

까마귀쪽나무 열매 추출물의 면역증가 및 뼈 건강 효과

박성진¹ · 강준철² · 이다영² · 조주현² · 윤민호^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과, ²주하람중앙연구소

Immunostimulatory and Bone Health-Promoting Activities of *Litsea japonica* Fruit Extract

Sung-Jin Park¹, Jun-Chul Kang², Da-young Lee², Ju-Hyun Cho², Min-Ho Yoon^{1*}

¹Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Lifesciences,
Chungnam National University, Daejeon, Korea

²Haram Central Research Institute Co., Ltd, Chungju, Korea

(Received March 20, 2020/Revised March 23, 2020/Accepted April 21, 2020)

ABSTRACT - This study was performed with hot water extract (LJF-W) and 70% ethanol extract (LJF-70E) of *Litsea japonica* fruit to investigate the immunostimulatory activity and bone health-promoting effect of *L. japonica* fruit. The production of pro-inflammatory mediator (nitric oxide) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) in murine macrophage RAW264.7 cells were estimated to examine the immunostimulatory activity of the fruit extracts. The immunostimulatory activity of LJF-W was higher than that of positive control (geinsenosides). However, there was no effect in LJF-70E. Furthermore, both LJF-W and LJF-70E appeared to stimulate the proliferation of MC3T3-E1 cells, proving the effect as a bone health agent. From this result it could be presumed that *L. japonica* fruit extracts not only stimulate the immune system, but also the ability to promote bone health.

Key words : *Litsea japonica* fruit extract, Immuno-stimulation, Bone-health

까마귀쪽나무(*Litsea japonica*)는 녹나무과 까마귀쪽나무속의 상록 소교목으로 일본과 국내 특히 제주도, 울릉도 등 일부 남부지역에 주로 자생하며 까마귀쪽나무 또는 구릅비나무로 불려진다¹⁾. 특히 까마귀쪽나무의 열매는 핵과로 8월에서 9월 말경에 익으면 식용이 가능하다. 까마귀쪽나무 열매에는 주로 fatty acids, essential oils, lactones, alkaloids 등이 함유되어 있으며^{2,3)}, 지표성분으로는 hamabiwalactone A, hamabiwalactone B, akolactone B, litsealactone A, litsealactone B 등이 보고 되었다¹⁾. 까마귀쪽나무 열매는 구토, 설사, 뼈의 통증, 산후통증에 사용되어 졌다고 보고되고 있으나⁴⁾, 까마귀쪽나무에 대한 생리활성 연구는 많이 이루어져 있지 않은 상태이다. 생약재를 이용한 식품 가공 원료가 증가하고 있는 만큼 건강 유지와 자양강장을 목적으로 섭취하는 경우가 많아졌다⁵⁾.

면역은 체내의 자기방어체계로서 자기 성분 이외의 외부 감염물질로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 이물질로 인식하여 제거하고 대사시키는 중요한 생체적 방어작용의 하나로 선천성 면역반응과 후천성 면역반응을 구분된다⁶⁾. 선천성 면역계에서 최전선을 담당하는 대식세포는 체내의 모든 조직에 분포하며 1차적으로 세균이나 바이러스, 감염성 병원체뿐 아니라 노화 세포나 암세포 등에 대해 탐식작용을 일으키는 방어작용을 가지고 있다. 활성화된 대식세포는 대식능력의 증강, nitric oxide, TNF- α , IL-6 등의 다양한 cytokine 생성을 증가시키므로 면역반응을 극대화시키는 중요한 매개체 역할을 한다^{7,8)}. 대식세포는 O₂, H₂O₂ 등을 분비함으로써 표적세포를 제거하며⁹⁾, 활성화된 대식세포만이 분비한다고 알려진 nitric oxide는 산소중간물질 등에 내성을 보이는 기생체나 종양세포에도 작용하여 유효한 효과를 나타낸다고 보고되어있다^{10,11)}. 대식세포는 외부로부터 들어온 항원을 세포 표면에 발현시켜 T림파구로 하여금 그 항원을 인식하게 하여 항체를 만들게 한다. 한편, 체액성 면역을 담당하는 B림파구의 기능은 항체를 생성함으로 외부 항원과 결합하여 면역 복합

