

Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Leaf, Seed, and Seedpod of *Nelumbo nucifera*

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 July 31, 2018 / Revised October 25, 2018 / Accepted October 26, 2018

Nelumbo nucifera, also known as sacred lotus, has mainly been used as a food throughout the Asian countries. In the present study, we prepared ethanol extracts from leaf (NL), seed (NS), and seedpod (NSP) of *Nelumbo nucifera* and investigated their anti-inflammatory activities in mouse macrophage RAW 264.7 cells. To evaluate the anti-inflammatory activities of NL, NS, and NSP, nitric oxide (NO) production was measured in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. NL, NS, and NSP significantly reduced NO production in a dose-dependent manner without affecting cell viabilities. NL, NS, and NSP dramatically decreased the protein expression of pro-inflammatory genes such as iNOS and COX-2. NL, NS, and NSP also suppressed phosphorylation of MAPKs and the nuclear translocation of NF- κ B p65 indicating they have their anti-inflammatory activities via regulating mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathways. In addition, we analyzed the production of reactive oxygen species (ROS) by the treatment of NL, NS, and NSP. All extracts reduced ROS production in a dose-dependent manner. And also, they increased heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression and the nuclear translocation of nuclear respiratory factor 2 (Nrf2). In conclusion, our results suggest that *Nelumbo nucifera* has its anti-inflammatory activity via regulating MAPKs, NF- κ B, and Nrf2/HO-1 pathways.

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

서론

염증은 독성물질, 상해, 감염 등의 유해한 자극으로부터 숙주를 보호하기 위한 병리학적 반응의 대표적인 특징으로, 다양한 면역세포와 매개물질이 관여하는 복잡한 과정이다. 그러나, 만성적이고 과한 염증상태가 지속되면 오히려 섬유화[23], 퇴행성 뇌 질환[22], 아토피[15], 장 질환[6] 등과 같은 다양한 질병으로 발달할 수 있으며, 심지어 암의 발생에 있어서 대표적인 원인으로 지목된다[9, 17]. 이로 인해, 현재 염증을 조절하고 그 기전을 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

염증은 다양한 요인에 의해 유발될 수 있으며, 그 중 lipopolysaccharide (LPS)라 불리는 그람 음성세균의 외막 구조물은 대식세포를 자극하는 대표적인 염증 유발인자로 작용한다. 대식세포는 Toll-like receptor 4 (TLR4)라고 불리는 pat-

tern recognition receptor를 통해 LPS를 인식하고, 이는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family를 포함하여 여러 신호전달 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 활성화된 MAPKs는 전사 조절인자인 nuclear factor of kappaB (NF- κ B)의 전좌를 유도하며, 그 결과 iNOS 또는 COX-2 등과 같은 pro-inflammatory 유전자의 발현으로 이어진다[6, 10, 16].

Pro-inflammatory pathway의 활성화는 cytokines 또는 chemokines, prostaglandins 등의 다양한 inflammatory mediators의 발현을 조절하고, reactive oxygen species (ROS) 생성을 상향 조절한다[1, 7, 8]. 과도한 ROS의 수준은 DNA와 같은 생체 거대 분자에 손상을 입히고 염증을 심화시킬 수 있기 때문에[1, 8], 현재 Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2)/ARE (antioxidant response element) signaling pathway의 조절을 통해 ROS의 발생을 완화시키는 연구가 다양하게 보고되고 있다[12, 20, 24].

연(*Nelumbo nucifera*)은 아시아 전역에서 재배되는 다년생 수생식물이며, 연의 줄기와 잎, 씨앗, 꽃 등 대부분의 부위는 식용 또는 약용으로 다양하게 이용되고 있다. 연은 alkaloids와 flavonoids, steroids, tannins, glycosides 그리고 polyphenols 등과 같은 다양한 종류의 phytochemicals를 함유하고

*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.

