

열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니(*Quercus infectoria* Olivier)의 생리활성 비교연구

이해진¹ · 김동한² · 이은진³ · 임미혜^{1†}

^{1†}대전대학교 뷰티건강관리학과, 교수

²주내물산

³주식회사 마티유

(2019년 12월 30일 접수: 2020년 2월 27일 수정: 2020년 2월 28일 채택)

Comparative Study of the Biological Activity Effects of Manjakani (*Quercus infectoria* Olivier) Extract using Water and 80% Ethanol

Hea-Jin Lee¹ · Dong-Han, Kim² · Eun-Jin, Lee³ · Mi-Hye Lim^{1†}

^{1†}Department of Beauty Healthcare, Daejeon University

²Joonae Coporation

³Matieu Co. Ltd.

(Received December 30, 2019; Revised February 27, 2020; Accepted February 28, 2020)

요 약 : 본 연구는 만자카니(*Quercus infectoria* Olivier)의 항염증과 같은 생리활성에 대해 실험하였다. 만자카니는 열수(MDE)와 80% 에탄올(MEE)로 추출하였으며, MTT assay로 세포독성을 측정하였다. 항염증 활성을 위하여 nitric oxide (NO), prostaglandon E₂ (PGE₂) 및 leukotrien B₄ (LTB₄)의 생성을 측정하였으며, 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 tumor necrosis factor (TNF- α)) 생성 및 전사인자의 발현을 측정 하였다. 그 결과 본 연구 농도범위인 1, 5, 10 μ g/ml에서 유의한 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인 하였다. 각 시료의 10 μ g/ml 농도에서 NO의 경우 MDE 37.2%, MEE 43.7%, PGE₂의 경우 MDE 30.9%, MEE 43.7%, LTB₄의 경우 MDE 37.1%, MEE 43.7% 감소되는 것을 확인하였다. 염증성 사이토카인의 경우 각 시료의 10 μ g/ml 농도에서 IL-1 β 는 MDE 38.8%로 MEE 50.8%, IL-6는 MDE 35.0%, MEE 44.2%, TNF- α 는 MDE 31.9%, MEE 36.6% 감소되었다. 또한 전사인자의 경우 NF- κ B는 MDE 44.0%, MEE 16.0%, iNOS는 MDE 44.0%, MEE 55.0%, COX-2는 MDE 45.0%, MEE 40.0% 감소되었다. 추출물 모두 항염증 활성에 효과가 있었으나 상대적으로 MEE가 염증성 인자의 감소 효능이 높은 것으로 확인 되었다. 결과적으로 만자카니의 열수 및 에탄올 추출물 모두 항염증 효능이 확인 되었으며 상대적으로 MEE의 효능이 더 높은 것으로 나타났다. 객관적으로 유의한 효능을 나타냈으므로 향후 염증으로 인한 피부 손상 나아가 염증관련 질환을 개선하는 제품의 유용한 소재로써 응용 가능할 것으로 사료된다.

주제어 : 만자카니, 세포독성, 항염증, 생리활성, 천연원료

[†]Corresponding author

(E-mail: beautyleem@naver.com)

Abstract : The purpose of this study was to investigate the biological activities such as cytotoxicity and anti-inflammation using Manjakani (*Quercus infectoria* Olivier) extract. Manjakani was extracted from hot DW and 80% ethanol. Cell viability was assessed using MTT assay on RAW 264.7 cells. Also, anti-inflammatory activities were measured through changes in the levels of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), leukotrien B₄ (LTB₄), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α) and transcription factor on LPS-induced RAW264.7 cells. The results confirmed that significant cytotoxicity does not appear in the concentration range of 1, 5, and 10 μ g/ml of both extracts of this study. The production of NO was slowed by approximately MDE 37.2% and MEE 43.7% at 10 μ g/ml concentration. Also, level of PGE₂ and LTB₄ was decreased MDE 30.9%/MEE 43.7% and MDE 37.1%/MEE 43.7%. In the case of inflammatory cytokine was reduced to MDE 38.8%/MEE 50.8% for IL-1 β , MDE 35.0%/MEE 44.2% for IL-6 and MDE 31.9%/MEE 36.6% for TNF- α at 10 μ g/ml concentration. The mRNA expression of NF- κ B, iNOS and COX-2 significantly decreased by MDE 44.0%/MEE 16.0%, MDE 44.0%/MEE 55.0% and MDE 45.0%/MEE 40.0%, respectively, following the 10 μ g/mL sample treatment when compared to the control. Both extracts were effective in anti-inflammatory activity. In addition, both extracts showed efficient changes of production of NO, PGE₂, LTB₄, pro-inflammatory cytokines and transcription factor. But MEE was found to have a higher inhibitory effect than MDE. In other words, Manjakani was showed significant biological activities showing anti-inflammation without cytotoxicity. These results will be provided as fundamental data for further development of the new health food and therapeutics related to the results above.