*Correspondence to: Min-Ho Yoon, Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Lifesciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
Tel: +82-42-821-6733, Fax: +82-42-821-6731
E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr

체를 형성하고 보체를 활성화하여 항원을 제거하는 역할을 한다¹²). 또한 바이러스로 감염된 세포나 암세포에 대하여 살해능력을 가진 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)는 면역에 있어서 숙주를 보호하고, 암이나 각종 감염에 대해 중요한 역할을 하며 초기 면역반응에서 일차적 방어선을 차지하는 중요한 역할을 한다¹³).

뼈는 칼슘과 인이 석회화된 조직으로, 미네랄의 저장창고이며 몸을 지탱하고 보호하는 중요한 역할을 한다¹⁴). 뼈를 구성하는 단백질을 생성하는 조골세포(osteoblast)와 뼈의 표면에 단백질 분해효소 분비 등을 통해 뼈 구성성분을 파괴하는 파골세포(osteoclast)의 균형을 통해 뼈의 항상성이 유지된다^{15,16}). 조골세포는 조골전구세포가 다양한 인자들에 의해 분화되어 생성되며 단백질 성분을 분비하고 미네랄화 하여 osteoid를 형성한다^{17,18}). 골 형성은 복잡한 분자생물학적 과정에 의해 이루어지며, 골과 관련된 유전자들의 발현에 의하여 조절되어 진다. 이때 관여하는 유전자는 alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), osteonectin (ON), osteopontin (OP) 등이 있다¹⁹).

본 연구에서는 까마귀쪽나무 열매 70% 주정에탄올 추출물과 열수추출물을 대식세포에 처리 시 대식세포가 활성화 되었을 때 분비되는 NO 및 cytokine의 수준을 측정함으로써 면역강화 작용을 규명하였고, 조골세포의 증식능의 차이를 확인하므로 뼈 건강 작용을 규명하였다.

Materials and Methods

까마귀쪽나무 열매 추출물 제조

제주도 해안가에 자생하고 있는 까마귀쪽나무 열매를 2019년 5월에 채취하여 본 연구에 사용하였다. 까마귀쪽나무 열매의 씨앗을 분리한 후, 과육 부분을 동결건조(7751041, Labconco, Kansas City, MO, USA)하였다. 까마귀쪽나무 동결건조 열매에 20배수의 증류수를 넣고 환류추출장치에서 95°C에서 4시간 동안 추출하였으며, 20배수의 70% 에탄올을 넣고 환류추출장치에서 85°C에서 4시간 동안 환류추출하였다. 각각의 방법을 2회 실시하였으며, 1차 및 2차에서 얻어진 추출물을 혼합하여 filter paper (ADVANTEC, Tokyo, Japan)로 여과한 다음 일정 농도까지 농축(N-1300, Eyla, Tokyo, Japan)한 후 동결건조(7751041, Labconco)하여 열수추출 분말시료(LJF-W)와 70% 에탄올추출 분말시료(LJF-70E)를 얻었다.

Total anthocyanins 함량분석

총 안토시아닌 함량 분석은 Mitsunaga 등²⁰의 vanillin-hydrochloric acid 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mg을 methanol 0.5 mL에 용해 후 0.5% vanillin-HCl solution (0.5% vanillin (w/v) + 4% HCl in MeOH)을 첨가하여 실온암소에서 20 min 동안 방치한 후, 500 nm에

서 흡광도를 측정하였다. 카테킨(0.0625-1.0 mg/mL) 표준곡선을 이용하여 총 안토시아닌 함량을 계산하였다.