있으며[2, 11, 14, 18], 이들에 의한 항산화[11], 항염증[3], 항암[2], 항비만[19], 항바이러스[14] 등과 같은 다양한 약리학적 활성을 증명하는 연구가 보고되었다. 하지만, 연의 각 부위에 대한 공통된 생리학적 활성을 조사하고 그 경향을 비교한 연구는 보고된 바 없다.

따라서, 본 연구는 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 마우스 대식세포를 이용하여 연잎, 연자육, 연자방 에탄올 추출물의 항염증 활성 및 그 작용기전에 대해 다양한 신호경로를 중심으로 연구하였다.

재료 및 방법

연잎, 연자육, 연자방 에탄올 추출물의 제조

다양한 연 부위 중 연잎(NL), 연자육(NS), 및 연자방(NSP) 시료에 대해 에탄올 추출물을 각각 제조하였다. 먼저 에탄올 추출물을 제조하기 위하여 연 부위별 시료에 각각 10배의 95% ethanol을 첨가한 후 실온에서 24시간씩 3회 반복 추출하였다. 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압농축 (Eyela rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 시료를 제조하였다. 제조된 추출물들은 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 100 mg/ml 농도로 녹여 -20℃에 보관하며 활성평가에 사용하였다.

마우스 대식세포 RAW 264.7 배양 및 염증반응 유도

마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Fredrick, MD, USA)에서 구입하였다. 세포주 배양은 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)를 사용하였으며, 세포배양은 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 실시하였다. 염증 반응은 Gram 음성 세균의 외막 구조물인 lipopolysaccharide (LPS, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용해 유도하였다.

Nitric oxide (NO) 생성 분석

LPS에 의해 염증 유도된 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주에서 연잎(NL), 연자육(NS), 연자방(NSP) 에탄올 추출물에 의한 NO 생성 수준을 측정 하였다. 96-well plate의 각 well에 RAW 264.7 세포주를 2×10⁵ 개 접종한 후 19시간 동안 배양하였다. 그 후 0.2 µg/ml 농도의 LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하고 1시간 동안 대기한다. 그 다음 각 추출물을 농도 별로 처리한 뒤 16시간 동안 배양하였다. 그 후 상등액 100 µl와 Griess reagent (Sigma) 100 µl를 혼합하여 15분간 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.

세포생존을 분석

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여, 각 추출물의 세포독성을 측정하였다. 96-well plate의 각 well에 RAW 264.7 세포주를 2×10⁵ 개 접종한 후 19시간 동안 배양하였다. 그 후 0.2 µg/ml 농도의 LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하고 1시간 동안 대기한다. 그 다음 각 추출물을 농도 별로 처리한 뒤 16시간 동안 배양하였다. 그 후 RAW 264.7 세포주에 20 µl의 MTS 용액을 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에 4시간 동안 반응시키고, Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존을 분석은 독립적인 4개의 well에서 수행되었다.

Western Blot Analysis

60 mm dish에 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주를 접종한 후 19시간 동안 배양하였다. 그 후 0.2 µg/ml 농도의 LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하고 1시간 동안 대기한다. 그 다음 각 추출물을 농도 별로 처리한 뒤 8시간 동안 배양하였다. MAPKs와 phospho-MAPKs 단백질, NF-κB와 phospho-NF-κB 단백질의 경우, 각 추출물을 serum free media에 혼합하여 처리하고 4시간 후, 1.0 µg/ml 농도의 LPS를 처리하고 30분간 대기한 뒤 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 4℃에서 세포활동을 정지시킨 뒤 10X RIPA buffer (Cell signaling, Beverly, MA, USA)를 4X로 희석하여 처리한 후 sonication 하였다. Sonication 된 cell lysate는 15분 간 3,000 rpm에서 원심분리하고 상층액을 취하여 사용하였다. 핵 추출은 Nuclear Extract kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 단백질은 Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하여 정량하고, -20℃에 보관하며 사용하였다. 본 실험에서 사용된 항체 중 iNOS, COX-2, p38, p-p38, Erk1/2, p-Erk1/2, JNK, p-JNK, NF-κB p65, NF-κB p-p65, HO-1, Nrf2에 대한 항체는 모두 Cell signaling사(USA)에서 구입하였으며, Actin 항체 및 Lamin A/C 항체와 2차 항체는 모두 Santa Cruz 사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