Keywords : Manjakani, cytotoxicity, anti-inflammation, biological activities, raw material

1. 서론

염증반응은 외부의 침입 또는 조직의 손상으로 부터 인체를 보호하기 위해 발생하는 중요한 면역반응이다. 그러나 염증반응이 장기적으로 지속 되면 동맥경화증, 천식, 류머티스관절염 및 위염 등과 같은 만성적 염증질환을 야기하게 되며 이는 다양한 염증인자(pro-inflammatory mediator)들의 복잡한 과정을 통해서 일어나게 된다[1]. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)는 염증성 질환을 일으키는 병인으로 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 와 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증인자를 전사시키는데 있어서 중요한 역할을 하며, 이 전사인자들은 nitric oxide (NO) 와 prostaglandins (PGs)라는 또 다른 염증인자를 생성시키는 것으로 잘 알려져 있고 각 염증인자들은 염증성 사이토카인의 생성을 증가시키게 된다[2]. 대식세포는 외부 병원체가 침입했을 경우 백혈구 보다 빠른 반응을 나타내는 세포로서 면역과 염증 반응에 매우 중요한 역할을 한다. Lipopolysaccharide (LPS)는 박테리아

성 내독소로 대식세포가 이를 감지하게 되면 iNOS, COX-2 및 다양한 염증성 사이토카인들을 생성하여 염증반응에 관여한다[3]. 즉 LPS 자극된 대식세포에서 생성된 염증성 인자들을 감소시키는 물질은 다양한 염증성 질환을 완화 시키고 치료하는 제품의 원료로써 유용하다고 간주되고 있으며, 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에서의 염증인자 감소효능에 대한 연구는 항염증 물질을 찾는 실험에 많이 사용되고 있다[4].

만자카니(Manjakani: *Quercus infectoria* Olivier)는 말레이시아에서 출산 후 자궁의 탄력을 회복시키고 질 근육의 수축을 자극하며 상처 감염을 치료하기 위해 전통적으로 사용되어져 왔다[5,6]. 인도에서는 치통 및 치염 등의 구강질환의 치료에 사용될 뿐만 아니라 치약의 성분으로도 활용되고 있으며[5], 설사, 이질, 내출혈, 임질, 편도선 염 등 염증질환 치료에 사용되어져 왔다[7]. 또한 약학적으로 항당뇨, 항균, 항바이러스, 항염증 및 상처치유에 도움이 된다고 보고되어져 있다[8,9]. 본 연구에서는 다양한 효능이 입증된 만자카니를 증류수와 에탄올로 각각 추출하여, 실

험에 앞서 세포독성평가를 수행하였으며, 항산화와 항염증 활성을 측정하였고 추출 용매에 따른 효능을 비교하였다. 본 연구에서는 결과를 바탕으로 다양한 제품의 원료로써 활용될 수 있는 가능성에 대해 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

사용된 시약은 dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME; Gibco BRL, USA), fetal bovine serum (FBS; Invitrogen USA), penicillin-streptomycin (Gibco, USA), WST solution (Daeillab sevice, Korea), lipopolysaccharide (LPS; Sigma, USA), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Welgene, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore, USA), PGE₂ Parameter Assay Kit (R&D systems Co., USA), LTB₄ Parameter Assay Kit (R&D systems, USA), Total RNA prep kit (Intronbio, Korea), AccuPower CycleScript RT PreMix (Bioneer, Korea), SYBR Green (Qiagen, Germany) 등을 사용하였다.

2.2. 만자카니 추출

본 연구에 사용한 만자카니는 대전대학교 뷰티건강관리학과로부터 전달받아 대전대학교 난치성면역질환 생명의학연구센터에서 정선 후, 사용하였다. 만자카니 20 g에 각각 증류수와 80% 에탄올을 500 ml씩 넣고 3시간 동안 환류추출 한 후, 여과액을 감압 농축한 후 동결 건조하였다. 증류수 추출물(Manjakani distilled water extract 이하, MDE)은 6.6 g (수율 20%), 에탄올 추출물(Manjakani ethanol extract 이하, MEE)은 11.1 g (수율 55.5%)의 분말을 획득하여 -80°C에서 보관하였으며, 증류수에 희석해 사용하였다.

