

Antioxidant effect and iNOS, COX-2 Expression Inhibition on RAW 264.7 Cell of *Mangifera indica* L. Leafs

Dan-Hee Yoo¹ and In-Chul Lee^{2*}

¹Industry-Academic Collaboration Foundation, Seowon University, Chungbuk 28674, Korea

²Department of Bio-Cosmetic Science, Seowon University, Chungbuk 28674, Korea

Received May 8, 2020 / Revised July 21, 2020 / Accepted July 31, 2020

The present study investigates the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Mangifera indica* L. leaf extract. The total polyphenol content was measured using the Folin-Denis method. Results showed that the *M. indica* L. leaf extract of water and 70% ethanol showed a content of 440.83 ± 1.02 , 475.63 ± 1.3 mg/100 g tannic acid equivalent. To assess antioxidant activity and electron-donating ability, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity were measured, and all extracts were found to be highly efficacious. To assess cell viability of the extract from *M. indica* L. leaf on macrophage cells (RAW 264.7), a 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide assay was performed. The following experiments were conducted in section where cells was not shown of toxicity. In order to effectively determine anti-inflammatory activity, inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells was examined using a Griess assay. The result showed that *M. indica* L. leaf extract concentration-dependently inhibited NO production. *M. indica* L. leaf extract was measured using Western blot, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) that to find the production of pro-inflammatory factor on stimulated RAW 264.7 cells of LPS. According to the results of this study, the *M. indica* L. leaf extract showed excellent effectiveness in antioxidant and anti-inflammatory activity, thus confirming its usability as a natural material and a functional raw material for cosmetics.

Key words : Anti-inflammatory, antioxidant, cyclooxygenase-2, *Mangifera indica* L. leaf, the inducible NOS

서 론

최근 현대인의 생활수준의 향상과 수명의 연장으로 미용에 대한 관심이 증가하였다. 화장품 산업은 일부 피부자극을 유발하는 유기합성 성분이 사용되고 있으며, 피부 트러블에 대한 소비자들의 불만이 늘어나면서 화장품의 추세는 친환경, 천연성분, 저자극 화장품의 개발이 활발히 증가하고 있다[1, 24]. 천연 소재에 대한 다양한 연구가 수행되고 있으며, 항염, 항암, 항균, 항산화 등의 생리활성기능을 밝혀 다양한 제품을 만들기 위해 적용범위가 지속적으로 확대가 되고 있다[3].

인체의 노화를 유발하는 질병의 90% 이상은 활성산소와 관련이 있다고 알려져 있다. 활성산소는 산소가 지니고 있는 화학적 특성으로 생성되는 free radical과 이로 인해 유래된 산소화합물이며, 대부분 불안정하여 전자를 잃거나 얻어 안

정한 상태로 존재한다. 이 활성산소의 체내에서 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소에 의해 제거되지만, reactive oxygen species (ROS)는 지질과산화, 단백질 분해효소의 활성화, DNA 손상 등을 야기한다[2, 12]. 이러한 ROS에 의한 DNA 손상은 여러 가지 대사 및 생화학적 변화를 초래하는 주된 원인으로 알려져 있으며, 부착단백질 또는 염증 관련 사이토카인의 발현을 증가시켜 염증반응을 촉진하여 악화시키는 것으로 알려져 있다[15]. 염증반응은 상처, 외부자극물질 등에 의한 세균의 침입으로 손상된 조직에 나타나는 국소적 방어기전으로 항상성을 유지하는 자기방어 체계인 1차 면역반응이다. 활성산소의 하나인 nitric oxide (NO)는 대표적인 염증매개물질로 대식세포가 NO 생성에 관여한다. NO는 염증 반응 시에 inducible NO synthase (iNOS)에 의해 과도하게 생성되어 염증반응을 유도시키게 된다[4, 13, 21]. 또한 염증상태에서 대식세포가 활성화되면서 과도한 산화질소와 prostaglandin (PG) E₂, tumor necrosis factor (TNF)-α 등의 염증촉진성 interleukin, 부착성물질 등의 분비를 증가시킨다[10, 16].

망고는 쏘나무 과 망고 속에 속하는 다년생의 열대과수로, 학명은 *Mangifera indica* L.이다[22]. 망고의 여러 품종 중의 하나인 붉은 색을 띄는 아원(Irwin)은 애플망고(Apple mango)라고 불린다. 무게는 대개 300~500 g 정도이고, 형태, 향, 과즙

*Corresponding author

Tel : +82-43-299-8491, Fax : +82-43-299-8107

E-mail : 5229418@hanmail.net

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.