Reactive oxygen species (ROS) 측정

연잎(NL), 연자육(NS), 연자방(NSP) 에탄올 추출물이 ROS 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 DCF-DA assay를 수행하였다. 96-well plate의 각 well에 RAW 264.7 세포주를 2×10⁵ 개 접종한 후 19시간 동안 배양한 후 0.2 µg/ml 농도의 LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1시간 처리하였다. 그

다음 각 추출물을 농도 별로 처리한 뒤 16시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양액을 모두 제거한 후 25 μM 농도가 되도록 DCF-DA (Sigma, USA)를 phenol-free DMEM (Gibco, USA)에 희석하여 세포주에 처리하고 45분간 반응시켰다. 그 다음 세포주로부터 배양액을 모두 제거하고 새 phenol-free DMEM를 분주하고 10분간 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 대조구와 비교하여 Student's *t*-test에 의해 판정하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

연잎, 연자육, 연자방 에탄올 추출물에 의한 NO 생성 억제 및 세포생존율 변화 분석

연잎(NL), 연자육(NS), 연자방(NSP) 에탄올 추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 생산과 세포성장에 미치는 영향을 연구하였다. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml의 각 시료를 각각 처리한 결과, 처리한 NL, NS, NSP 농도의존적으로 NO의 생산이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 한편, 양성대조구로는 RAW 264.7 세포에서 NO 생산을 저해하는 것으로 알려진 레스베라트롤(resveratrol, RES)을 사용하였다[21]. 한편, 같은 조

건에서 세포생존율 변화를 측정한 결과 처리한 NL, NS, NSP, RES 모두 세포 생존율에는 큰 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 1B). 따라서, NL, NS, NSP는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 세포 생존율에는 영향을 미치지 않으면서 NO의 생산을 농도의존적으로 저해함을 확인하였다.

연잎, 연자육, 연자방 에탄올 추출물에 의한 염증 유전자 단백질 발현 감소

연잎(NL), 연자육(NS), 연자방(NSP) 에탄올 추출물에 의한 pro-inflammatory 유전자인 iNOS와 COX-2의 단백질의 발현 분석을 수행하였다. 즉, LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에 각각 0.5 mg/ml의 NL, NS, NSP를 처리한 후 염증 유전자인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 분석하였다(Fig. 2). 그 결과, iNOS 단백질의 발현은 NL, NS, NSP에 의해 모두 발현이 현저하게 감소하였다. 대조구로 사용한 RES에 의해서도 iNOS 단백질 발현이 현저하게 감소하였다. 그러나, COX-2 단백질의 경우 NL과 NSP의 처리에 의해서 현저하게 발현이 감소되었으나, NS와 RES에 의해서는 약하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 2). Kaewkroek등은 강황 추출물과 함유 성분들이 항염증 활성을 가지며, iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 보고한 바 있다[13].

연잎, 연자육, 연자방 에탄올 추출물에 의한 MAPKs 와 NF-κB 신호 경로 저해

연잎(NL), 연자육(NS), 연자방(NSP) 추출물에 의해 MAPKs 신호경로에 염증반응이 조절되는지 확인하기 위하여 추출물 처리 후 MAPKs 발현과 인산화 분석을 수행하였다. NL, NS, NSP를 0.5 mg/ml의 농도로 RAW 264.7 세포에 4시간 동안 처리한 후 LPS로 15분 동안 자극하여 p38, ERK1/2와 JNK