2.3. 세포 배양 및 세포독성 측정

세포배양은 10% fetal bovine serum과 1% antibiotics를 함유한 Dulbecco's modified eagle's medium으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포독성 측정은 Lee et al. (2014)의 방법을 실험실 환경에 맞게 응용하여 측정하였다. RAW

264.7 세포(한국세포주은행, Korea)를 96 well plate에 2×10^4 cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후, MDE와 MEE를 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 다시 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μL 의 WST solution을 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후 micro plate reader (Molecular Devices, USA) 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

2.4. NO 생성량 측정

NO의 양은 Lee et al. (2014)의 방법을 실험실 환경에 맞게 응용하여 측정하였다. 96 well plate에 RAW264.7 세포를 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 시료와 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. Nitric oxide detection kit의 N1 buffer를 50 μL 씩 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응 한 후, N2 buffer를 50 μL 씩 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후, micro plate reader 540 nm 파장에서 흡광도를 측정한 뒤 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

2.5. 염증성 사이토카인 생성량

Cytokine의 생성량은 mouse cytokine milliplex map immunoassay kit를 사용하여 측정하였다. 12 well plate에 RAW264.7 세포를 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 시료와 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 25 μL 씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25 μL 씩 가하여 혼합한 후, 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후, 25 μL 의 detection antibody를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시키고 추가로 25 μL 의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후, PBS를 150 μL 넣고 5분 간 shaking한 후, Luminex (Millipore, USA)를 이용하여 측정하여 절대 값으로 나타내었다.

2.6. PGE₂ 와 LTB₄ 생성량 측정

PGE₂와 LTB₄의 생성량 측정을 위해 Lee et al. (2015)의 방법을 실험실 환경에 맞게 응용하여 측정하였다. 12 well plate에 RAW264.7 세포를 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 시료와 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 생성량은 PGE₂ parameter assay kit와 LTB₄ parameter assay kit를 사용하여 측정하였다. 배양액을 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 100 μl 씩 넣고 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응 후, washing buffer를 이용하여 3회 세척 작업을 진행한 후, 100 μl 의 detection antibody를 넣어 다시 37°C에서 60분간 반응시키고 세척하였다. 세척 후, HRP conjugate를 100 μl 씩 넣어 37°C에서 30분간 반응시키고 세척한 뒤 substrate reagent를 90 μl 씩 넣어 37°C에서 15분간 반응시키고 50 μl 의 stop solution을 추가하여 micro plate reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준으로 절대값으로 나타내었다.

2.7. 유전자 발현량 측정

유전자 발현량을 측정하기 위해 Kang et al. (2015)의 방법을 실험실 환경에 맞게 응용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 시료와 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. RAW264.7 세포는 배양액을 제거하고 세척과정을 거친 뒤 total RNA prep kit을 이용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 반응은 추

출한 RNA를 RT premix kit의 mixture를 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였으며, 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. RT-PCR은 DNA polymerase 1U/tube에 250 mM dNTPs mix, RT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2)를 포함한 mixture에 각 샘플과 primer를 넣고 PCR을 시행하였다. 사용된 primer는 Table 1과 같다. 1% agarose gel에 전기영동 후 유전자 발현의 여부를 UV로 촬영하여 band를 확인하였다. 유전자 발현량은 대조군에 비하여 계산하였으며, 사용된 primer의 sequence는 Table 1과 같다.

2.8. 통계처리

모든 실험결과는 3회 반복 측정하였으며 평균 값 ± 표준편차(mean ± S.D)로 표시하였다. 대조군 대비 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성

본 연구에 사용된 RAW 264.7 세포는 마우스 대식세포주이며, LPS에 의해 활성화되어 높은 산화력을 보이는 염증 증대 물질이나 염증 매개체를 방출하는 것으로 알려져 있다[12]. 항염증 효능을 세포에서 분석하기에 앞서 RAW 264.7 세포에서의 MDE와 MEE의 독성여부를 확인하였다. 대조군을 100%로 하였을 때, MDE와 MEE