세포배양

대식세포(murine macrophage cell line)인 RAW264.7은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 Dulbecco's modified eagles medium (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)배지에 10% fetal bovine serum (Gibco RBL Co., Grand Island, NY, USA)과 100 units/mL penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)을 첨가하여 사용하였고, 조골전구세포(preosteoblast)인 MC3T3-E1은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 α MEM (Gibco RBL Co., Grand Island, NY, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco RBL Co., Grand Island, NY, USA)과 100 units/mL penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)을 첨가하여 사용하였고 37°C, 5% CO₂ incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

세포독성 측정

RAW264.7 cell을 5×10^3 cells/100 μ L이 되도록 96-well-plate에 같고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 다음 LJF-W, LJF-70E를 각각 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1,000 μ g/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. MTT assay kit (Dozen, Seoul, Korea)을 사용하였다. Microplate reader (Epoch, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

Nitric oxide (NO) 측정

RAW264.7 cell을 5×10^4 cells/mL이 되도록 48-well-plate에 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양한 다음 LJF-W, LJF-70E를 각각 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1,000 μ g/mL의 농도로 48시간 동안 처리하고, 양성대조군으로 홍삼(진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg3 5.5 mg/g)과 lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/mL)을 사용하였다. 100 μ L의 상층액을 취하여 96-well plate에 옮긴 후 NO assay kit (Intron, Sungnam, Korea)을 이용하여 상층액의 NO를 microplate reader (Epoch, Biotek Instruments Inc.)를 이용하여 540 nm의 흡광도에서 측정하였다²¹).

Cytokines 측정

RAW264.7 cell을 5×10^4 cells/mL이 되도록 48-well-plate에 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific)에서 배양한 다음 LJF-W, LJF-70E를 각각 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1,000 μ g/mL의 농도로 48시간 동안 처리하고, 양성대조군으로 홍삼(진세노사이드

Rg1+Rb1+Rg3 5.5 mg/g)과 lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL)을 사용하였다. 100 µL의 상층액을 취하여 96-well plate에 옮긴 후 Enzyme-Linked Immuosorbent Assay (ELISA) kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 상층액의 TNF-α, IL-6를 microplate reader (Epoch, Biotek Instruments Inc.)를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

조골세포증식 측정

MC3T3-E1을 5×10³ cells/100 µL이 되도록 96-well-plate에 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific)에서 배양한 다음 LJF-W, LJF-70E을 각각 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1,000 µg/mL의 농도로 48시간 동안 처리하였다. MTT assay kit (Dozen)을 사용하였다. Microplate reader (Epoch, Biotek Instruments Inc.)를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

ALP 측정

MC3T3-E1(조골세포)를 5×10³ cells/250 µL로 48-well-plate에 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific)에서 배양한 LJF-W, LJF-70E을 각각 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1,000 µg/mL의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 배양 후 PBS로 세척하고 Lysis buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 16,000×g에서 15분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 ALP activity를 ALP assay kit (ab83369, Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 통계적 유의성은 GraphPad Prism 8.0 (Graph Pad software, San Diego, CA, USA) package program을 이용하여 실험군 당 평균과 표준편차로 표시하였고, Student's t-test와 one way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

까마귀쪽나무 열매 추출물(LJF-W, LJF-70E)의 총 안토시아닌 함량 및 세포독성

Anthocyanin은 면역, 항산화 및 항암에도 효능이 있다는 연구가 보고되어 있어²²⁾ 까마귀쪽나무열매추출물(LJF)에서의 총 안토시아닌의 함량을 확인하고자 하였다. 까마귀쪽나무열매추출물(LJF-W, LJF-70E)에 대하여 총 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. LJF-W와 LJF-70E의 총 안토시아닌 함량은 각각 325.50±45.58 mg CE/g과 136.99±8.44 mg CE/g으로 LJF-W의 함량이 LJF-70E 보다 높은 것으로 분석되었

Table 1. Total anthocyanin contents of *Litsea japonica* fruit extracts

Samples	Total anthocyanin (mg CE ¹⁾ /g)	Standard range (mg CE/g)
LJF-W ²⁾	325.50±45.58 ⁴⁾	250-380
LJF-70E ³⁾	136.99±8.44	100-160

¹⁾CE: catechin equivalent.
²⁾LJF-W: *Litsea jaonica* fruit water extract.
³⁾LJF-70E: *Litsea jaonica* fruit 70% ethanol extract.
⁴⁾All values are mean±SD of triplicate.