이 우수한 특징이 있으며, 껍질은 매우 얇은 것이 가장 큰 특징이고, 잎은 창처럼 생겼으며, 길이가 30 cm 정도이다. 잎의 주요 성분에는 flavonoids, phenolic, glucose, galactose 등이 있으며, 망고 잎에 들어있는 anthocyanins 성분 때문에 잎을 차로 달여 마실 경우에는 당뇨 성 망막증이나 당뇨 성 혈관증이 좋아진다는 보고가 있다. 특히 다른 품종에 비해 당도가 높고 과육에 섬유질이 거의 없으며, 강한 향기를 가지고 있다. 현재는 수입 판매와 국내의 제주도, 여수 등에서 재배가 되고 있다 [19, 23]. 현재 국내에서 재배되고 있는 우수한 품종 및 애플망고에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

본 연구에서는 피부에 안전한 소재인 천연물에 대한 연구가 활발하게 진행됨에 따라 애플망고 잎 추출물을 이용하여 항산화 및 항염증 효능을 검증하여 새로운 기능성 화장품 소재로서의 효능을 검증하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험은 애플망고의 잎을 사용하였으며, 제주도 대동농원에서 구입하여 사용하였다. 시료를 파쇄 후 100 g에 10배의 70% ethanol 가하여 24시간 침지한 후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였고, 열수 추출물은 시료 파쇄 후 100 g에 10배의 양을 가하여 100°C에서 3시간 환류냉각 추출해 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 동결건조기를 이용하여 -20°C에 보관하여 사용하였다.

시약 및 기기

생리활성 측정에 사용된 Folin-ciocalteu reagent (Folin), Tannic acid, 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid, 2,2'-azinobis-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 세포독성 및 항염증 측정에 사용된 시약인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), lipopolysaccharide (LPS), griess reagent 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. Western blot에 iNOS, Cyclooxygenase (COX)-2, β -actin의 primary antibody와 goat anti-rabbit 등의 secondary antibody는 Santa Cruz (CA, U.S.A)에서 구입하였다. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)에 이용한 GoScript™ Reverse Transcription System은 Promega Corporation (Madison, WI, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), microcentrifuge (gyrozen, Korea), ELISA reader

(Tecan, Austria), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), centrifuge (Hanil Science Industrial Co. Korea), autoclave (JS Research Inc, Korea), PCR (C-100, Bio-Rad, U.S.A), Image Quant LAS 4,000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 등을 사용하였다.

Total polyphenol 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법[9]을 변형하여 측정하였다. 추출물을 증류수에 희석한 다음 2 ml과 50% Folin-ciocalteu reagent 2 ml를 혼합한 후 실온에 3 분간 방치하였다. 그 후 10% Na_2CO_3 2 ml를 가하여 혼합 후 상온에서 1시간 동안 방치하였다가 흡광도 700 nm에서 측정하였다. 표준물질로 Tannic acid를 사용하여 검량선을 작성한 후 100 g 당 mg의 함량으로 나타내었다.

전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities) 측정 실험은 Blois의 방법[5]을 변형하여 시행하였다. 에탄올에 용해한 0.2 mM DPPH용액 60 μl 와 농도 별로 조제한 시료용액 120 μl 를 micro well plate에 넣어 실온에서 15분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. DPPH 60 μl 와 농도별 시료를 120 μl 를 넣고 혼합한 후 실온에서 15분간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자 공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS^+ cation decolorization assay의 방법[20]에 의하여 측정하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 보관하여 ABTS^+ 를 형성시킨 후 에탄올로 희석시켜 사용하였으며, ABTS^+ 100 μl 에 시료 100 μl 를 1:1로 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

