

올벚나무 잎 추출물의 항염 효능 및 유효성분 규명

홍혜진·고하나·이남호[†]

제주대학교 화학·코스메틱스학과

(2019년 2월 11일 접수, 2019년 3월 7일 수정, 2019년 3월 27일 채택)

Anti-inflammatory Effects of the Extracts of *Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi Leaves and Identification of Active Constituents

Hye Jin Hong, Ha Na Ko, and Nam Ho Lee[†]

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea

(Received February 11, 2019; Revised March 7, 2019; Accepted March 27, 2019)

요약: 올벚나무 잎 추출물을 제조하고 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 대식세포에 대한 항염 효과를 조사하였다. 추출물 및 분획물(*n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol 및 water)에 대하여 활성 실험을 진행한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 ethyl acetate (EtOAc) 분획물이 세포독성 없이 76.3%의 NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 또한 EtOAc 분획물이 농도 의존적으로 NO 생성을 효과적으로 억제하고 있음을 확인하였다. 이러한 항염 효과에 대한 추가적인 기전 연구를 진행한 결과, EtOAc 분획물이 PGE₂, IL-1 β 및 IL-6의 생성을 감소시켰으며, iNOS와 COX-2 단백질의 발현도 억제시키는 것을 확인하였다. EtOAc 분획물에서 활성 성분을 규명하기 위하여 column chromatography를 진행하였으며 5개의 화합물을 분리 동정하였다. ursolic acid (1), prunasin (2), methyl *p*-coumarate (3), kaempferol (4), astragalinal (5). 분리된 compound 1 - 5는 모두 올벚나무 잎에서 처음 분리된 물질이다. 분리된 화합물을 대상으로 활성 실험을 진행한 결과, 플라보노이드 compound 4와 5가 NO 생성을 억제하고 있음을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로, 플라보노이드를 유효성분으로 함유하는 올벚나무 잎은 항염 효과를 갖는 천연 소재로서 활용이 가능할 것이라 사료된다.

Abstract: In this study Anti-inflammatory activity was investigated for the extract of *Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi by monitoring nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. The *P. pendula* ethyl acetate (EtOAc) fraction showed to decrease the NO synthesis by 76.3% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. The inhibition occurred in a dose-dependent manner without causing cell toxicity. The EtOAc fraction also inhibited the production of PGE₂, IL-1 β , IL-6 and expression of iNOS, COX-2 protein in dose-dependent manner. From the phytochemical study to isolate the active constituents, five known compounds were identified, which are ursolic acid (1), prunasin (2), methyl *p*-coumarate (3), kaempferol (4), astragalinal (5). All of the compounds 1 - 5 were isolated for the first time from the *P. pendula*. Among the isolates, the flavonoids 4 and 5 were verified to inhibit NO production with high efficiency. These results suggested that extract of *P. pendula* leaves could be useful as anti-inflammatory agents in pharmaceutical or cosmetic applications.

Keywords: *Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi, nitric oxide production, RAW 264.7, anti-inflammatory

[†] 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)
call: 064)754-3548

1. 서 론

염증반응은 바이러스나 박테리아와 같은 병원균의 침입을 인지한 면역세포가 생체를 보호하기 위해 일어나는 방어 기전 중의 하나로, 일반적인 상태에서는 초기상태가 지난 후 정상으로 돌아오지만 염증을 일으키는 인자들이 없어지지 않거나 반응이 심화되면 정상세포와 조직 등에 손상을 입혀 만성 염증질환이나 자가 면역질환의 원인이 된다[1]. 대식세포(macrophage)는 염증반응에 관여하는 주요 세포로, 동물 체내 모든 조직에 분포하며 체내에서 선천적으로 면역반응을 담당한다[2]. 대식세포가 염증 유발물질인 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 자극 받게 되면 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 전염증성 cytokine과 같은 염증 매개체들의 분비를 촉진시키며, 이들은 leukotriene, prostaglandin 및 nitric oxide (NO)를 생성시키면서 염증 반응에 관여한다[3]. 따라서 iNOS, COX-2와 같은 효소의 작용을 저해시키거나 염증 매개체들의 분비를 억제시키는 물질들은 염증성 질환을 치료하는 항염증제로써의 개발 가능성이 높다고 할 수 있으며, 이러한 항염증 소재들은 피부 자극 완화에 도움을 주어 여드름 및 아토피 등을 완화하는데 도움을 줄 수 있다[4].

올벳나무(*Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽교목으로, 꽃이 잎보다 먼저 필과 동시에 다른 벳나무보다 일찍 꽃이 피므로 올벳나무라 한다. 높이가 10 m에 달하며 가지가 가늘고 잎과 더불어 잔털이 있으며 꽃은 암술대에는 털이 없으나 꽃받침통의 밑 부분에 털이 있고 산형상으로 달리는 것이 특징이다[5]. 벳나무 속 식물들은 예로부터 항염증 작용, 항고지혈증 및 항암 활성과 같은 생리활성이 있어 민간 요법에 사용되어 왔다[6]. 최근 산벳나무의 잎, 가지 및 수피 추출물에 대한 우수한 항염, 항균 및 미백 효과[7-9] 등이 보고되면서 벳나무의 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성이 높아졌다. 그러나 아직까지 벳나무 속 식물의 활성 연구는 왕벳나무(*Prunus yedoensis* Matsum) 및 산벳나무(*Prunus sargentii* Rehder)가 주를 이루고 있으며, 올벳나무의 경우 잎 추출물에 대한 항산화 활성만이 보고되었고[10], 그 외의 생리활성 및 유효 성분에 대해서는 알려지지 않았다.

이에 본 연구에서는 올벳나무 잎 추출물을 이용하여 유효 성분 연구 및 LPS로 자극시킨 대식세포에서의 NO 생성 억제 활성, prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성과 염증과 관련된 단백질 발현에 미치는 효

과에 대해 확인함으로써 항염증 활성을 갖는 천연 소재로서 활용 가능성을 알아보고자 연구를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

실험에 사용된 올벳나무 잎(시료번호 : 485)은 2017년 9월 제주생물자원주에서 구입하여 사용하였다. 구입한 올벳나무 잎은 동결 건조 후 분쇄하여 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck (Germany), 대정화금(Korea) 및 OCI (Korea)의 제품을 사용하였다. 화합물 분리를 위한 column chromatography에는 silica gel (2 - 25 μ m, Sigma Co., USA), Sephadex™ LH-20 (25 - 100 μ m, GE Healthcare Life Sciences, USA)을 사용하였다. 분리된 화합물들을 구조 분석하기 위해 nuclear magnetic resonance (NMR)는 FT-NMR system (JNM-ECX 400, JEOL, Japan), 용매는 CIL (USA)와 Merck사의 NMR 전용 용매를 사용하였다.