Table 1. The Sequences of Primers

Primer	F/R*	Sequences
NF- κ B	F	GGATCACATTTGCTTTGTGTTGTT
	R	CACAACCTTACAGTAGATGGCTAGAAAGG
iNOS	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA
	R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
COX-2	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT
	R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG
GAPDH	F	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG

* F/R : forward/reverse

각각 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 MDE는 $100.5 \pm 0.7\%$, $99.99 \pm 1.4\%$, $101.1 \pm 0.7\%$ 로 MEE는 $102.3 \pm 0.6\%$, $101.1 \pm 1.6\%$, $100.5 \pm 1.0\%$ 로 세포생존을 보여 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). 따라서 본 연구의 농도조건은 세포독성에 의한 결과에 영향을 미치지 않을 것이라 판단하였다.

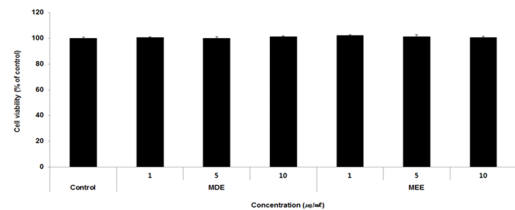


Fig. 1. Cell viability effect of Manjakani extracts from DW (MDE) and 80% EtOH (MEE) on cell viability in RAW 264.7 cells.

3.2. 항염증 효능

3.2.1. NO 생성량

체내에서 NO는 생리학과 병리학적인 관점에서 중요한 세포내 신호분자로써 작용한다[13]. 또한 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다[13,14]. 그러나 산화적 환경에서 높은 수준의 NO 생산은 조직 및 신경의 손상을 일으키고, 유전자를 변이시키며, 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키는 등 과도한 염증 반응을 일으킬 뿐만 아니라 산화적 환경을 더욱 악화시킨다[14-16]. 본 연구에서는 LPS로 처리된 Raw264.7 세포가 NO를 생산할 때 MDE와 MEE가 어느 정도 NO 생성량을 억제하는지 확인해 보았으며 그 결과는 다음과

같다. 대조군을 100%로 하였을 때, MDE와 MEE 각각 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 MDE는 $87.4 \pm 1.8\%$, $79.9 \pm 3.1\%$, $62.8 \pm 2.4\%$ 로 MEE는 $81.2 \pm 3.0\%$, $71.2 \pm 2.3\%$, $56.3 \pm 3.4\%$ 로 NO가 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 만자카니 추출물은 NO의 생성을 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰으며, 상대적으로 MEE의 감소 효능이 높게 나타났다.

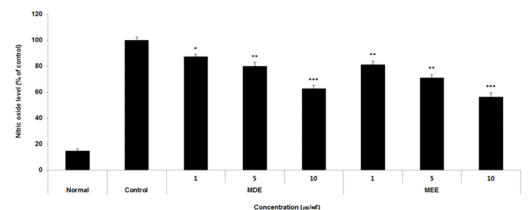


Fig. 3. Effect of MDE and MEE on NO levels in RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compare to control).

3.2.2. PGE₂와 LTB₄ 생성량

MDE와 MEE가 PGE₂와 LTB₄ 생성량을 억제하는지 확인해 보았으며 그 결과는 다음과 같다. PGE₂의 감소량은 대조군을 100%로 하였을 때, MDE와 MEE 각각 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 MDE는 600.0 ± 23.6 pg/ml, 551.9 ± 30.7 pg/ml, 442.4 ± 31.5 pg/ml로 MEE는 520.2 ± 29.4 pg/ml, 476.2 ± 30.2 pg/ml, 360.7 ± 14.6 pg/ml로 MDE는 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 감소되었으며, MEE는 농도 의존적으로 유의하게 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-A). LTB₄의 감소량은 대조군을 100%로 하였을 때, MDE와

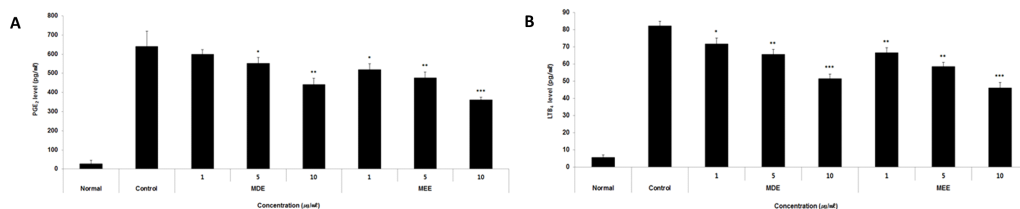


Fig. 4. Effect of MDE and MEE on PGE₂ and LTB₄ levels in RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compare to control).