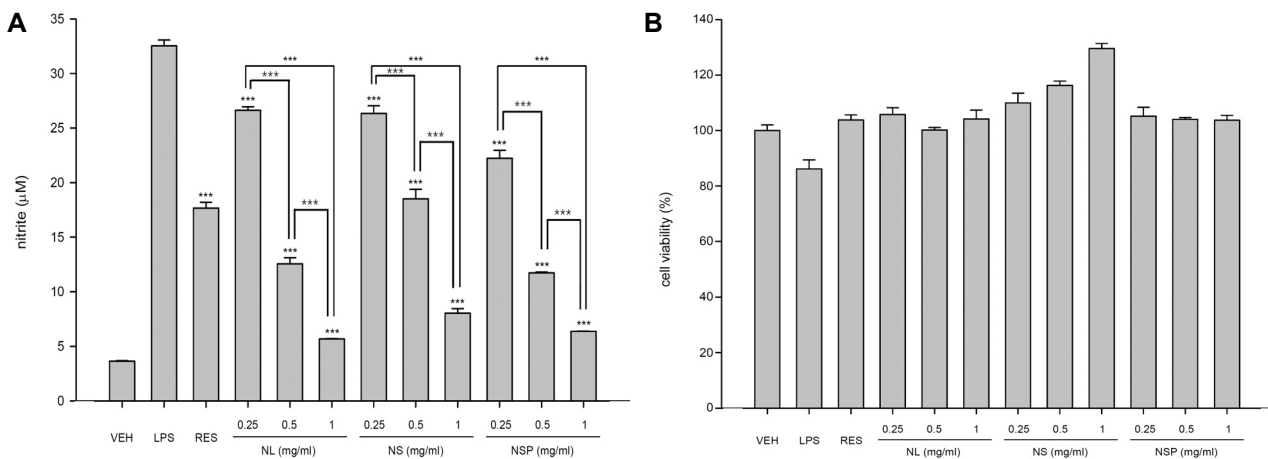


Fig. 1. Effects of leaf (NL), seed (NS) and seedpod (NSP) extracts of *Nelumbo nucifera* on nitric oxide (NO) production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage. RAW 264.7 cells were plated 2x10⁵ cells/well in a 96-well plate and incubated with different concentrations (0.25, 0.5 and 1 mg/ml) of NL, NS and NSP for 16 hr. After treatment, (A) NO production was measured by NO assay. (B) Cell viability was measured using MTS proliferation assay kit. Values indicate means±SD (n=4). ****p*<0.001 vs LPS.

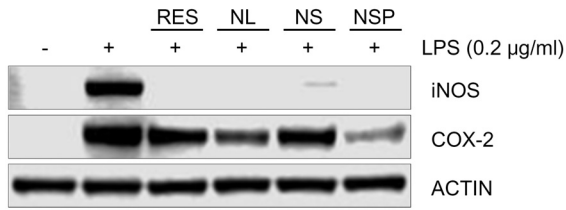


Fig. 2. Down-regulation of iNOS and COX-2 proteins by the treatment of NL, NS and NSP. RAW 264.7 cells were incubated with 0.5 mg/ml NL, NS, NSP for 8 hr. Subsequently, cell lysates were prepared from treated cells and Western blot analysis was performed by using iNOS, COX-2, and ACTIN antibodies. Resveratrol was used as a positive control. (RES: 50 µM resveratrol)