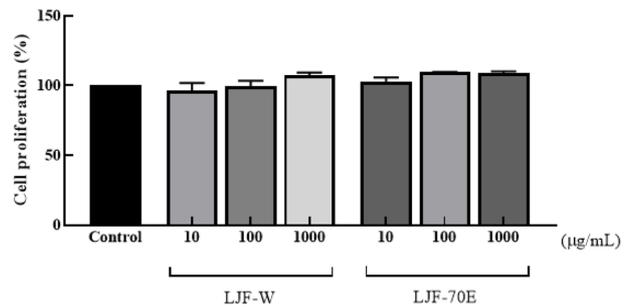


Fig. 1. Effect of *Litsea japonica* fruit (LJF) on the cell viability of RAW264.7 cells.

다(Table 1). 또한 RAW264.7세포(5×10³ cells/mL)에 LJF-W와 LJF-70E을 처리하여 24시간 동안 배양한 후 MTT assay kit를 이용하여 세포독성을 확인하였다. 통계처리하여 확인한 결과, 대조군 대비 유의성이 없어 세포독성이 없는 것으로 확인되어(Fig. 1). 안토시아닌의 함량과 세포독성과는 상관관계가 없음을 확인하였다.

까마귀쪽나무 열매 추출물의 NO 생성에 미치는 영향

RAW264.7 세포주를 이용하여 nitric oxide (NO)의 생성량 변화를 그 대사체인 nitrite의 농도를 측정하여 확인하였다. 대식세포가 활성화 되면 NO 및 TNF-α등의 염증성 사이토카인들을 분비하는데 NO의 생성은 면역계에서 방어작용을 하는 중요한 역할을 한다고 알려져있다²³⁾. 양성대조군인 홍삼 1,000 µg/mL을 처리하였을 때 NO 생성량이 약 45% 증가한 반면에, LJF-W 1,000 µg/mL을 처리 시에는 음성대조군 대비 약 67%, LJF-70E 1,000 µg/mL을 처리 시에는 약 87% 증가하였다(Fig. 2). 이 결과를 통계처리한 결과 대조군 대비 처리군에서 유의적으로 NO 생성량이 증가하였으므로 까마귀쪽나무 열매 추출물이 대식세포의 활성화에 직접 관여 할 수 있음을 보여준다.

까마귀쪽나무 열매 추출물의 cytokine 생성에 미치는 영향

활성화된 macrophage는 면역반응과 염증반응을 매개하는 cytokine을 생산함으로써, 면역 세포가 외래물질에 대한 방어력을 유도할 수 있게 작용하여 항원에 대한 작동

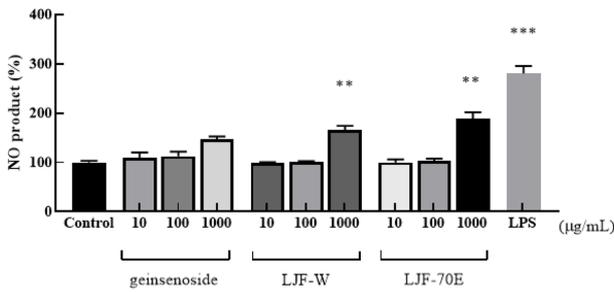


Fig. 2. Effect of *Litsea japonica* fruit (LJF) on nitrite production in RAW264.7 cells. Macrophages were stimulated with LJF-W, LJF-70E or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). Stable metabolite of nitrite in the medium was measured by the Griess reagent. The values are mean±S.D. Significant difference from control group by student's t-test: ** $P < 0.005$, *** < 0.001 .