세포 배양

본 실험에 이용한 RAW 264.7 세포의 배양을 위하여 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael 등의 방법[6]에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 0.18 ml 분주하였고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 MTT 용액을 2.5 mg/ml 농도로 제조하여 0.04 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Green 등의 방법[11]에 따라 griess시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 6 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well로 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양한 후 LPS 1 µg/ml을 normal을 제외하고 처리한 후 2시간 이후 농도 별로 조제한 시료용액을 처리하여 18시간 배양하였다. 그 후 상등액과 동량의 griess시약을 첨가하여 96 well plate에서 10분 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 억제 활성 측정은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{NO 억제능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

iNOS, COX-2의 활성을 확인하기 위하여 cell line Raw 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거하여 LPS를 1 µg/ml 농도로 2시간 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 18시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척해주었다. Radio-immunoprecipitation assay buffer 10 ml에 complete mini 1 tab을 가한 100 µl로 용해해서 4°C에서 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 µl의 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer기기(BIORAD)를 이용하여 polyvinylidene fluoride membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in Tris-buffered saline and tween 20 (TBST))에서 배양시켰다. iNOS, COX-2, β-actin의 1차 항체를

희석하여 4°C에서 overnight한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하였다. iNOS와 β-actin의 2차 항체는 anti-mouse를 사용하고, COX-2의 2차 항체는 anti-rabbit를 사용하여 1:5,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 그 후 TBST로 3회 washing한 후 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

Cell line RAW 264.7을 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding하여 24시간 동안 배양한 후 LPS를 1 µg/ml 농도로 2시간 처리해준 뒤 추출물을 농도별로 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200 µl를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl가 들어있는 튜브에 옮겨 담아 섞어주었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였고, 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocabonate (DEPC) water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조하였다. DEPC를 처리한 증류수를 50 µl씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 µl와 멸균수 195 µl를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl, 추출한 RNA (2 µg)와 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5X green Go Taq flexi buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix (10 mM), primer, Go Taq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. GAPDH, iNOS는 96°C에서 2분, 96°C에서 10초, 64°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(30 cycles), COX-2는 96°C에서 2분, 94°C에서 10초, 51°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(35 cycles)을 실행하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel을 100 V에서 30분간 전기영동한 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
GAPDH	sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
COX-2	sense	GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT
	anti-sense	ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA
iNOS	sense	AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT
	anti-sense	GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC

결과 및 고찰

Total polyphenol 함량 측정 결과

폴리페놀은 식물체에 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 식물에 함유된 페놀화합물의 기능은 다양하다. Phenolic hydroxyl기를 포함한 방향족 화합물로서 단백질 및 거대분자들과 결합되어 체내에서 항산화, 항염증, 항암작용, 콜레스테롤 저하 작용을 하여 항비만 등과 같은 생리활성 작용을 하는 것으로 알려져 있다[7, 8, 18].

애플망고 잎의 총 폴리페놀 함량에 대한 Tannic acid를 표준물질로 사용하여 측정된 결과를 Table 2와 같이 나타내었다. 애플망고 잎의 열수 추출물은 440.83±1.02 mg TAE/100 g을 나타내었고, 애플망고 잎의 에탄올 추출물에서는 475.63±1.03 mg TAE/100 g의 함량을 나타내었다. 두 추출물을 비교해 봤을 때 큰 차이는 없었지만, 추출용매가 에탄올일 경우 물에 비해 높은 함량을 나타내었다.

전자공여능 측정 결과

DPPH는 안정된 radical를 가지며, 페놀성 및 방향성 아민 화합물을 함유한 천연소재의 항산화 활성 측정에 많이 사용되고 DPPH의 radical을 소거시켜 탈색되는 것을 이용하는 방법이다. 보라색에서 투명한색으로 변하는 것을 육안으로 확인할 수 있으며, 지방질 산화뿐만 아니라 생체 내 대사과정에서 생성된 free radical에 의한 노화억제를 측정할 수 있는 기준으로 활용할 수 있다[1].

애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물의 전자공여능을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물에서 농도가 500 µg/ml일 때 각각 85.37±1.4%, 93.82±0.3%의 효과를 나타내어 에탄올 추출물에서 전자공여능 효과가 우수함을 확인하였다.