총 단백질과 각 MAPK의 인산화의 변화를 분석하였다. Western blot 분석 결과 0.5 mg/ml 농도의 모든 처리군에 비해 p38, ERK1/2 및 JNK의 총 단백질의 발현 변화는 관찰되지 않았으며, 각 단백질의 인산화는 현저하게 저해되었다(Fig. 3A). 이러한 연구 결과는 NL, NS, NSP가 MAPK 신호전달 경로를 억제함으로써 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 염증반응을 억제한다는 사실을 시사한다. 또한, 염증 유전자 발현 조절에 중요한 전사조절인자인 NF-κB p65의 세포질에서 발현과 활성화된 NF-κB p-p65의 핵 속으로의 이동을 분석하였다. 그 결과, Fig. 3B에서 보는 바와 같이, 세포질에서의 NF-κB p65의 발현은 LPS만 처리한 대조군에 비해 NL, NS, NSP 처리군에서 NF-κB p65의 발현이 감소하였으며, 대조군에 비해 NF-κB p-p65의 핵 속으로의 이동이 NL, NS, NSP 처리군에서 현저하게 감소함을 확인하였다. 이러한 연구결과는 NL, NS, NSP의 처리에 의해 NF-κB p65이 핵 속으로의 이동이 저해되며, 따라서 하위유전자인 iNOS와 COX-2와 같은 유전자의 발현이 감소되는 것으로 생각된다. 따라서, NL, NS, NSP는

MAPKs 경로와 NF-κB 경로를 조절함으로써 항염증 활성을 보여주는 것으로 생각된다. 최근, roburic acid에 의한 항염증 활성이 NF-κB 경로와 MAPK 경로를 통해 이루어진다는 것이 보고된 바 있다[4].

연잎, 연자육, 연자방 에탄올 추출물에 의한 Nrf2/HO-1 경로를 통한 ROS 감소

연잎(NL), 연자육(NS), 연자방(NSP) 추출물이 ROS 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 각 추출물을 0.25, 0.5, 그리고 1 mg/ml의 농도로 처리한 후 ROS 생성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4A에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 처리한 추출물의 농도의존적으로 ROS 생성이 감소됨을 확인하였다. 이러한 조건에서 세포생존율에 미치는 영향은 매우 미미 했다(Fig. 4B). NL, NS, NSP에 의한 ROS 생성억제 현상이 항산화 활성의 주요한 경로 단백질인 hemeoxygenase-1 (HO-1)과 이의 전사조절인자인 Nrf2 단백질에 의한 것인지 확인하였다. 그 결과, NL, NS, NSP 처리에 의해 HO-1의 발현이 현저하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 5A). 또한, HO-1 유전자의 전사조절인자인 Nrf2의 핵 속으로의 이동도 NL, NS, NSP 처리군에서 현저하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 5B). 이러한 연구결과는 NL, NS, NSP는 Nrf2/HO-1 경로에 의해 항산화 및 항염증 활성을 조절함을 제시해 주는 것이다. 이러한 결과와 유사하게 다양한 천연물 유래 생리활성물질에 의한 항염증 활성이 Nrf2/HO-1 경로에 의해 조절될 수 있음이 보고되었다[5, 10]

종합적으로, 이러한 연구결과들은 연(*Nelumbo nucifera*)의 다양한 부위 중 연잎(leaf), 연자육(seed), 연자방(seedpod)의 에탄올 추출물은 항염증 활성을 가지고 있으며, 이러한 활성은 MAPKs, NF-κB, 그리고 Nrf2/HO-1 등 다양한 경로에 의해 조절됨을 제시한다.