2.3. 추출 및 화합물의 분리

건조 및 분쇄된 올벳나무 잎 640.6 g을 70% 에탄올 9.0 L에 침적하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 여액만 취하였으며, 얻어진 여액은 37 - 40 °C의 수욕상에서 농축하여 추출물 339.0 g (52.9%)을 얻었다. 얻어진 추출물 50.0 g을 증류수에 현탁시키고, 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex, 5.4 g), ethyl acetate (EtOAc, 11.0 g), *n*-butanol (BuOH, 11.2 g), 물(Water, 19.2 g) 분획물을 얻었다. 얻어진 분획물 중 EtOAc 분획물 5.0 g을 세분화하기 위하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였으며, *n*-Hex-EtOAc (0 ~ 100%), EtOAc - MeOH (0 ~ 100%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1 - V32). Fr. V9 (40.6 mg)는 compound 1으로 확인되었으며, Fr. V23 (836.3 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼 (H₂O : MeOH = 1 : 1)을 수행하여 compound 2 (130.6 mg), compound 3 (13.6 mg), 및 compound 4 (143.9 mg)를 분리하였고, Fr. V24 (770.4 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼 (H₂O : MeOH = 1 : 1)을 수행하여 compound 5 (158.0 mg)를 얻었다.

2.4. 세포배양 및 독성 평가

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받아 penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) 및 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였으며, 2 - 3일 간격으로 계대 배양하였다. 세포독성 평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하였다. RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1.5 × 10⁵ cells/well로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 동안 전배양한 후, 0.1 µg/mL lipopolysaccharide (LPS)가 포함된 배지로 교환하고 sample을 각각 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37 °C에서 3 h 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 생존세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 DMSO로 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률(%)을 계산하였다.

2.5. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 cell (1.5 × 10⁵ cells/mL)을 24 well plate에 전배양한 후, 0.1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환하고 sample을 각각 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100 µL와 Griess reagent 100 µL를 혼합하여 10 min 동안 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였으며, 표준물질은 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용하여 표준검정곡선을 통해 정량하였다.

2.6. PGE₂ 및 전염증성 Cytokine 생성 억제 활성 측정

전배양한 세포(1.5 × 10⁵ cells/mL)에 0.1 µg/mL LPS와 농도별로 제조한 sample을 처리하여 24 h 배양한 뒤 세포 배양액을 취하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine의 생성 함량을 각각 PGE₂ (R&D systems, USA), TNF-α (Life technologies corp., USA), IL-1β (R&D systems, USA) 및 IL-6 (Thermo Fisher scientific, Austria) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 정량하였다.

2.7. Western Blot을 통한 단백질 발현 측정

60Φ culture dish에 2 × 10⁵ cells/dish로 세포를 분주하고 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. LPS (1 µg/mL)가 포함된

배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 차가운 PBS로 세척한 후 RIPA buffer (Sigma, USA)를 이용하여 4 °C 조건에서 overnight하여 용해 시켰으며, 원심분리(15,000 rpm, 20 min, 4°C)로 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약(BIO-RAD, USA)으로 정량해 Western blot용 sample을 만들어 사용하였다. 전기영동 기기를 이용해 정량한 sample을 8 ~ 12%의 SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 크기별로 분리한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 이후 5% skim milk를 포함한 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 90 min blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1 : 1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), COX-2 antibody (1 : 1000 BD Biosciences, USA), 및 β-actin antibody (1 : 20000, Sigma, USA)를 이용하여 4 °C 조건에서 overnight하여 붙인 후, TTBS 용액으로 5회 세척하고 peroxidase-conjugated 2차 항체(1 : 5000 또는 1 : 20000, Santa Cruz, USA)와 상온에서 1 h 반응 시킨 뒤, TTBS 용액으로 5회 세척하였다. 단백질은 WESTA NOVA 2.0 (Cyanagen, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, Vilber Lourmat, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 확인하였다.

2.8. 통계처리

본 실험의 결과는 3회 반복 실험하여 측정된 값을 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 Excel software (version 2007, Microsoft Corp., USA) 프로그램으로 student's t-test를 실시해 통계처리 하였고, 대조군과 실험군 사이의 차이는 95% 수준에서 유의성이 있는 것으로 판단하였다; * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01.

3. 결과 및 고찰

LPS는 면역세포를 자극하여 NO synthase (NOS)의 작용에 의해 L-arginine으로부터 NO 생성을 증가시킨다. 과도하게 생성된 NO는 만성 염증에 관여하며 유전자 변이, 조직과 신경 손상을 유발한다[11]. 올벚나무 잎 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위하여 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 LPS로 자극하여 유도된 NO 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성을 측정하였다. 올벚나무 잎은

70% 에탄올 수용액을 이용하여 추출한 후, 얻어진 추출물을 용매 극성 순서에 따라 분획하여 *n*-hexane (Hex, 2.7%), ethyl acetate (EtOAc, 22.0%), *n*-butanol (BuOH, 22.4%), water (38.4%) 분획물을 얻었다. 추출물 및 분획물에 대해 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 NO생성량을 측정된 결과, EtOAc 분획물이 세포 독성 없이 76.3%의 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 1A). 추가적으로 EtOAc 분획물에 대해 6.25 - 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위로 실험을 진행했으며 그 결과 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰고 IC₅₀ 값은 31.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Figure 1B).

NO 생성 억제 효과를 나타낸 올벚나무 잎 EtOAc 분획물의 항염 활성 기전 연구를 위해 sandwich ELISA kit를 이용하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 효과를 측정하였다. 그 결과, 올벚나무 잎 EtOAc 분획물은 TNF- α 의 생성을 억제하는데 효과가 미미한 반면, PGE₂, IL-1 β 및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다(Figure 2).