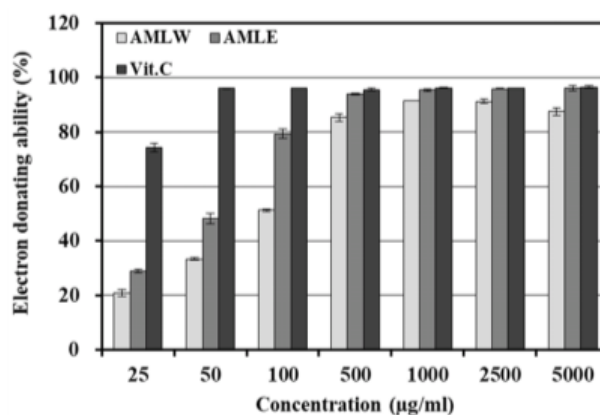


Fig. 1. Electron donating ability of *Mangifera indica* L. leaf extracts. □ AMLW: *Mangifera indica* L. leaf extracted with water, ■ AMLE: *Mangifera indica* L. leaf extracted with 70% ethanol. Results are means ± S.D. of triplicate data.

ABTS⁺ cation radical scavenging activity assay 측정 결과

DPPH는 유기용매에 용해되어 친수성 화합물의 항산화력을 측정하는 것이 어려우나, ABTS는 추출물의 고유 색소에 의한 영향이 최소화되어 DPPH보다 정확한 항산화력을 측정할 수 있다고 보고되어있다. ABTS를 peroxidase, H₂O₂와 반응시키면 ABTS⁺가 생성되는데, 이때 추출물의 항산화력에 의해 ABTS⁺ 고유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하는 것이다[14, 17].

애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물의 ABTS⁺ radical 소거활성을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물에서 농도가 500 µg/ml일 때 각각 80.92±1.38%, 94.48±0.8%의 효과를 나타내어 에탄올 추출물에서

Table 2. Content of total phenolic in *Mangifera indica* L. leaf extracts

Sample	Total polyphenols (mg/100 g dry)
<i>Mangifera indica</i> L. leaf extracted with water (AMLW)	440.83±1.02
<i>Mangifera indica</i> L. leaf extracted with 70% ethanol (AMLE)	475.63±1.03

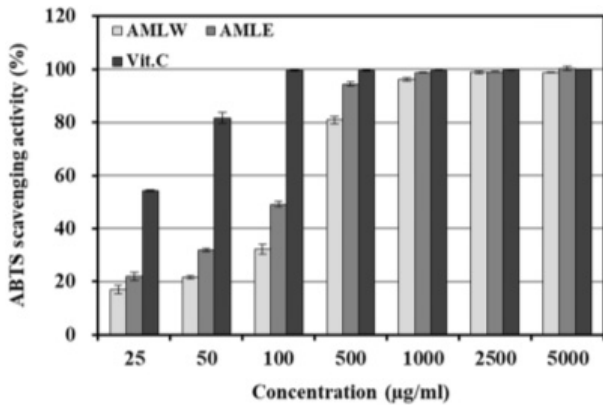


Fig. 2. ABTS radical scavenging ability of *Mangifera indica* L. leaf extracts. □ AMLW : *Mangifera indica* L. leaf extracted with water, ■ AMLE : *Mangifera indica* L. leaf extracted with 70% ethanol. Results are means \pm S.D. of triplicate data.

ABTS⁺ radical 소거능 효과가 우수함을 확인하였다.

대식 세포(RAW 264.7)의 세포생존율 측정

세포 생존율을 확인하기 위하여 사용된 MTT는 담황색의 기질로서 생 세포의 미토콘드리아 내의 호흡연쇄 효소에 의해 환원되어 암적색의 formazan을 생성한다. 죽은 세포에서는 반응이 일어나지 않으므로 이 formazan이 환원되는 정도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다[24].

에플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 대식 세포 (RAW 264.7)의 MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인한 결과 Fig. 3와 같이 나타내었다. 에플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물은 50 µg/ml 농도에서 100% 이상의 높은 세포 생존율을 나타내었으며, 이하의 세포 실험에서는 50 µg/ml 농도 이하에서 실험을 진행하였다.