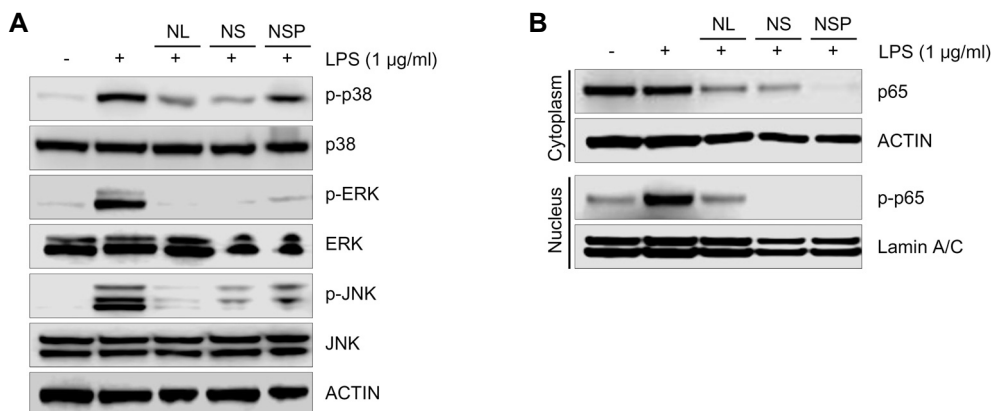


Fig. 3. Inhibition of phosphorylation of MAPKs and nuclear translocation of NF-κB p65 by the treatment of NL, NS and NSP. RAW 264.7 cells were pre-treated with 0.5 mg/ml NL, NS, NSP for 4 hr, and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 30 min. Cell lysates and nuclear extracts were prepared. (A) Western 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-p65, Lamin A/C, and ACTIN antibodies.

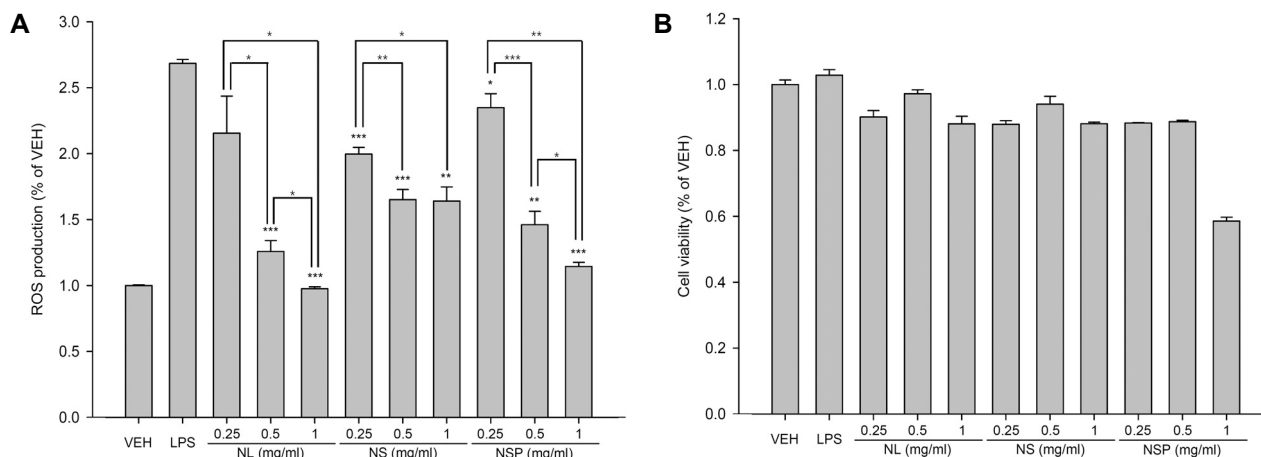


Fig. 4. ROS scavenging effects of NL, NS, and NSP extracts. RAW 264.7 cells were plated 2×10^5 cells/well in a 96-well plate and incubated with different concentrations (0.25, 0.5 and 1.0 mg/ml) of NL, NS, and NSP for 16 hr. And then, (A) ROS production was measured by DCF-DA assay. (B) Cell viability was measured using MTS proliferation assay kit. Values indicate means \pm SD (n=4). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs LPS.