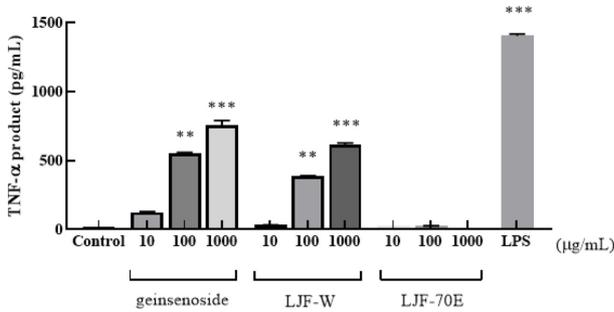


Fig. 3. Effect of *Litsea japonica* fruit (LJF) on the secretion of TNF- α . Macrophages were stimulated with LJF-W, LJF-70E or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). The level of TNF- α supernatant of cultured RAW264.7 cells was detected by ELISA kits. The values are mean±S.D. Significant difference from control group by student's t-test: ** $P < 0.005$, *** < 0.001 .

세포로 분화 및 증식시키는 역할을 담당한다. 대식세포가 생산하는 염증성 cytokine은 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등이 있다²⁴). 특히 TNF- α 는 미성숙 수지상 세포의 표면에 단백질 발현을 촉진하여 성숙된 수지상세포로 만들어 T림프구와 상호작용하여 T림프구의 활성화, 암세포의 세포사멸을 유도하는 등의 직접적인 항암작용을 나타낸다²⁵). 본 실험은 대식세포로부터 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 생산에 미치는 까마귀쪽나무 열매 추출물의 효능을 확인하고자 하였다. 실험결과 TNF- α 의 생성량은 LJF-W 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 약 367 pg/mL, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 약 595 pg/mL의 TNF- α 의 생성량이 늘어났다 (Fig. 3). 활성화된 대식세포는 IL-6를 생산함으로써 면역 반응을 조절한다. IL-6는 T세포를 활성화 하고 면역글로블린의 합성을 촉진하는 등 다양한 면역작용을 나타낸다²⁶). IL-6 생성량은 LJF-W 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 약 1705 pg/mL, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 약 2,317 pg/mL의 IL-6의 생성량이 증가하였다(Fig. 4). 또한 IL-1 β 는 helper

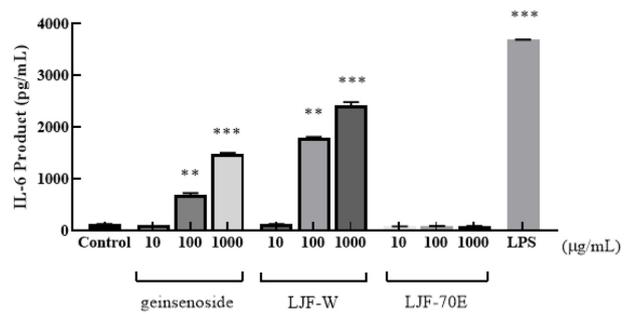


Fig. 4. Effect of *Litsea japonica* fruit (LJF) on the secretion of IL-6. Macrophages were stimulated with LJF-W, LJF-70E or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). The level of IL-6 supernatant of cultured RAW264.7 cells was detected by ELISA kits. The values are mean±S.D. Significant difference from control group by student's t-test: ** $P < 0.005$, *** < 0.001 .

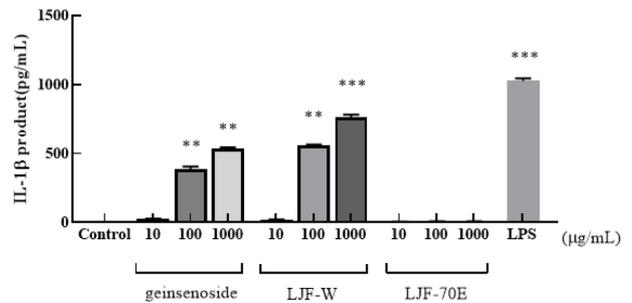


Fig. 5. Effect of *Litsea japonica* fruit (LJF) on the secretion of IL-1 β . Macrophages were stimulated with LJF-W, LJF-70E or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). The level of IL-1 β supernatant of cultured RAW264.7 cells was detected by ELISA kits. The values are mean±S.D. Significant difference from control group by student's t-test: ** $P < 0.005$, *** < 0.001 .