NO 저해활성 측정

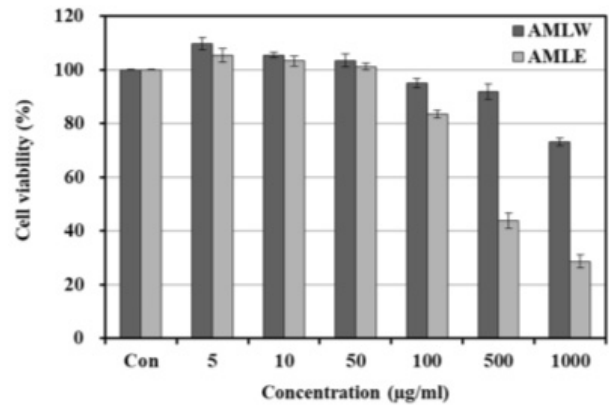
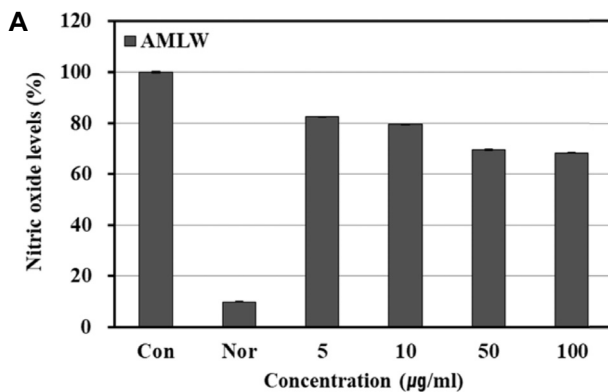


Fig. 3. Cell viability of extracts from *Mangifera indica* L. leaf on macrophage cells (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml of extracted *Mangifera indica* L. leaf for 24 hr. Each value represents mean \pm SD of three individual experiments. □ AMLW : *Mangifera indica* L. leaf extracted with water, ■ AMLE : *Mangifera indica* L. leaf extracted with 70% ethanol.

활성산소 중 하나이며 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 에플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물의 효과를 측정된 결과를 Fig. 4와 같이 나타내었다. LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 생성량을 보였으며, 에플망고 잎 열수 및 에탄올 추출물을 처리한 군은 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

iNOS, COX-2의 단백질 발현 및 mRNA 발현억제효과 확인

NO의 생합성에 관여하는 효소는 NOS로서 constitutive NOS (cNOS)와 iNOS로 나뉘지는데 cNOS는 정상적인 체내의 생리적 작용을 담당하며, 칼슘에 의하여 활성화되어 소량의

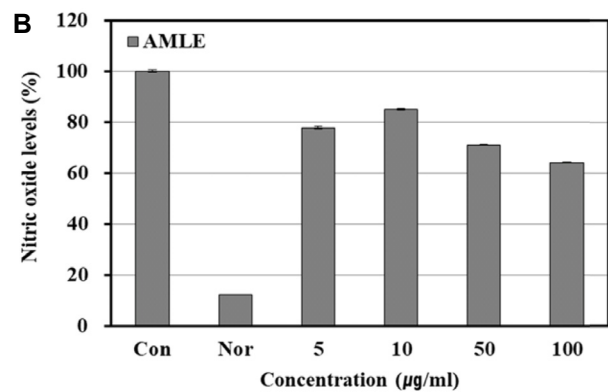


Fig. 4. Effect of extracts from *Mangifera indica* L. leaf on production of nitric oxide in RAW 264.7 cell. Effect of extracts of *Mangifera indica* L. leaf on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with extracts of *Mangifera indica* L. leaf and LPS (1 µg/ml) for 18 hr. Each value represents mean \pm SD of three individual experiments. □ AMLW : *Mangifera indica* L. leaf extracted with water (A), ■ AMLE : *Mangifera indica* L. leaf extracted with 70% ethanol (B).

NO를 계속 생성한다. iNOS는 다양한 조직에서 염증 유발 물질인 LPS나 염증성 cytokine 등에 의해 활성화되어 많은 양의 NO를 생성하여 세포독성, 조직 손상, 염증성 질병 등과 같은 인체에 유해한 작용을 나타낸다[10].

본 연구에서는 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물이 염증 발현 인자인 iNOS 및 COX-2의 단백질과 mRNA에 미치는 영향을 측정하였다.

단백질 발현량을 확인하기 위해 RAW 264.7 cells에 5, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 샘플을 농도별로 처리한 후 24시간 뒤에 western

blotting으로 iNOS와 COX-2 단백질 발현 측정 결과를 Fig. 5, Fig. 6과 같이 나타내었다. 이 때, 세포의 종류나 환경에서도 발현 정도의 차이가 거의 없는 housekeeping gene인 β -actin을 positive control로서 사용하였다. Fig. 5, Fig. 6에서 보는 바와 같이 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 RAW 264.7에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 농도가 높아짐에 따라서 억제됨을 확인하였다. 추출물별로 iNOS와 COX-2 인자를 확인한 결과, 애플망고 잎의 열수 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 59.7%, 70.3%의 발현 억제를 확인하