MEE 각각 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 MDE는 71.8 ± 3.4 pg/ml , 65.6 ± 3.0 pg/ml , 51.6 ± 2.7 pg/ml 로 MEE는 66.7 ± 3.0 pg/ml , 58.5 ± 2.6 pg/ml , 46.2 ± 3.1 pg/ml 로 농도 의존적으로 유의하게 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-B). PGE_2 와 LTB_4 생성량 역시 MEE가 상대적으로 좀 더 유의한 결과를 나타냈음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 사이토카인의 감소가 PGE_2 와 LTB_4 생성량과 부합되는 결과로 서로 영향을 미치는 것이라고 판단된다.

3.2.3. 사이토카인 생성량

MDE와 MEE가 염증성 cytokine 생성량을 억제하는지 확인해 보았으며 그 결과는 다음과 같다. MDE와 MEE 각각 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 $\text{IL-1}\beta$ 의 감소량은 대조군 24.2 ± 1.1 pg/ml 에 비하여 MDE는 21.8 ± 1.2 pg/ml , 18.4 ± 2.0 pg/ml , 14.8 ± 1.2 pg/ml 로 MEE는 20.1 ± 0.9 pg/ml , 15.3 ± 2.6 pg/ml , 11.9 ± 1.4 pg/ml 로 농도 의존적으로 유의하게 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 5-A). IL-6 의 감소량은 대조군 1055.1 ± 75.6 pg/ml 에 비하여 MDE는 936.5 ± 38.4 pg/ml , 788.1 ± 39.4 pg/ml , 685.9 ± 42.8 pg/ml 로 MEE는 898.4 ± 33.4 pg/ml , 736.7 ± 24.9 pg/ml , 588.4 ± 21.4 pg/ml 로 농도 의존적으로 유의하게 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 5-B). $\text{TNF-}\alpha$ 의 감소량은 대조군 3092.8 ± 91.2 pg/ml 에 비하여 MDE는 2823.3 ± 148.6 pg/ml , 2523.7 ± 159.6 pg/ml , 2104.7 ± 144.9 pg/ml 로 MEE는 2821.3 ± 151.7 pg/ml , 2345.2 ± 160.3 pg/ml , 1960.3 ± 151.8 pg/ml 로 농도 의존적으로 유의하게 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 5-C). 염증성 cytokine의 감소량을 비교하면 MDE보다 MEE가 비교적 더 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며 이는 MEE에서 더 많은 항염증 성분이 추출되었다고 사료된다. Hamad et al. (2017)의 연구에 따르면 만자카니는 증류추출에 비해 상대적으로 에탄올추출에서 항산화 효능이 있는 것으로 보고되어져 있다. Bak et al. (2014) 및 Lee et al. (2014) 등의 연구에서 항산화 활성과 항염증 활성의 상관관계에 대해 논의된 바 있으며, 만자카니 또한 항산화에 영향을 미치는 성분 중에 항염증을 나타내는 성분이 있을 것이라 사료된다.

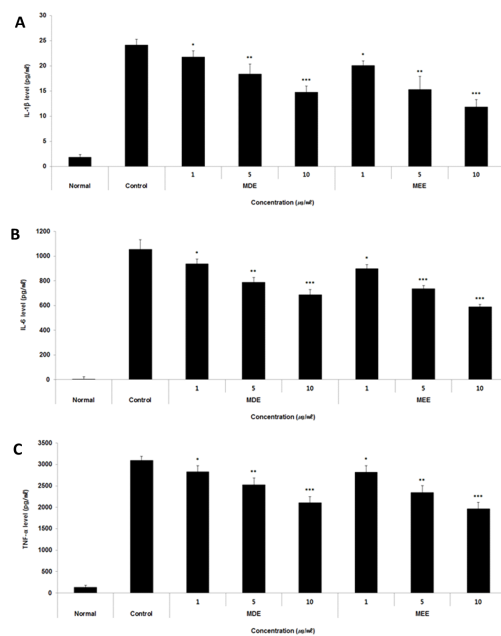


Fig. 5. Reduction effect of MDE and MEE on cytokine $\text{IL-1}\beta$ (A), IL-6 (B) and $\text{TNF-}\alpha$ (C) levels in RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ compare to control).