T-cell을 활성화 시키고 IL-2등의 cytokine의 활성을 증가시키는 역할을 한다²⁷). IL-1 β 의 생성량은 LJF-W 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 약 550 pg/mL, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리 시에는 약 747 pg/mL의 IL-1 β 의 생성량이 증가하였다 (Fig. 5). 특히1020170084331에 따르면 까마귀쪽나무 열매 추출물을 대식세포에 처리하였을 때 TNF- α 의 생성량이 대조군 대비 약 150 ng/mL 증가하였고, IL-1 β 의 생성량은 약 0.8 ng/mL 증가하였으나 IL-6의 양은 변함이 없었다²⁶). 본 실험의 결과 LJF-W는 면역활성을 향상시키는 것으로 나타났다, LJF-70E에서는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 양의 증진 효과가 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 통해 까마귀쪽나무 열매 열수추출물(LJF-W)은 면역세포의 생육을 증진하는 성분을 가지고 있으며, 까마귀쪽나무 나무와 그 열수추출물이 면역세포의 생육증진 및 cytokine 생성량을 통계 처리 결과 대조군 대비 처리군에서 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였으므로 면역증진 소재로 활용 가능성이 높음을 확인하였다.

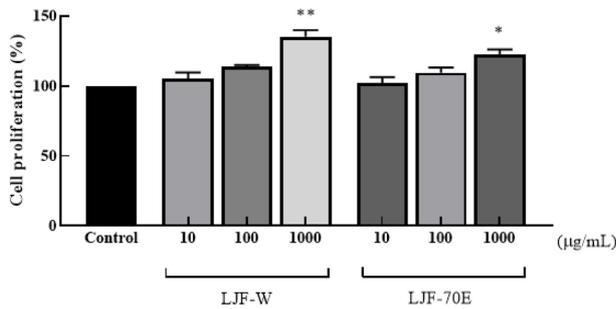


Fig. 6. Effect of *Litsea japonica* fruit (LJF) on the cell viability of MC3T3-E1 cells. The values are mean±S.D. Significant difference from control group by student's t-test: * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$.

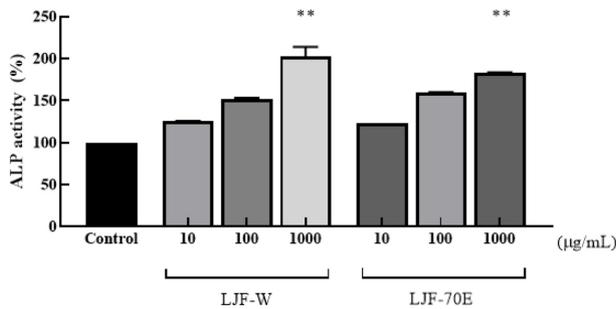


Fig. 7. Effect of *Litsea japonica* fruit (LJF) on the ALP activity of MC3T3-E1 cells. The values are mean±S.D. Significant difference from control group by Student's t-test: * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$.

까마귀쪽나무 열매 추출물이 조골세포 증식에 미치는 영향

조골세포인 MC3T3-E1세포(5×10^3 cells/mL)에 LJF-W 와 LJF-70E을 처리하여 48시간동안 배양한 후 MTT assay kit 를 이용하여 세포독성을 확인한 결과, LJF-W 1,000 µg/mL 을 처리하였을 때 음성대조군 대비 약 35%, LJF-70E 1,000 µg/mL을 처리 시에는 약 22%의 조골세포 증식능을 확인하였다. 통계처리 결과 유의적으로 조골세포 증식효과가 있음을 확인하였고 에탄올 추출물에 비해 상대적으로 열수추출물이 높음을 확인하였다(Fig. 6).