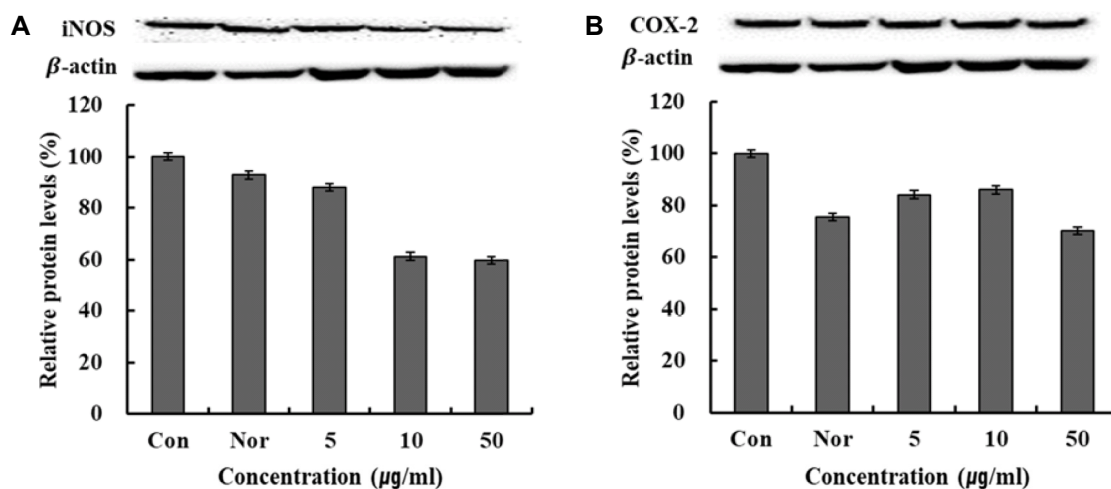


Fig. 5. iNOS, COX-2 protein expression rate of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf on macrophage cells (RAW 264.7). A: iNOS protein expression rate of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf. B: COX-2 protein expression rate of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/well) were started in LPS for 2 hr, the cells were treated with 5, 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf for 18h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

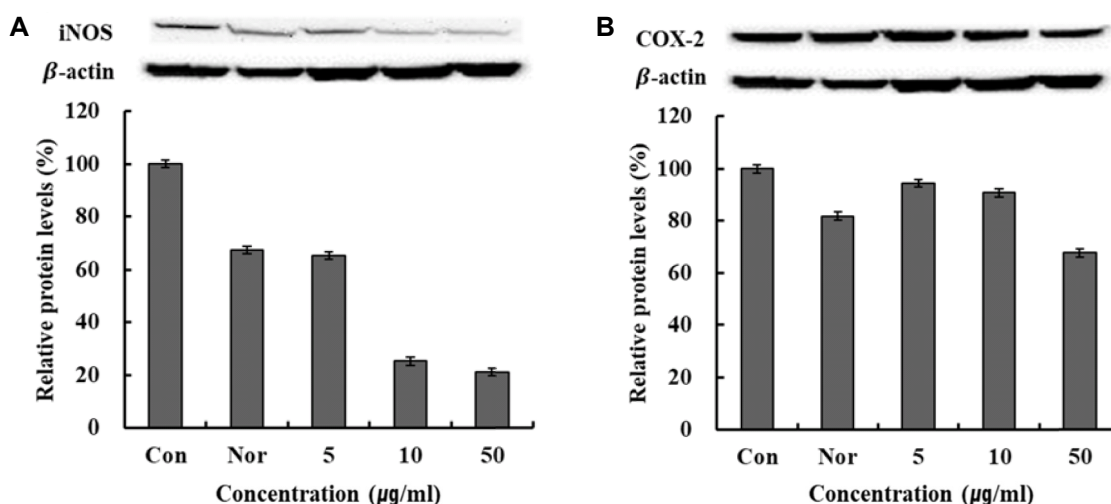


Fig. 6. iNOS, COX-2 protein expression rate of 70% ethanol extracts from *Mangifera indica* L. leaf on macrophage cells (RAW 264.7). A: iNOS protein expression rate of 70% ethanol extracts from *Mangifera indica* L. leaf. B: COX-2 protein expression rate of 70% ethanol extracts from *Mangifera indica* L. leaf. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/well) were started in LPS for 2 hr, the cells were treated with 5, 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf for 18h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