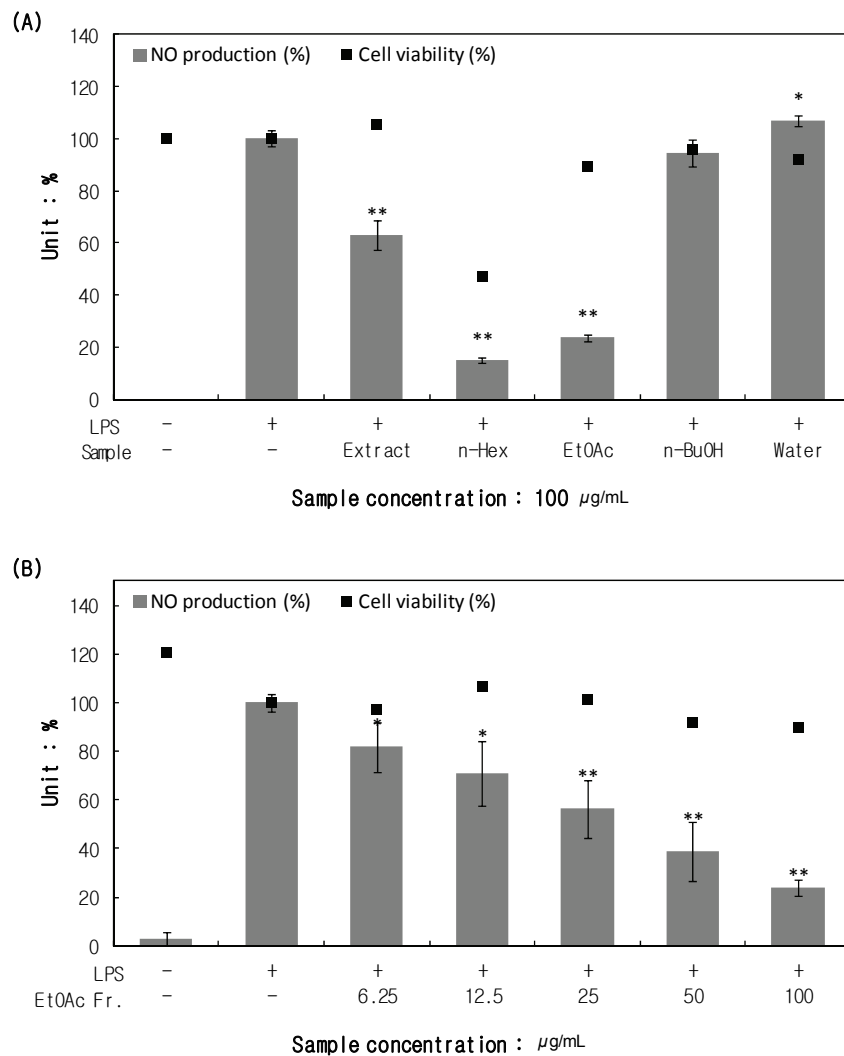


Figure 1. Effects of extract, solvent fractions (A) and EtOAc fraction (B) from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The results were expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

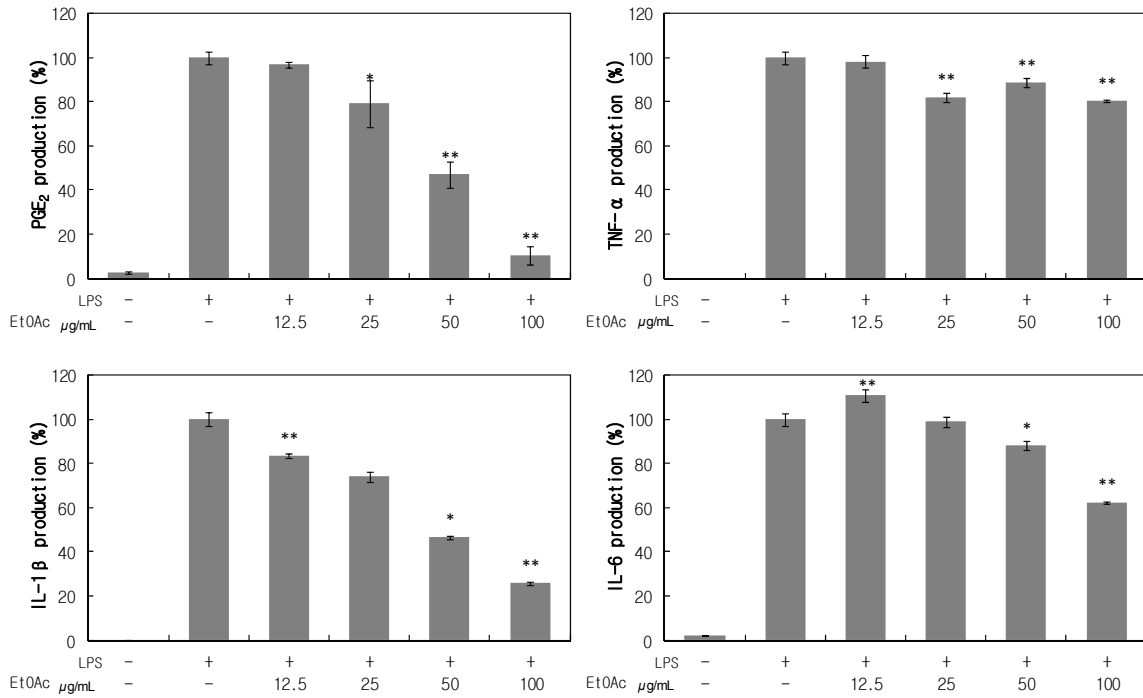


Figure 2. Effects of EtOAc fraction from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on production of PGE₂, TNF-α, IL-1β, and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The results were expressed as the mean ± SD of triplicate experiments; **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

iNOS는 면역 세포의 자극으로 생성되는 물질로 NO의 생성에 관여하는 NOS 효소 중 하나로서, iNOS가 외부 자극이나 전염증성 cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 다량의 NO가 생성되게 된다[12]. 또한 COX-2는 PGE₂를 형성시켜 염증반응과 면역반응 등에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다[13]. 염증반응과 밀접한 연관이 있는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 측정한 결과, 올벚나무 잎 EtOAc 분획물이 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 농도의존적으로 저해시키는 것으로 확인하였고, 이는 NO 및 PGE₂의 생성이 억제되는 것과 같은 경향으로 나타남을 확인할 수 있

었다(Figure 3).

항염 효과가 우수했던 올벚나무 잎 EtOAc 분획물에 대하여 column chromatography를 수행하여 5개의 화합물을 분리하였으며, NMR분석을 통해 화합물의 구조를 확인하였다.

Compound 1은 30개의 carbon 피크와 7개의 methyl group을 포함하는 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene구조일 것이라 예상하였으며, δ_c 180.4의 피크로 1개의 carbonyl group 과 δ_c 139.7 및 126.1의 피크를 통해 분자 내에 1개의 이중결합 구조가 관측되었다. δ_c 78.6의

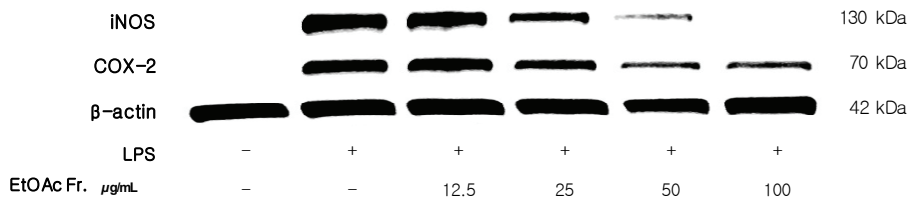


Figure 3. Effects of EtOAc fraction from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on the levels of iNOS and COX-2 protein. The iNOS or COX-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin.

deshielding 된 sp^3 carbon 피크를 통해 산소가 인접해 있음을 예상할 수 있었으며, 문헌[14]을 통해 ursolic acid (3 β -hydroxy-12-ursen-28-oic acid)임을 확인하였다(Figure 4). Compound 2는 δ_H 7.59 (2H, m), δ_H 7.46 (3H, m), 및 δ_C 135.0, 131.1, 130.3, 129.1의 피크를 통해 대칭구조의 aromatic ring이 있음을 예상하였으며, 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_H 4.24 (1H, d, $J = 7.3$ Hz) 및 δ_C 102.0, 75.5, 77.9, 74.8, 71.6, 62.9의 6개의 피크를 통해 육탄당이 결합되어 있는 것을 예상하였다. δ_C 119.5의 피크는 DEPT를 통해 4차 carbon임을 확인하였으며, 문헌[15]을 통해 질소와 삼중 결합을 하고 있는 carbon임을 예상하였고, 이들을 바탕으로 문헌[16]과 비교하여 prunasin임을 확인하였다(Figure 5). Compound 3은 총 8개의 carbon 피크 중 δ_C 168.4의 ester group과 δ_C 51.7의 methoxy group이 관찰되었다. δ_H 7.39 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 및 δ_H 6.81 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 적분값과 coupling constant 값을 통해 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring과 δ_H 7.61 (1H, d, $J = 16.0$ Hz) 및 δ_H 6.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)의 피크를 통해 *trans* form의 이중결합이 있음을 예상하였으며, 문헌[17]을 통하여 methyl *p*-coumarate로 확인하였다(Figure 6). Compound 4