까마귀쪽나무 열매 추출물이 ALP생성에 미치는 영향

조골세포에 존재하는 ALP는 조골세포의 활성을 나타내는 지표이다²⁸⁾. 조골세포인 MC3T3-E1세포(5×10^3 cells/mL)에 LJF-W 와 LJF-70E을 처리하여 2주간 배양한 후 ALP activity를 ALP assay kit (ab83369, Abcam)를 이용하여 분석한 결과 ALP activity은 LJF-W 10 µg/mL을 처리 하였을 때 약 25%, 100 µg/mL을 처리하였을 때 약 51%, 1,000 µg/mL을 처리하였을 때 약 102%의 ALP activity가 증가하였다. LJF-70E 10 µg/mL을 처리 하였을 때 약 23%, 100 µg/mL을 처리하였을 때 약 59%, 1,000 µg/mL을 처리 하였을 때 약 83%의 ALP activity가 증가하였다(Fig 7). 이는 까마귀쪽나무 열매 열수추출물은 물론 에탄올 추출

물이 뼈건강증진 및 ALP activity을 통계처리 결과 대조군 대비 처리군에서 유의적으로 증가시키는 우수한 효과를 보여 까마귀쪽나무가 면역증진 및 뼈건강증진 소재로서도 활용 가능성이 높음을 확인하였다.

국문요약

본 연구는 까마귀쪽나무 열매 추출물이 대식세포인 RAW264.7세포에서의 면역증가 효능과 조골세포인 MC3T3-E1 세포에서 뼈건강 효능에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 면역증가 효능을 알아보기 위해서 까마귀쪽나무열매 열수추출물(LJF-W)과 70% 에탄올추출물(LJF-70E)을 저농도(10 µg/mL), 중농도(100 µg/mL) 및 고농도(1,000 µg/mL)로 각각 사용하였고, 양성대조군으로는 홍삼 진세노사이드(Rg1+Rb1+Rg3 5.5 mg/g)를 이용하여 실험을 진행하였다. 실험 결과 열수추출물(LJF-W)과 70%에탄올추출물(LJF-70E) 처리군에서 NO 생성량이 무처리군 그룹에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다. 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-6, IL-1β의 생성량은 열수추출물(LJF-W)에서 무처리군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였으나, 70% 에탄올추출물(LJF-70E)에서는 차이가 없음을 관찰할 수 있었다. 또한 뼈건강 효능을 확인하기 위해서 까마귀쪽나무열매추출물에 의한 조골세포인 MC3T3-E1세포의 세포증식능을 확인한 결과, 열수추출물과 70%에탄올추출물 처리군에서 조골세포 증식능이 무처리군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이 결과를 통해 까마귀쪽나무열매 열수추출물(LJF-W)이 면역증가와 뼈건강에 대한 효능성분으로 가능성이 있음을 확인하였다.

References

1. Min, B.S., Lee, S.Y., Kim, J.H., Kwon, O.K., Park, B.Y., An, R.B., Lee J.K., Moon, H.I., Kim, T.J., Kim, Y.H., Jung, H., Lee, H.K., Lactones from the leaves of the *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *J. Nat. Prod.*, **66**, 1388-1390 (2003).
2. Takeda, K., Sakurawi, K. Ishii, H., Components of the Lauraceae family-I. New lactonic compounds from *Litsea japonica*. *Tetrahedron*, **28**, 3757-3766 (1972).
3. Kandulski, A., Selgrad, M., Malfertheiner, P., *Helicobacter pylori* infection: a clinical overview. *Dig Liver Dis.*, **40**, 619-626 (2008).
4. Jiménez-Pérez, N.C., Lorea-Hernández, F.G., Jankowski, C.K., Reyes-Chilpa, R., Essential oils in mexican bays (*Litsea* spp., Lauraceae): Taxonomic assortment and ethnobotanical implications. *Econ. Bot.*, **65**, 178-189 (2011).
5. Jang, M., Lim, T.G., Hong, H.D., Rhee, Y.K., Kim, K.T., Lee, E.J., Lee, J.H., Lee, Y.J., Kim, Y.B., Cho, C.W., Immunostimulatory activities of a high molecular weight fraction from *Cynanchum wilfordii* Radix obtained by ultrafiltration.