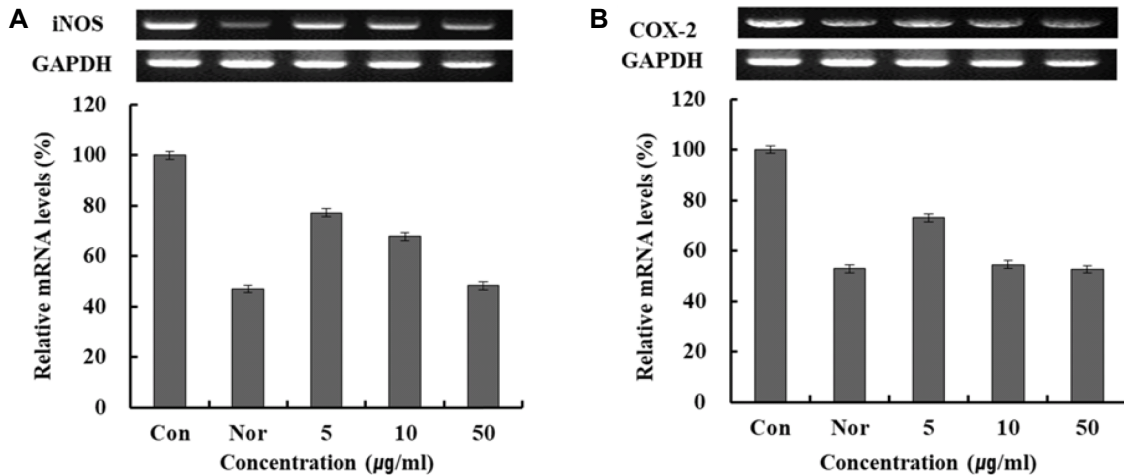


Fig. 7. iNOS, COX-2 mRNA expression rate of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf on macrophage cells (RAW 264.7). A: iNOS mRNA expression rate of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf. B: COX-2 mRNA expression rate of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/well) were started in LPS for 2 hr, the cells were treated with 5, 10 and 50 µg/ml of water extracts from *Mangifera indica* L. leaf for 18h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

였으며, 애플망고 잎의 에탄올 추출물 50 µg/ml 농도를 처리한 결과는 각각 21.1%, 67.8%의 발현 억제 효과를 보여주었다. 이와 같은 결과에 따라 애플망고 잎의 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 단백질 발현을 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

또한 본 연구에서는 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물이 염증 발현 인자인 iNOS 및 COX-2의 mRNA에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 cells에 5, 10, 50 µg/ml의 샘플을 농도별로 처리한 후 18시간 뒤에 PCR으로 mRNA 발현량을 측정하여 Fig. 7, Fig. 8과 같이 나타내었다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 housekeeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. Fig. 7, Fig. 8에서 보는 바와 같이 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물을 5, 10, 50 µg/ml의 농도로 처리한 RAW 264.7 cells에서 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현이 농도가 높아짐에 따라서 억제됨을 확인하였으며, 애플망고 잎의 열수 추출물의 50 µg/ml 농도에서 각각 48.29%, 52.56% 발현 억제를 나타냈으며, 애플망고 잎의 에탄올 추출물의 50 µg/ml 농도에서 각각 44.77%, 47.63% 발현 억제를 나타내었다. 애플망고 잎의 열수 추출물 보다 에탄올 추출물에서 염증인자의 mRNA 발현을 억제에 효과가 있는 것을 확인하였다.

이와 같은 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물의 염증인자 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 및 mRNA 발현 억제 효과 측정한 결과 우수한 억제 효과를 보임에 따라 항염증 관련 화장품 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

with the contents of this article.