합을 하고 있는 carbon임을 예상하였고, 이들을 바탕으로 문헌[16]과 비교하여 prunasin임을 확인하였다(Figure 5). Compound 3은 총 8개의 carbon 피크 중 δ_C 168.4의 ester group과 δ_C 51.7의 methoxy group이 관찰되었다. δ_H 7.39 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 및 δ_H 6.81 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 적분값과 coupling constant 값을 통해 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring과 δ_H 7.61 (1H, d, $J = 16.0$ Hz) 및 δ_H 6.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)의 피크를 통해 *trans* form의 이중결합이 있음을 예상하였으며, 문헌[17]을 통하여 methyl *p*-coumarate로 확인하였다(Figure 6). Compound 4

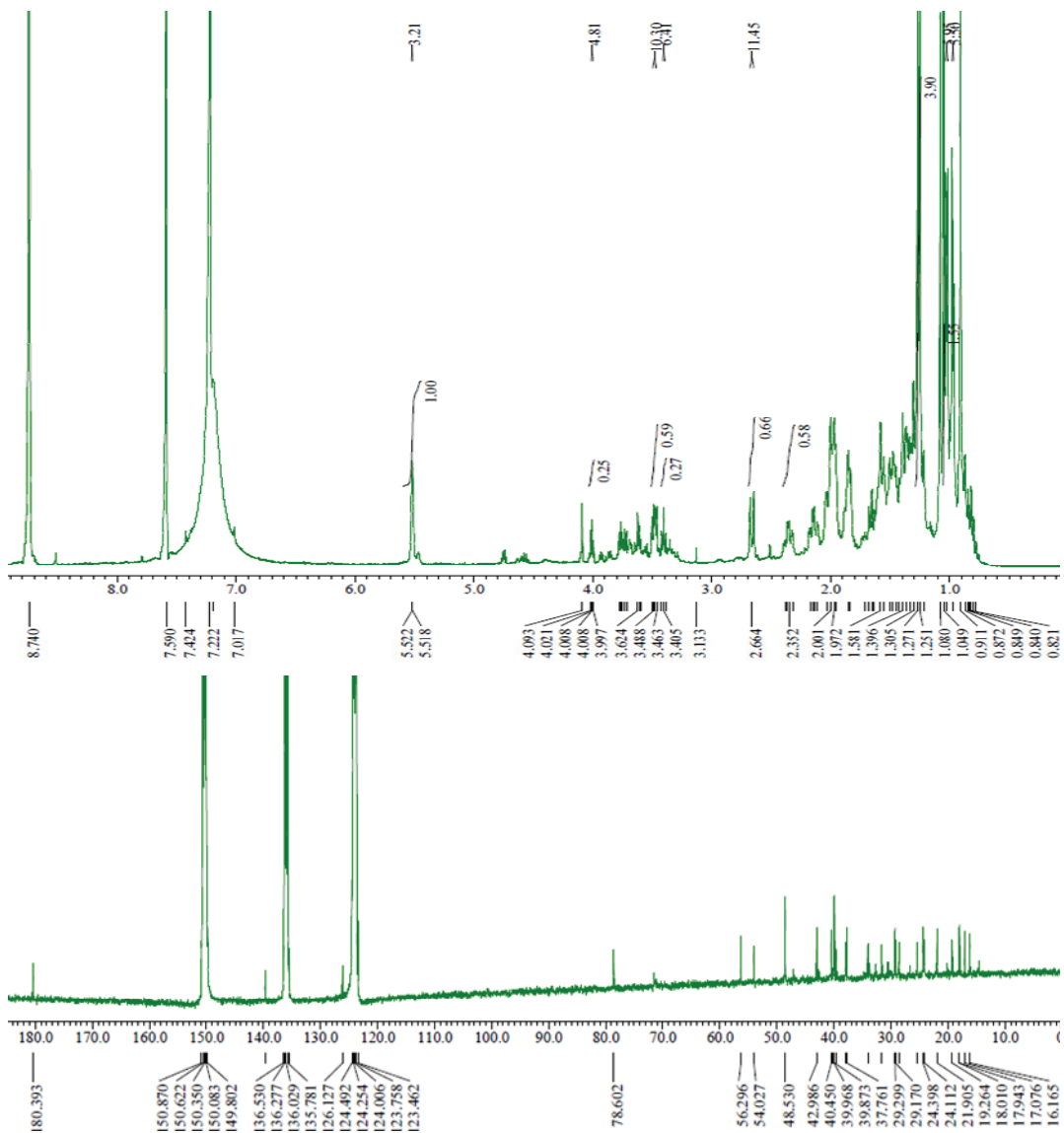


Figure 4. ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound 1 (400 and 100 MHz, $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$).

는 ^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 2개의 피크를 포함하여 총 15개의 carbon 피크가 관찰되었고, δ_{H} 8.06 (1H, d, $J = 8.7$ Hz) 및 δ_{H} 6.89 (1H, d, $J = 8.7$ Hz)의 피크를 통해 B-ring의 대칭구조를 가지고 있는 flavonoid 구조일 것이라 예상하였으며, 문헌[18]을 통해 kaempferol임을 확인하였다 (Figure 7). Compound 5는 δ_{H} 5.25 (1H, d, $J = 7.3$ Hz)에 나타난 당의 anomeric proton 및 compound 4와 유사한 carbon 피크들을 통해 문헌[19]과 비교하여 astragalin (kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside)임을 확인하였다(Figure 8).

분리된 화합물 중 ursolic acid (1)는 피부암 및 간암세포에 대한 항종양 및 세포자살 효과가 있는 것으로 알려져 있으며[20,21], prunasin (2)은 식물의 열매, 잎, 뿌리 등에 존재하는 시안배당체로[22], 항골다공증 효과에 대한 연구가 보고되었다[23]. Methyl *p*-coumarate (3)는 식물 세포벽에 존재하는 *p*-coumaric acid의 에스터 유도체로서, 항진균[24], 항산화[25] 및 멜라닌 생성 억제 효과[26]가 있는 것으로 알려져 있으며, kaempferol (4)과 배당체인 astragalin (5)은 피부 투과 개선, 세포 보호[28] 및 항염 효과[28] 등이 보고된 바 있다.