- Korean J. Food Sci. Technol.*, **48**(3), 268-274 (2016).
6. Abo, T., Kawamura, T., Watanabe, H., Immunologic states of autoimmune diseases. *Immunol. Res.*, **33**(1), 23-34 (2005).
 7. Hibbs, J.B. Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M., Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **157**, 87-94 (1998).
 8. Nathan, C.F., Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, **79**, 319-326 (1987).
 9. Johnston, R.B. Jr., Keele, B.B. Jr., Misra, H.P., Lehmeier, J.E., Webb, L.S., Baehner, R.L., Rajagopalan, K.V., The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. *J. Clin. Invest.*, **55**(6), 1357-1372 (1975).
 10. Langermans, J.A., Van der Hulst, M.E., Nibbering, P.H., Hiemstra, P.S., Fransen, L., Van Furth, R., IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.*, **148**(2), 568-574 (1992).
 11. Henry, Y., Ducrocq, C., Drapier, J.C., Servent, D., Pellat, C., Guissani, A., Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur. Biophys. J.*, **20**(1), 1-15 (1991).
 12. Jin, M., Chung, K.S., Enhancement of immune responses by a water soluble proteoglycan, lepidan from *Lentinus lepidus*. *Yakhak Hoeji*, **43**(5), 635-641 (1999).
 13. Herberman, R.B., Ortaldo, J.R., Natural killer cell: Their roles in defenses against disease. *Science*, **214**, 24-30 (1981).
 14. Boisvert, C.A., The pelvic fin and girdle of *Panderichthys* and the origin of tetrapod locomotion. *Nature*, **438**, 1145-1147 (2005).
 15. Knothe Tate, M.L., Adamson, J.R., Tami, A.E., Bauer, T.W., The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**(1), 1-8 (2004).
 16. Teitelbaum, S.L., Bone resorption by osteoclasts. *Science*, **289**, 1504-1508 (2000).
 17. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G., *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, **89**(5), 747-754 (1997).
 18. Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A., Wozney, J.M., Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9843-9847 (1990).
 19. Suda, T., Takahashi, N., Martin, T.J., Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.*, **13**(1), 66-80 (1992).
 20. Mitsunaga, T., Doi, T., Kondo, Y., Abe, I., Color development of proanthocyanidins in vanillin-hydrochloric acid reaction. *J. Wood Sci.*, **44**, 125-130 (1998).
 21. Zhang, L., Cheng, Y.X., Liu, A.L., Wang, H.D., Wang, Y.L., Du, G.H., Antioxidant, anti-inflammatory and anti-influenza properties of components from *Chaenomeles speciosa*. *Molecules*, **15**(11), 8507-8517 (2010).
 22. Choung, M.G., Lim, J.D., Antioxidant, anticancer and immune activation of anthocyanin fraction from *Rubus coreanus* Miquel fruits (Bokbunja). *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, **20**(4), 259-269 (2012).
 23. Kim, H.S., Kang, J.S., Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulation activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 109-116 (2008).
 24. Cho, C.W., Han, C.J., Rhee, Y.K., Lee, Y.C., Shin, K.S., Shin, J.S., Lee, K.T., Hong, H.D., Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Int. J. Biol. Macromol.*, **72**, 519-525 (2015).
 25. Yu, A.R., Park, H.Y., Kim, Y.S., Ha, S.K., Hong, H.D., Choi, H.D., Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 1671-1676 (2012).
 26. Yoon, W.J., Composition for immunity stimulatory activity using a fruit extract of *Litsea japonica*. Korea Patent NO. 1020170084331 (2017).
 27. Cha, J.H., Kim, Y.S., Lee, E.M., Effects of *Prunellae spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J. Korean Obstet. Gynecol.*, **23**, 91-100 (2010).
 28. Aloia, J.F., Cohn, S.H., Vaswani, A., Yeh, J.K., Yuen, K., Ellis, K., Risk factors for postmenopausal osteoporosis. *Am. J. Med.*, **78**, 95-100 (1985).