3.2.4. 전사인자 발현량

본 연구에서는 MDE와 MEE가 염증 반응에서 나타나는 전사인자의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 유전자 발현량을 측정된 결과, MDE 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 제외한 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p<0.01$, *** $p<0.001$) 감소가 나타났다(Table. 2). iNOS 유전자 발현량을 측정된 결과, MDE와 MEE는 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) 감소가 나타났다(Table. 3). COX-2 유전자 발현량을 측정된 결과, MDE와 MEE의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 제외한 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p<0.01$, *** $p<0.001$) 감소가 나타났다(Table. 4). Shrestha et al. (2014)의 연구에서 만자카니의 다양한 용매 추출 중 증류 추출과 에탄올 추출에서 유효 성분이 상

Table 2. Effect of MDE and MEE on NF- κ B mRNA Expression Level in RAW264.7 Cells

Concentration (μ g/ml)	Fold change (NF- κ B/GAPDH)	
	MDE	MEE
Normal	0.17 \pm 0.10	
Control	1.00 \pm 0.11	
1	0.86 \pm 0.04	0.63 \pm 0.07**
5	0.62 \pm 0.08**	0.58 \pm 0.04***
10	0.56 \pm 0.04***	0.54 \pm 0.05***

*Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01 compare to control

Table 3. Effect of MDE and MEE on iNOS mRNA Expression Level in RAW264.7 Cells

Concentration (μ g/ml)	Fold change (iNOS/GAPDH)	
	MDE	MEE
Normal	0.31 \pm 0.05	
Control	1.00 \pm 0.05	
1	0.88 \pm 0.04*	0.83 \pm 0.03*
5	0.61 \pm 0.07**	0.63 \pm 0.03***
10	0.56 \pm 0.02***	0.45 \pm 0.04***

*Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compare to control

Table 4. Effect of MDE and MEE on COX-2 mRNA Expression Level in RAW264.7 Cells

Concentration (μ g/ml)	Fold change (COX-2/GAPDH)	
	MDE	MEE
Normal	0.01 \pm 0.10	
Control	1.00 \pm 0.02	
1	1.01 \pm 0.09	1.02 \pm 0.03
5	0.74 \pm 0.04**	0.72 \pm 0.02**
10	0.55 \pm 0.04***	0.60 \pm 0.03***

*Significance of results, *** p <0.001, ** p <0.01 compare to control

대적으로 다량 추출되는 결과와 부합되어 본 연구의 MDE와 MEE 모두 항산화와 항염증 효능이 유의하게 나타난 결과는 일부 설명이 될 수 있다고 사료된다. 만자카니는 전사인자의 합성 단계에서 염증성 반응을 조기 차단하여 염증을 완화시키는 것으로 생각되며, 이는 항염증에 효과적인 원료 소재로서의 가능성이 높다고 판단된다. 향후 심도 있는 연구를 통해 만자카니의 항산화 및 항염증 활성에 대한 자세한 메커니즘이 연구되어야 할 것이며, 연관된 질환에서의 효능이 규명되면 다양한 분야에서 기능성 식품 및 화장품과 같은 제품 생산에 있어 주요 원료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

4. 결론

본 연구는 열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니 추출물에 대한 세포독성 및 항염증 등의 효능에 관한 비교를 진행한 결과는 다음과 같다.

1. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니 추출물은 RAW 264.7 세포에서 1, 5, 10 (μ g/ml) 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 안전한 것으로 확인되었다.
2. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7

세포에서 NO 생성량을 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물 1, 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 확인되었다.

3. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 LTB_4 생성량을 열수 추출물 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도와 80% 에탄올 추출물의 1, 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 확인되었다.
4. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 LTB_4 생성량을 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물의 1, 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 확인되었다.
5. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 $\text{IL-1}\beta$, IL-6 및 $\text{TNF-}\alpha$ 생성량을 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물의 1, 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다.
6. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 만자카니 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 발현양은 열수 추출물은 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도와 80% 에탄올 추출물의 1, 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서, iNOS 발현량은 열수와 80% 에탄올 추출물의 1, 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서, COX-2 열수와 80% 에탄올 추출물의 5, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다.

결과적으로 만자카니의 열수 및 에탄올 추출물 모두 항염증 효능이 확인 되었으며 상대적으로 MEE의 효능이 더 높은 것으로 나타났다. 객관적으로 유의한 효능을 나타냈으므로 향후 염증으로 인한 피부 손상 나아가 염증관련 질환을 개선하는 제품의 유용한 소재로써 응용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018년 대전대학교 산학공동과제 지원에 의해 연구되었습니다.