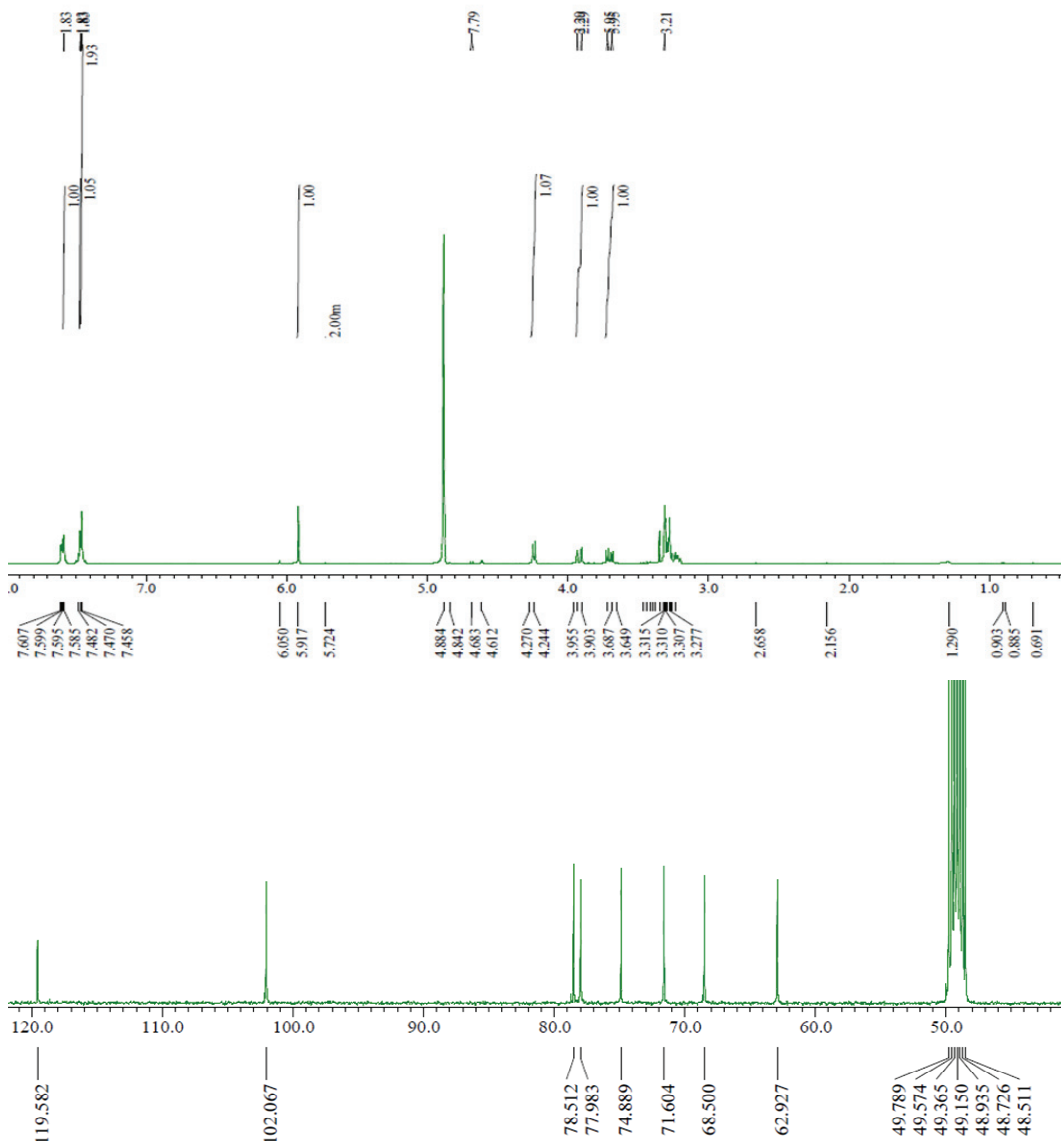


Figure 5. ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound 2 (400 and 100 MHz, CD_3OD).

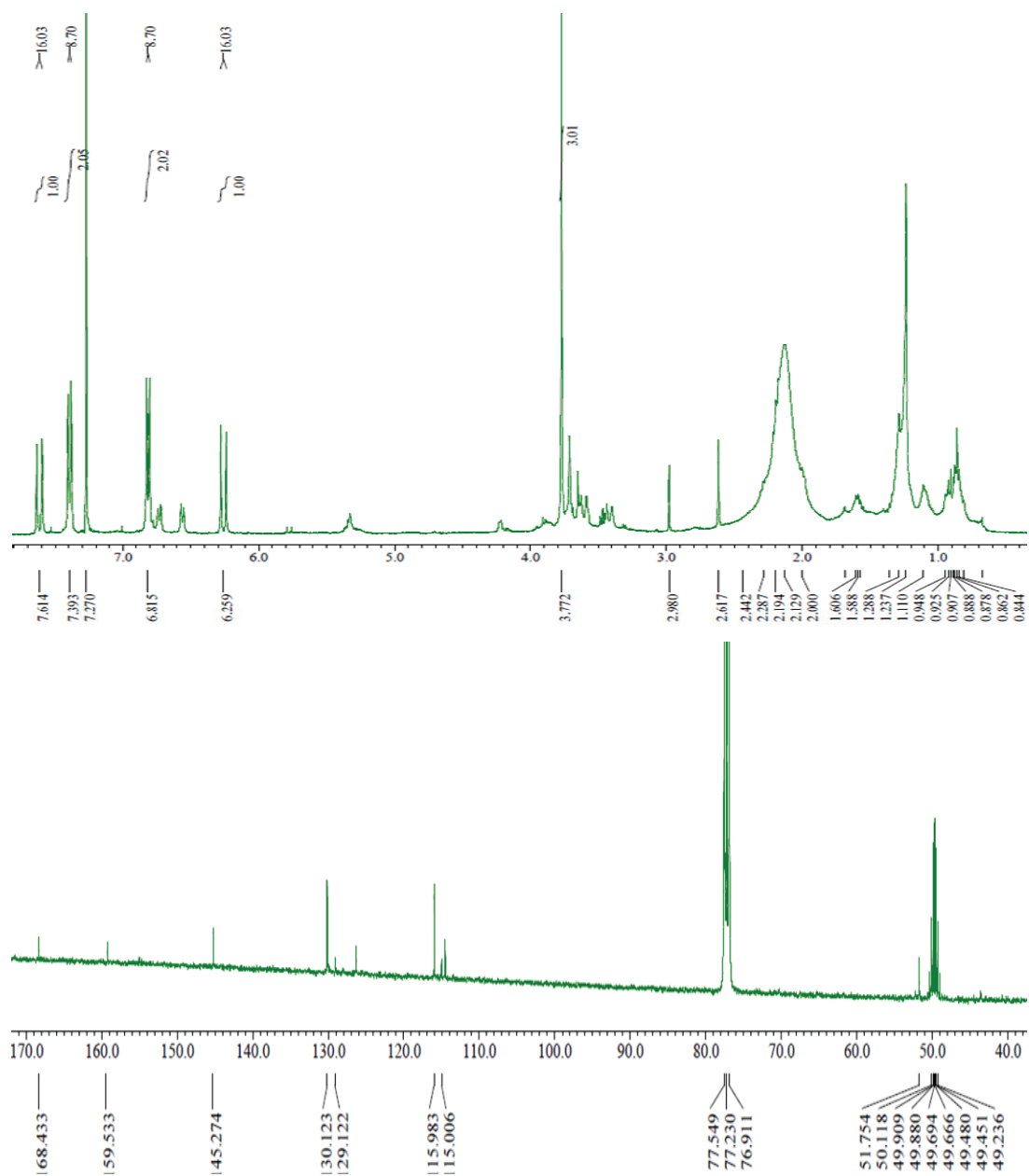


Figure 6. ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound 3 (400 and 100 MHz, CDCl_3).

