prepared and subjected to western blot analysis by using HO-1 and Actin antibodies. (D) Nuclear extracts were prepared and then Western blot analysis was carried out by using Nrf2 and Lamin A/C antibodies.

NF- κ B p-p65의 이동이 감소되었다. 따라서, 이러한 연구결과는 DLE에 의해 NF- κ B p65의 발현이 감소되었을 뿐만 아니라 인산화된 NF- κ B p-p65의 핵 속으로의 이동도 저해되었으며, 이로 인하여 iNOS와 COX-2와 같은 하위유전자의 발현이 감소되는 것으로 생각된다. 따라서, DLE는 MAPKs 경로와 NF- κ B 경로를 조절함으로써 항염증 활성을 보여주는 것으로 생각된다. Cho 등은 허브의 일종인 *Spilanthes acnella*가 MAPK 경로와 NF- κ B 경로를 통하여 염증을 조절할 수 있다고 보고하였다[4].

건조 상추 에탄올 추출물에 의한 Nrf2/HO-1 경로를 통한 ROS 감소

DLE의 처리가 ROS 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 DLE를 0.25, 0.5, 그리고 1 mg/ml의 농도로 처리한 후, ROS 생성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 DLE의 처리는 세포 생존률에 영향을 미치지 않으며(Fig. 4B), 대조군에 비해 ROS의 생성을 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 4A). 이러한 항산화 활성의 주요한 경로 단백질인 hemeoxygenase-1 (HO-1)의 발현과 이의 전사조절인자인 Nrf2 단백질의 핵 속으로의 이동 수준을 확인하였다. 그 결과, 대조군나 레스베라트롤 처리군에 비해 DLE 처리에 의한 HO-1의 발현이 현저하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 4C). 또한, DLE의 처리에 따라 HO-1의 전사조절인자인 Nrf2가 핵 안에서의 단백질 양이 증가되는 것으로 확인되었다(Fig. 4D). 이러한 결과는 DLE가 핵 속으로 Nrf2의 이동을 촉진하며, HO-1의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다. 이러한 연구결과는 DLE가 Nrf2/HO-1 경로를 통해 항산화 및 항염증 활성을 조절함을 제시한다. 최근 Zhou 등은 천연물인 khay-andirobilide A가 MAPKs, NF- κ B, Nrf2/HO-1 경로를 통하여 항염증 활성을 보여준다고 보고한 바 있다[22]. 이와 유사하게, 본 연구결과들도 상추 에탄올 추출물(DLE)이 다양한 염증 유전자의 발현을 감소시키며, MAPKs, NF- κ B, 그리고 Nrf2/HO-1 등 다양한 경로에 의해 염증을 조절할 수 있음을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 산업통상자원부 바이오테라피산업기반구축사업(과제번호 N0001805)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Adesso, S., Pepe, G., Sommella, E., Manfra, M., Scopa, A., Sofo, A., Tenore, G. C., Russo, M., Di Gaudio, F., Autore, G., Campiglia, P. and Marzocco, S. 2016. Anti-inflammatory and antioxidant activity of polyphenolic extracts from *Lactuca sativa* (var. Maravilla de Verano) under different farming methods. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 4194-4206.
- Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511.
- Bhatelia, K., Singh, K. and Singh, R. 2014. TLRs: linking inflammation and breast cancer. *Cell Signal.* **26**, 2350-2357.
- Cho, Y. C., Bach, T. T., Kim, B. R., Vuong, H. L. and Cho, S. 2017. *Spilanthes acnella* inhibits inflammatory responses via inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Med. Rep.* **16**, 339-346.
- Guo, F., He, H., Fu, Z. C., Huang, S., Chen, T., Papasian, C. J., Morse, L. R., Xu, Y., Battaglino, R. A., Yang, X. F., Jiang, Z., Xin, H. B. and Fu, M. 2015. Adipocyte-derived PAMM suppresses macrophage inflammation by inhibiting MAPK signalling. *Biochem. J.* **472**, 309-318.
- Jeong, J. B. and Jeong, H. J. 2010. Rheosmin, a naturally occurring phenolic compound inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells by blocking NF-kappaB activation pathway. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2148-2153.
- Jurjus, A., Eid, A., Al Kattar, S., Zeenny, M. N., Gerges-Geagea, A., Haydar, H., Hilal, A., Oueidat, D., Matar, M., Tawilah, J., Hussein, I. H., Schembri-Wismayer, P., Cappello, F., Tomasello, G., Leone, A. and Jurjus, R. A. 2015. Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. *BBA Clin.* **5**, 16-24.
- Lee, S. B., Lee, W. S., Shin, J. S., Jang, D. S. and Lee, K. T. Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 via AP-1, NF- κ B, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **49**, 21-29.
- Mahmoud, A. M., Germoush, M. O., Al-Anazi, K. M., Mahmoud, A. H., Farah, M. A. and Allam, A. A. 2018. Comphora molmol protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 499-509.
- Natarajan, K., Abraham, P., Kota, R. and Isaac, B. 2018. NF- κ B-iNOS-COX2-TNF α inflammatory signaling pathway plays an important role in methotrexate induced small intestinal injury in rats. *Food Chem. Toxicol.* **118**, 766-783.
- Newstead, S. L., Gates, A. J., Hartley, M. G., Rowland, C. A., Williamson, E. D. and Lukaszewski, R. A. 2014. Control of intracellular *Francisella tularensis* by different cell types and the role of nitric oxide. *J. Immunol. Res.* **2014**, 694717.
- Olumuyiwa-Akeredolu, O. O. and Pretorius, E. 2016. Rheumatoid arthritis: Notable biomarkers linking to chronic systemic conditions and cancer. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 918-924.
- Qureshi, A. A., Guan, X. Q., Reis, J. C., Papasian, C. J., Jabre, S., Morrison, D. C. and Qureshi, N. 2012. Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor. *Lipids Health Dis.* **11**, 76.
- Ren, H., Hao, J., Liu, T., Zhang, D., Lv, H., Song, E. and Zhu, C. 2016. Hesperetin suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells via the inhibition of NF- κ B and activation of Nrf2/HO-1 pathways. *Inflammation* **39**, 964-373.
- Song, Y., Huang, L. and Yu, J. 2016. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation

- in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling. *J. Neuroimmunol.* **301**, 1-6.
16. Terazawa, R., Akimoto, N., Kato, T., Itoh, T., Fujita, Y., Hamada, N., Deguchi, T., Iinuma, M., Noda, M., Nozawa, Y. and Ito, M. 2013. A kavalactone derivative inhibits lipopolysaccharide-stimulated iNOS induction and NO production through activation of Nrf2 signaling in BV2 microglial cells. *Pharmacol. Res.* **71**, 34-43.
 17. Wiczyńska, J. and Cavoski, I. 2018. Antimicrobial, antioxidant and sensory features of eugenol, carvacrol and trans-anethole in active packaging for organic ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Chem.* **259**, 251-260.
 18. Wynn, T. A. and Vannella, K. M. 2016. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450-462.
 19. Yang, Y., Li, S., Yang, Q., Shi, Y., Zheng, M., Liu, Y., Chen, F., Song, G., Xu, H., Wan, T., He, J. and Chen, Z. 2014. Resveratrol reduces the proinflammatory effects and lipopolysaccharide-induced expression of HMGB1 and TLR4 in RAW264.7 cells. *Cell Physiol. Biochem.* **33**, 1283-1292.
 20. Yao, X., Wu, D., Dong, N., Ouyang, P., Pu, J., Hu, Q., Wang, J., Lu, W. and Huang, J. 2016. Moracin C, A Phenolic compound isolated from *artocarpus heterophyllus*, suppresses lipopolysaccharide-activated inflammatory responses in murine Raw264.7 macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, pii: E1199. doi: 10.3390/ijms17081199.
 21. Yu, W., Zhang, X., Wu, H., Zhou, Q., Wang, Z., Liu, R., Liu, J., Wang, X. and Hai, C. 2017. HO-1 Is Essential for tetrahydroxystilbene glucoside mediated mitochondrial biogenesis and anti-inflammation process in LPS-treated RAW264.7 macrophages. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, 1818575.
 22. Zhou, M. M., Zhang, W. Y., Li, R. J., Guo, C., Wei, S. S., Tian, X. M., Luo, J. and Kong, L. Y. 2018. Anti-inflammatory activity of Khayandirobilide A from *Khaya senegalensis* via NF- κ B, AP-1 and p38 MAPK/Nrf2/HO-1 signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 and BV-2 cells. *Phytomedicine* **42**, 152-163.

초록 : 건조 상추 에탄올 추출물의 항염증 활성

이은주¹ · 서유미¹ · 김용현¹ · 정정욱¹ · 성화정² · 손호용² · 박종미³ · 김종식^{1*}

(¹국립안동대학교 생명과학과, ²국립안동대학교 식품영양학과, ³경북바이오산업 연구원)

상추는 가장 선호하는 녹색 채소 중 하나이다. 상추는 폴리페놀성 화합물을 비롯한 다양한 성분을 함유하고 있으며, 항균, 항산화, 항염증 등의 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 건조상추의 에탄올 추출물(DLE)을 제조하고 이들의 항염증 활성을 연구하였다. DLE의 항염증 활성을 측정하기 위하여 LPS로 활성화된 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide (NO) 생성을 측정하였다. DLE는 세포주의 생존에는 영향을 미치지 않으면서 NO 생산을 현저하게 저해하였다. DLE에 의해 염증 유전자인 iNOS와 COX-2의 유전자와 단백질의 발현이 모두 감소하였으며, 6개의 염증관련 cytokine 유전자(*IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-1F6*, *TNF- α* , *CSF2*, 그리고 *CXCL10*)의 발현이 모두 감소하였다. 또한, DLE의 처리는 MAPKs 경로의 인산화를 모두 저해하였으며, NF- κ B p65의 핵으로의 이동을 저해하였다. 이러한 결과는 DLE의 항염증 활성은 MAPKs 경로와 NF- κ B 경로를 조절함으로써 이루어짐을 시사한다. 또한, DLE는 농도의존적으로 reactive oxygen species (ROS)의 생산을 저해하였으며, hemeoxygenase-1 (HO-1) 단백질의 발현을 증가시켰으며, HO-1의 전사조절인자인 Nrf2의 핵으로의 이동을 증가시켰다. 결론적으로, 이러한 연구결과는 DLE가 염증관련 유전자의 발현을 감소시키며, MAPKs, NF- κ B, 그리고 Nrf2/HO-1 등 다양한 경로를 조절함으로써 항염증 활성을 가지는 것을 제시한다.