References

1. G. Kaplanski, V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, C. Farnarier, "IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation", *Trends Immunol.*, Vol.24, No.1 pp. 25-29, (2003).
2. M. A. O'Connell, B. L. Bennett, F. Mercurio, A. M. Manning, N. Mackman, "Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells", *J. Biol. Chem.*, Vol.273, No.46 pp 30410-30414, (1998).
3. B. Hinz, K. Brune, "Cyclooxygenase-2—10 years later" *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Vol.300, No.2 pp 367-375, (2002).
4. K. A. Kim, H. S. YI, H. J. YUN, S. D. Park, "Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of *Cynomorium Songaricum*", *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.*, Vol.23, No.6 pp 1320-1331, (2009).
5. F. B. Dayang, S. T. Liy, S. Zaleha, M. Z. Noraziah, "In Vitro Antibacterial Activity of Galls of *Quercus infectoria* Olivier against Oral Pathogens", *Evid.-Based Complementary Altern. Med.*, pp 1-6 (2012).
6. Muhammad Z, Mustafa AM. *Chapter 6. Kuala Lumpur (MY): Penerbit Fajar Bakti Sdn Bhd.* p. 29-32, Traditional Malay Medicine Plants, (2010).
7. G. Kaur, M. Athar, M. S. Alam, "Quercus infectoria gall posses antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages", *Chem. Biol. Interact.*, Vol.171, No.3 pp 272-282, (2008).

8. D. F. Basri, S. H. Fan, "The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents", *Indian J. Pharmacol.*, Vol.37, No.1 pp 26-29, (2005).
9. S. P. Umachigi, K. N. Jayaveera, C. K. A. Kumar, G. S. Kumar, B. M. V. Swamy, D. V. K. Kumar, "Studies on wound healing properties of *Quercus infectoria*", *Trop. J. Pharm. Res.*, Vol.7, pp 913-919, (2008).
10. H. J. Lee, B. Y. Sim, J. W. Bak, D. H. Kim, "Effect of Gami-sopungsan on Inflammation and DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga in Mice", *J. Physiol. & Pathol. Korean Med.*, Vol.28, No.2 pp 146-153, (2014).
11. K. S. Kang, H. J. Lee, B. Y. Sim, J. W. Bak, H. J. Choi, D. H. Kim, "Anti-inflammatory Effect of Cornus officinalis Fruit Extract for Potential of Cosmetic Ingredient", *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, Vol. 13, No.4 pp 461-468, (2015).
12. S. R. Hwang, H. J. Lee, B. Y. Sim, "The Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extract in *Euphorbia Supina* Rafinesque", *J. Kor. Soc. Cosm.*, Vol.20, No.6 pp 976-981, (2014).
13. H. J. Lee, M. H. Lim, "Antioxidation Effect of Lemongrass and Maychang Essential Oil", *J. Kor. Soc. Cosm.*, Vol.22, No.2 pp 319-326, (2016).
14. C. Gabay, "Interleukin-6 and chronic inflammation", *Arthrit. Res. Ther.*, Vol.8, No.2 pp 1-3, (2016).
15. T. J. J. Van, J. H. Arts, J. H. Muijser, C. F. Kuper, "Allergic inflammation in the upper respiratory tract of the rat upon repeated inhalation exposure to the contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB)", *Toxicology*, Vol.269, No.1 pp 73-80, (2010).
16. H. O. Hamad, M. H. Alma, I. Gulcin, M. A. Yılmaz, E. Karaoğul, "Evaluation of Phenolic Contents and Bioactivity of Root and Nutgall Extracts from Iraqi *Quercus infectoria* Olivier". *Rec. Nat. Prod.*, Vol.11, No.2 pp 205-210, (2017).
17. J. W. Bak, B. Y. Sim, H. J. Lee, D. H. Kim, "Effect of Cheongungdajosan-gamibang on oxidative damage and inflammation", *Kor. J. Herbology*, Vol.29, No.4 pp 53-59, (2014).
18. Y. J. Lee, B. Y. Sim, H. J. Lee, J. W. Bak, D. H. Kim, "Effect of Gami-Chunggisan on Antioxidant and Pro-Inflammatory Cytokine" *Kor. J. Herbology*, Vol.29, No.4 pp 69-76, (2014).