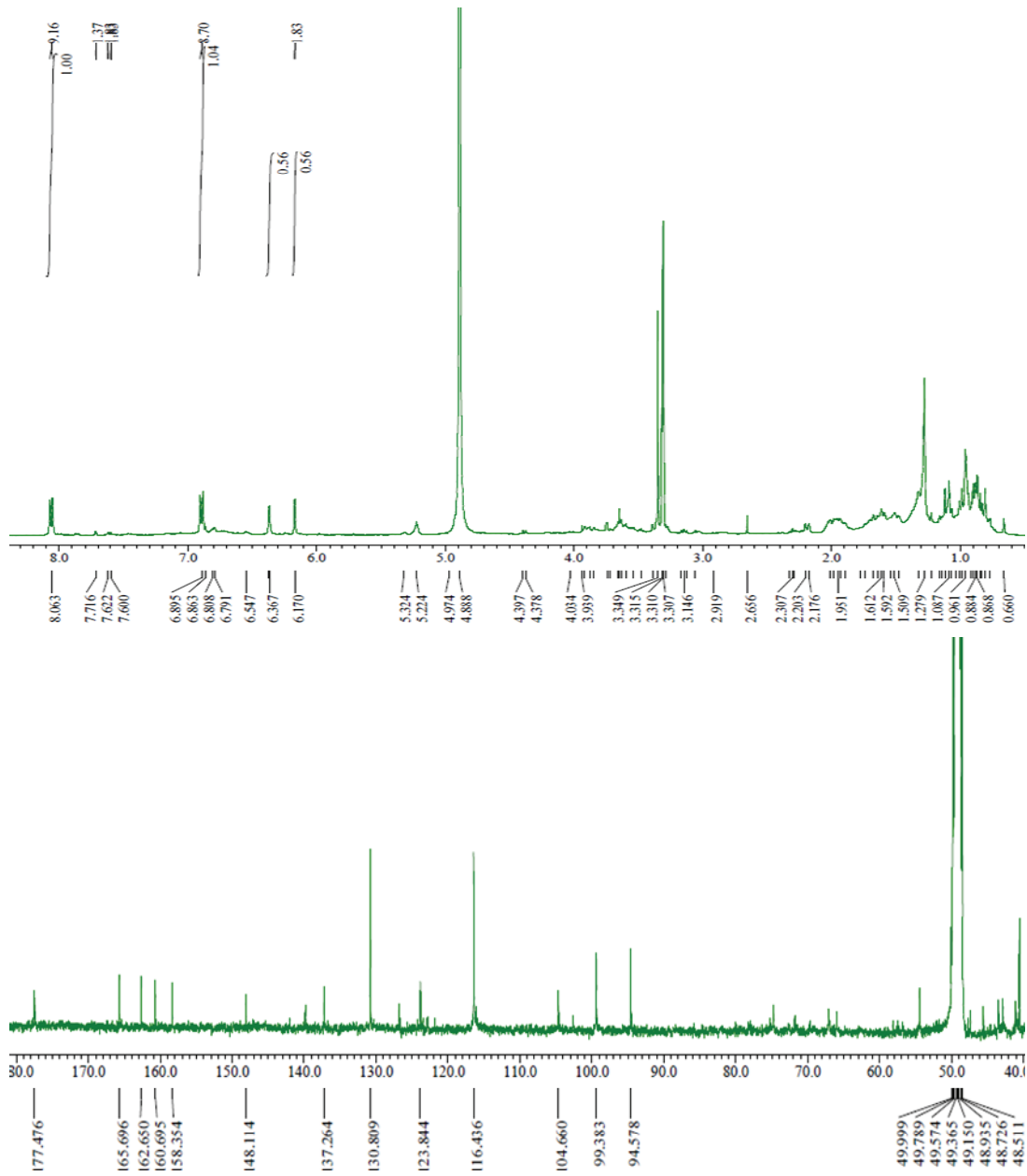


Figure 7. ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound 4 (400 and 100 MHz, CD_3OD).