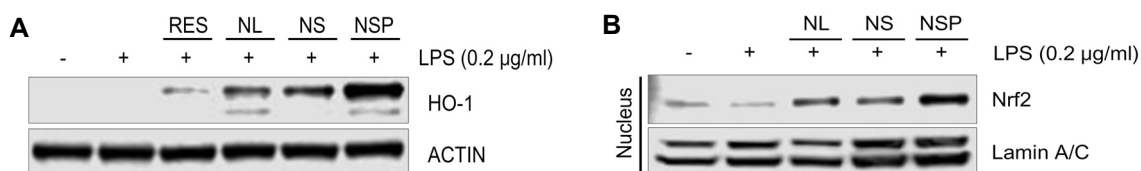


Fig. 5. Up-regulation of HO-1 via increased nuclear translocation of Nrf2 by NL, NS, and NSP treatment. (A) RAW 264.7 cells were treated with 0.5 mg/ml NL, NS, and NSP for 8 hr. Subsequently, cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis by using HO-1 and ACTIN antibodies. (B) Nuclear extracts were prepared, and then Western blot analysis was carried out by using Nrf2 and Lamin A/C antibodies.

감사의 글

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

References

- Ahmed, S. M., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J. and Tang, X. 2017. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**, 585-597.
- Arjun, P., Saranya Sivan, P. S., Mohana Priya, S., Krishnamoorthy, M. and Balasubramanian, K. 2012. Phytochemical analysis and anticancer activity of *Nelumbo nucifera* extracts. *J. Acad. Indus.* **1**, 81-85.
- Baskaran, R., Priya, L. B., Kalaiselvi, P., Poornima, P., Huang, C. Y. and Padma, V. V. 2017. Neferine from *Nelumbo nucifera* modulates oxidative stress and cytokines production during hypoxia in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed. Pharmacother.* **93**, 730-736.
- Chen, Y., Ji, N., Pan, S., Zhang, Z., Wang, R., Qiu, Y., Jin, M. and Kong, D. 2017. Roburic Acid suppresses NO and IL-6 production via targeting NF- κ B and MAPK pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation* **40**, 1959-1966.
- Cho, B. O., Yin, H. H., Park, S. H., Byun, E. B., Ha, H. Y. and Jang, S. I. 2016. Anti-inflammatory activity of myricetin from *Diospyros lotus* through suppression of NF- κ B and STAT1 activation and Nrf2-mediated HO-1 induction in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1520-1530.
- Dou, W., Zhang, J., Sun, A., Zhang, E., Ding, L., Mukherjee, S., Wei, X., Chou, G., Wang, Z. T. and Mani, S. 2013. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *Br. J. Nutr.* **110**, 599-608.
- El Assar, M., Angulo, J. and Rodríguez-Mañas, L. 2013. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 380-401.
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F. and Loguercio, C. 2007. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **121**, 2381-2386.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.
- Guo, C., Yang, L., Luo, J., Zhang, C., Xia, Y., Ma, T. and Kong, L. 2016. Sophoraflavanone G from *Sophora alopecuroides* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells by targeting PI3K/Akt, JAK/STAT and