References

1. Amasa, W., Santiago, D., Mekonen, S. and Ambelu, A. 2012. Are cosmetics used in developing countries safe? Use and dermal irritation of body care products in Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *J. Toxicol.* **2012**, 8-15.
2. Aniya, Y. and Naito, A. 1993. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 37-42, 1993.
3. Bae, I. S., Shim, M. J., Lee, J. Y. and Kim, Y. C. 2012. Application tests of phellodendrin cortex water extract as functional cosmetic raw materials. *J. Invest. Cosmetol.* **8**, 1-8.
4. Baek, S., Choi, J. H., Ko, S. H., Lee, Y. J., Cha, D. S., Park, E. Y., Kang, Y. G. and Jeon, H. 2009. Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Nardostachys Chinensis* in IFN- γ /LPS-stimulated peritoneal macrophage. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **23**, 853-859.
5. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1210.
6. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
7. Cho, Y. J., Ju, I. S., Kim, B. C., Lee, W. S., Kim, M. J., Lee, B. G., An, B. J., Kim, J. H. and Kwon, O. J. 2007. Biological activity of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 198-203.
8. Choi, S. Y., Cho, H. S. and Sung, N. J. 2006. The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from wild grape (*Vitis coignetia*) skin. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**,

- 961-966.
9. Folin, O. and Dennis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagent. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-243.
 10. Forstermann, U. and Sessa, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829-837.
 11. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
 12. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
 13. Hogquist, K. A., Baldwin, T. A. and Jameson, S. C. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 772-782.
 14. Jeong, S. J., Kim, K. H. and Yook, H. S. 2015. Whitening and antioxidant activities of solvent extracts from hot-air dried *Allium hookeri*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 832-839.
 15. Kader, K. N. and Coyle, C. H. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species: implications for cardiovascular device engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **83**, 138-144.
 16. Kumar, M. V., Shimokawa, T., Nagy, T. R. and Lane, M. D. 2002. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1921-1925.
 17. Kwon, Y. R. and Youn, K. S. 2017. Antioxidant and physiological activities of *Hijikia fusiforme* by extraction methods. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 631-637.
 18. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 230-242.
 19. Park, J. K., An, K. W. and Ahn, Y. S. 2010. Mango. Chonnam National University Press, Gwangju, Korea. 7-24.
 20. Roberta, R., Nicoletta, P., Anna, P., Ananth, P., Min, Y. and Catherine, R. E. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
 21. Ryu, J. H., Ahn, H. N., Kim, J. Y. and Kim, Y. K. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother. Res.* **17**, 485-489.
 22. Seong, R. C. and Rhee, C. 2007. Humans and Food. Korea University Press, Seoul, Korea. 8-109.
 23. Sujay, R., Souvik, B., Kakali, M., Saha, B. P. and Pulok, K. M. 2007. Oriental medicine mangifera indica. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **7**, 1-10.
 24. Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T. and Sawamura, M. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**, 206-209.
 25. Żukiewicz-Sobczak, W. A., Adamczuk, P., Wróblewska, P., Zwoliński, J., Chmielewska-Badora, J., Krasowska, E., Galińska, E. M., Cholewa, G., Piątek, J. and Koźlik, J. 2013. Allergy to selected cosmetic ingredients. *Postep. Derm. Alergol.* **30**, 307-310.

초록 : 애플망고 잎의 추출물의 항산화 및 대식세포(RAW 264.7)에서 iNOS, COX-2 발현 저해 효과

유단희¹ · 이인철^{2*}

(¹서원대학교 산학협력단, ²서원대학교 바이오코스메틱학과)

본 연구는 애플망고 잎 추출물의 항산화 및 항염증에 활성을 검증하여 연구하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법에 의해 측정하였다. 그 결과 애플망고 잎의 열수와 70% 에탄올 추출물은 각각 440.83±1.02, 475.63±1.3 mg/100 g TAE의 함량을 나타내었다. 항산화 활성을 측정하기 위해 전자공여능 측정과 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 라디칼 소거능 활성을 측정하였으며, 모든 추출물이 우수한 효과를 나타내었다. 대식세포내에서 애플망고 잎 추출물의 세포 생존율을 MTT assay의 방법으로 측정하였다. 세포의 독성이 나타나지 않은 농도구간에서 이하의 세포실험을 진행하였다. 항염증 활성을 효과적으로 측정하기 위해 LPS로 염증반응을 유도시키고 Griess assay를 이용해 nitric oxide를 측정하였다. 그 결과 애플망고 잎 추출물은 농도의존적으로 NO의 생산을 억제함을 나타내었다. LPS로 유도된 RAW 264.7세포에서 iNOS와 COX-2의 염증인자 생성억제를 mRNA발현 억제를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 애플망고 잎 추출물의 항산화 및 항염증 활성의 우수한 효과를 확인하였고, 그 결과 천연소재로서의 유용성과 함께 화장품의 기능성소재로서의 활용가능성을 확인하였다.