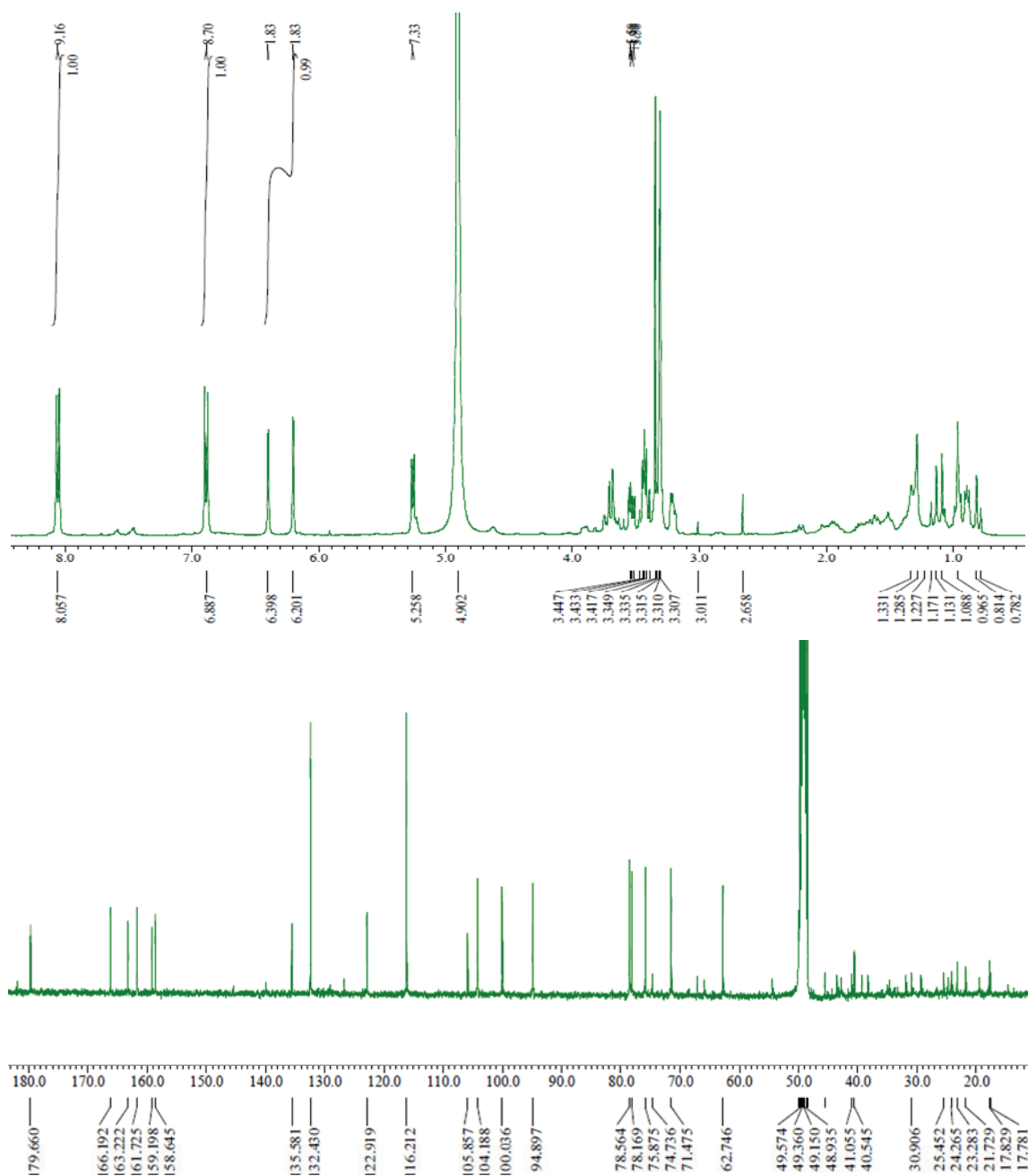


Figure 8. ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound **5** (400 and 100 MHz, CD_3OD).

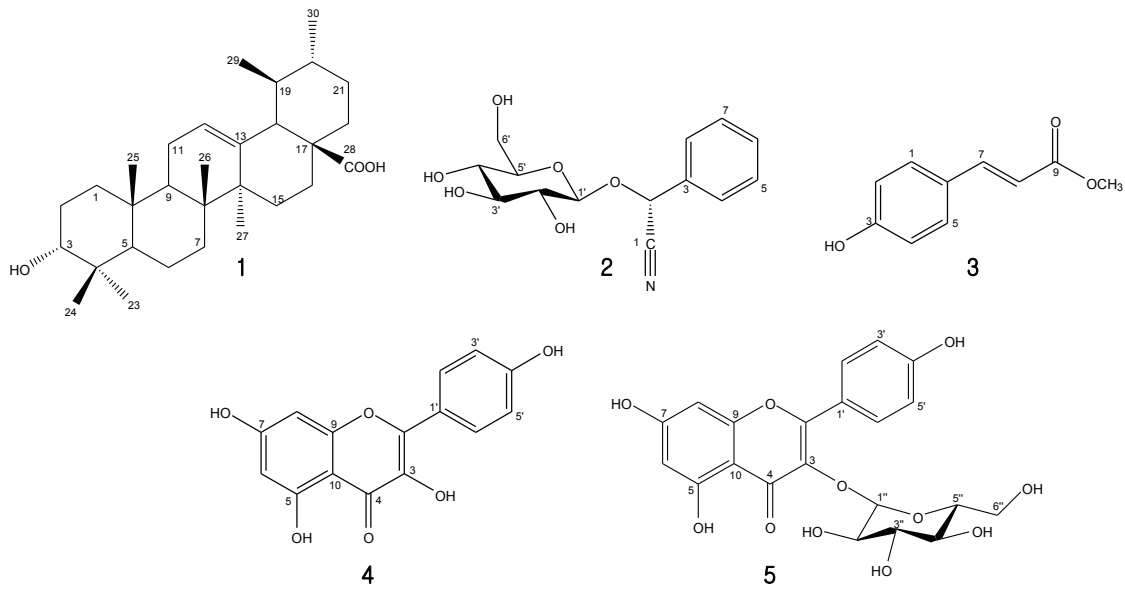


Figure 9. Chemical structures of compounds 1 - 5 isolated from *P. pendula* for. *ascendens* leaves.

올벚나무 잎으로부터 분리된 화합물에 대한 항염 활성을 측정하기 위해 NO 생성 억제 활성 및 세포독성을 확인하였다. 100 μ M 농도로 실험을 진행한 결과, compound 4 및 5가 세포독성 없이 약 47.5, 41.9%로 NO의 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 10). Kaempferol (4)과 astragaloside (5)은 염증 매개인자인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제함으로써 항염 효과를 나타낸다는 연구결과가

보고되어 있다[29,30]. 따라서 추가적인 기전연구는 진행하지 않았으며, 올벚나무 잎EtOAc 분획물에 flavonoid 화합물, 특히 astragaloside(5)이 다량 함유되어 있음을 본 연구를 통해 확인하였고, 이로 인해 EtOAc 분획물이 다른 분획물에 비해 높은 항염 활성을 나타내는 것이라 판단된다.

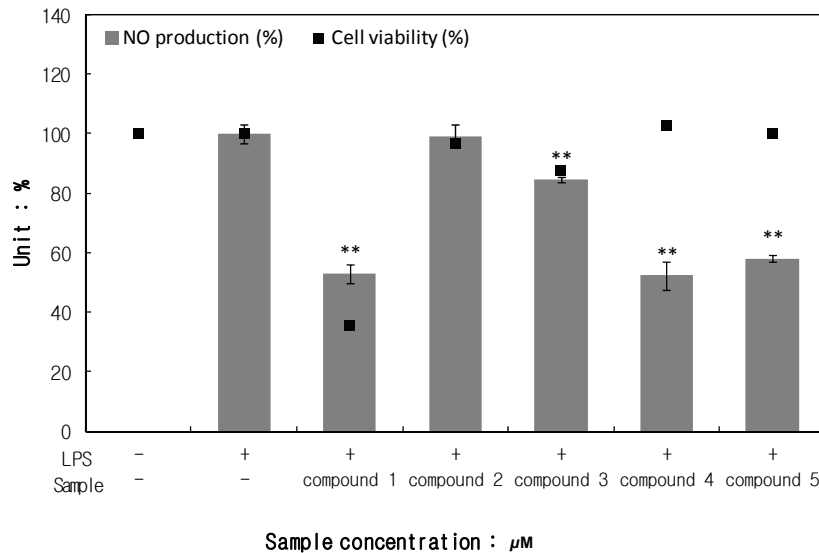


Figure 10. Effects of isolated compounds 1 - 5 *P. pendula* for. *ascendens* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The results were expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments; * p < 0.05, ** p < 0.01.