- Nrf2/HO-1 pathways. *Int. Immunopharmacol.* **38**, 349-356.
11. Jiang, X. L., Wang, L., Wang, E. J., Zhang, G. L., Chen, B., Wang, M. K. and Li, F. 2018. Flavonoid glycosides and alkaloids from the embryos of *Nelumbo nucifera* seeds and their antioxidant activity. *Fitoterapia* **25**, 184-190.
 12. Jin, S. W., Hwang, Y. P., Choi, C. Y., Kim, H. G., Kim, S. J., Kim, Y., Chung, Y. C., Lee, K. J., Jeong, T. C. and Jeong, H. G. 2017. Protective effect of rutaecarpine against t-BHP-induced hepatotoxicity by upregulating antioxidant enzymes via the CaMKII-Akt and Nrf2/ARE pathways. *Food Chem. Toxicol.* **100**, 138-148.
 13. Kaewkroek, K., Wattanapiromsakul, C. and Tewtrakul, S. 2010. Anti-inflammatory mechanisms of compounds from *Curcuma mangga* rhizomes using RAW264.7 macrophage cells. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 1547-1550.
 14. Kashiwada, Y., Aoshima, A., Ikeshiro, Y., Chen, Y. P., Furukawa, H., Itoigawa, M., Fujioka, T., Mihashi, K., Cosentino, L. M., Morris-Natschke, S. L. and Lee, K. H. 2005. Anti-HIV benzyloisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 443-448.
 15. Leung, D. Y., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I. and Hamid, Q. A. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* **113**, 651-657.
 16. Lim, K. H. and Staudt, L. M. 2013. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a011247.
 17. Mantovani, A. and Pierotti, M. A. 2008. Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer Lett.* **267**, 180-181.
 18. Mukherjee, P. K., Mukherjee, D., Maji, A. K., Rai, S. and Heinrich, M. 2009. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) - phytochemical and therapeutic profile. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 407-422.
 19. Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S. and Ohizumi, Y. 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 238-44.
 20. Park, G., Oh, D. S., Lee, M. G., Lee, C. E. and Kim, Y. U. 2016. 6-Shogaol, an active compound of ginger, alleviates allergic dermatitis-like skin lesions via cytokine inhibition by activating the Nrf2 pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **310**, 51-59.
 21. Steiner, N., Balez, R., Karunaweera, N., Lind, J. M., Münch, G. and Ooi, L. 2016. Neuroprotection of Neuro2a cells and the cytokine suppressive and anti-inflammatory mode of action of resveratrol in activated RAW264.7 macrophages and C8-B4 microglia. *Neurochem. Int.* **95**, 46-54.
 22. Woo, J. H., Lee, J. H., Kim, H., Park, S. J., Joe, E. H. and Jou, I. 2015. Control of inflammatory responses: a new paradigm for the treatment of chronic neuronal diseases. *Exp. Neurobiol.* **24**, 95-102.
 23. Wynn, T. A. and Barron, L. 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver. Dis.* **30**, 245-257.
 24. Yang, D., Xiao, C. X., Su, Z. H., Huang, M. W., Qin, M., Wu, W. J., Jia, W. W., Zhu, Y. Z., Hu, J. F. and Liu, X. H. 2017. (-)-7(S)-hydroxymatairesinol protects against tumor necrosis factor- α -mediated inflammation response in endothelial cells by blocking the MAPK/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1. *Phytomedicine* **32**, 15-23.

초록 : 연잎, 연자육, 연자방 에탄올 추출물의 항염증 활성

이은주¹ · 서유미¹ · 김용현¹ · 정정욱¹ · 성화정² · 손호용² · 박종이³ · 김종식^{1*}

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

연은 아시아 국가에서 음식과 약재로 널리 사용되는 재료이다. 본 연구에서는 연의 잎(leaf, NL), 자육(seed, NS), 자방(seedpod, NSP)으로부터 에탄올 추출물을 제조하고 이들의 항염증 활성과 작용기전을 규명하였다. 이들의 항염증 활성을 연구하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 생산을 측정하였다. NL, NS, NSP는 세포 생존율에 영향을 주지 않으면서, 농도의존적으로 NO의 생산을 현저하게 저해하였으며, iNOS 및 COX-2와 같은 pro-inflammatory 중재자들의 단백질 발현을 감소시켰다. 또한, NL, NS, NSP는 MAPKs 단백질의 인신화를 감소시키고 NF- κ B p65의 핵으로의 이동을 저해함으로써, 세 추출물에 의한 항염증 활성은 MAPKs 경로와 NF- κ B 경로를 조절함으로써 이루어짐을 제시한다. 게다가, ROS의 생성이 세 추출물에 의해서 모두 저해되었으며, HO-1의 발현과 HO-1의 전사조절인자인 Nrf2의 핵으로의 이동이 증가되었다. 결론적으로, 이러한 연구 결과는 연의 다양한 부위의 추출물인 NL, NS 그리고 NSP는 항염증 활성을 가지고 있으며, MAPKs, NF- κ B, Nrf2/HO-1 등 다양한 신호경로를 통해 조절할 수 있음을 제시한다.