4. 결 론

올벚나무 잎 추출물의 항염증 효과 및 유효 성분을 확인하고자 본 연구를 진행하였다. 올벚나무 잎으로부터 70% 에탄올 추출물 및 용매 분획물(*n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, water)을 얻었고, 추출물 및 분획물에 대한 항염 활성 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물이 세포독성 없이 농도의존적으로 NO 생성을 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이를 통하여 올벚나무 잎 EtOAc 분획물이 나타내는 항염 활성에 대한 추가적인 기전 연구를 진행하였으며, Western blot 분석법을 통해 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 또한 ELISA를 통해 PGE₂ 및 전염증성 cytokine인 IL-1 β 과 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였고, PGE₂ 생성 억제 기전에 영향을 미치는 COX-2 단백질 발현이 올벚나무 잎 EtOAc 분획물에 의해 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 EtOAc 분획물의 활성 성분을 찾고자 column chromatography를 수행하여 5개의 화합물을 분리·동정하였으며, ursolic acid (1), prunasin (2), methyl *p*-coumarate (3), kaempferol (4), astragaloside (5)로 확인되었다. 분리된 화합물의 항염 활성 실험 결과, compound 4와 5가 NO 생성을 억제하고 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 플라보노이드를 포함하는 올벚나무 잎 추출물이 항염 효과를 갖는 천연 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2018학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

Reference

1. Y. I. Yoon, M. Y. Chung, J. S. Hwang, T. W. Goo, M. Y. Ahn, Y. B. Lee, M. S. Han, and E. Y. Yun, Anti-inflammatory effect of *Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract in LPS-induced RAW 264.7 cells, *J. Life Sci.*, **24**(2), 370 (2014).
2. C. S. Eun, E. Y. Hwang, S. O. Lee, S. A. Yang, and M. H. Yu, Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of barley sprout extract, *J. Life Sci.*, **26**(5), 537 (2016).
3. H. N. Ko, J. M. Kang, H. M. Kim, J. H. Han, and N. H. Lee, Anti-inflammatory constituents from the branches of *Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **38**(7), 711 (2017).
4. Y. B. Kwon, B. S. Yoo, D. S. Kim, S. J. Moon, M. S. Yoon, and S. N. Park, Anti inflammatory activity of *Viburnum dilatatum* Thunb. Extract as cosmetic ingredient, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **36**(3), 183 (2010).
5. Y. N. Lee, Flora of Korea, Kyohak Publishin Co., Seoul, Korea (1996).
6. H. A. Jung, Ph.D Dissertation, Pukyong National Univ., Busan, Korea (2003).
7. S. A. Yang, B. S. Pyo, S. M. Kim, and K. I. Lee, Antibacterial activity and nitric oxide production inhibitory activity of the extract and its fractions from the leaves of *Prunus sargentii*, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **20**(5), 308 (2012).
8. K. I. Lee, S. A. Yang, B. S. Pyo, and S. M. Kim, Antibacterial activity against pathogens of acne and tyrosinase inhibitory activity of extract and fractions from bark of *Prunus sargentii*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **42**(2), 155 (2011).
9. J. M. Park, J. Y. Lee, t. S. Park, S. J. Hyun, H. H. Kim, Y. J. Cho, O. J. Kwon, A. R. Son, D. S. Kim, and B. J. An, A study on the cosmeceutical activities of *Prunus sargentii* R., *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **51**(1), 70 (2008).
10. H. A. Jung, A. R. Kim, H. Y. Chung, and J. S. Choi, *In vitro* antioxidant activity of some selected *Prunus* Species in Korea, *Arch. Pharm. Res.*, **25**(6), 865 (2002).
11. E. J. Hong, H. J. Park, N. H. Kim, J. B. Jo, J. E. Lee, S. B. Lim, D. H. Ahn, H. Y. Jung, and Y. J. Cho, Inhibitory effect of *Hypericum ascyron* on pro-inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced Raw 264.7 Cells, *J. Appl. Biol. Chem.*, **60**(4), 363 (2017).
12. M. J. Bak, J. H. Jeon, H. S. Kang, K. S. Jin, S. Ok, and W. S. Jeong, *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2

- via MAPK signalling pathways in RAW 264.7 cells, *J. Food Sci. Nutr.*, **14**, 269 (2009).
13. S. H. Park, H. J. Jeong, B. J. Park, and T. H. Jeong, Anti-inflammatory effect of *Fallopia sachalinensis* RoncesDecr. fruit, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(3), 237 (2015).
 14. J. E. Kim, Ph. D. Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2016).
 15. P. Crews, J. Rodriguez, and M. Jaspars, Organic structure analysis, 92, Oxford University Press, New York (2009).
 16. H. H. Leem, E. O. Kim, M. J. Seo, and S. W. Choi, Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb), *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, **40**(10), 1361 (2011).
 17. S. Galland, N. Mora, M. Abert-vian, N. Rakotomanomana, O. Dangles, Chemical synthesis of hydroxycinnamic acid glucosides and evaluation of their ability to stabilize natural colors via anthocyanin copigmentation, *J. Agric. Food Chem.*, **55**(18), 7573 (2007).
 18. S. J. Kim, J. H. Park, S.Y. Choi, K. H. Son, and K. U. Kim, Isolated and identification of biological activity compounds from leaves and stem of *Peaonia lactiflora* pallas, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **15**(1), 6 (2007)
 19. M. Y. Moon, Master's Thesis Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2008).
 20. P. O. Harmand, R. Duval, C. Delage, and A. Simon, Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells, *Int. J. Cancer*, **114**(1), 1 (2005).
 21. S. L. Yan, C. Y. Huang, S. T. Wu, and M. C. Yin, Oleanolic acid and ursolic acid induces apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicol In Vitro*, **24**(3), 842 (2010).
 22. F. Dicenta, P. Martinez-Gomez, N. Grane, M. L. Martín, A. Leon, J. A. Canovas, and V. Berengure, Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of sweet and bitter kernelled almonds, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(7), 2149 (2002).
 23. X. T. Yan, S. H. Lee, W. Li, Y. N. Sun, S. Y. Yang, H. D. Jang, and Y. H. Kim, Evaluation of the antioxidant and anti-osteoporosis activities of chemical constituents of the fruits of *Prunus mume*, *Food Chem*, **156**, 408 (2014).
 24. A. B. Shaik, S. B. Ahil, R. Govardhanam, M. Senthil, R. Khan, R. Sojitra, S. Kumar, and A. Srinivas, Antifungal effect and protective role of ursolic acid and three phenolic derivatives in the management of sorghum grain mold under field conditions, *Chem. Biodivers.*, **13**(9), 1158 (2016).
 25. S. Sharma, P. Dogra, G. S. Chauhan, S. S. Kanwar, Synthesis of alkyl coumarate esters by celite-bound lipase of *Bacillus licheniformis* SCD11501, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **101**, 80 (2014).
 26. I. Kubo, K. Nihei, and K. Tsugimoto, Methyl *p-coumarate*, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells, *Bioorg. Med. Chem.*, **12**(20), 5349 (2004).
 27. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extract, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**(2), 680 (2012).
 28. K. P. Devi, D. S. Malar, S. F. Nabavi, A. Sureda, J. Xiao, S. M. Nabavi, M. Daglia, Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine, *Pharmacol. Res.*, **99**, 1 (2015).
 29. Y. C. Liang, Y. T. Huang, S. H. Tsai, S. Y. Lin-Shiau, C. F. Chen, and J. K. Lin, Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophage, *Carcinogenesis*, **20**(10), 1945 (1999).
 30. M. S. Kim, and S. H. Kim, Inhibitory effects of astragaloside on expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators through NF- κ B in macrophages, *Arch. Pharm. Res.*, **34**(12), 2101 (2011).