

# RAW 264.7 세포에 대한 NF- $\kappa$ B와 MAPK 활성화 억제를 통한 개다래 열매 에탄올 추출물의 항염증 효과

박충무<sup>1,3</sup> · 윤현서<sup>2,3+</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 임상병리학과 교수, <sup>2+</sup>동의대학교 치위생학과 교수, <sup>3</sup>동의대학교 기능성 소재연구소

## Anti-inflammatory Effects of Actinidia Polygama Ethanol Extract in through the Regulated NF- $\kappa$ B and MAPKs Activation in LPS Stimulated RAW 264.7 Cells

Chung-Mu Park, Ph.D<sup>1,3</sup> · Hyun-Seo Yoon, Ph.D<sup>2,3+</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Professor

<sup>2+</sup>Dept. of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Professor

<sup>3</sup>The Research Institute Health for Functional Material, Dong-Eui University

### Abstract

**Purpose** : The fruit of Actinidia polygama has been used in oriental medicine for the treatment of gout, rheumatoid arthritis, and inflammation. Though A. polygama exhibited anti-inflammatory activity in RAW 264.7 cells and carrageenan-induced rat paw edema, the exact mechanism for anti-inflammation was not evaluated yet. In this study, the anti-inflammatory mechanisms of A. polygama ethanol extract (APEE) in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 cells.

**Methods** : WST-1 assay was applied to analyze the cytotoxic effect of APEE in RAW 264.7 cells. The productions of nitric oxide (NO) and prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> were analyzed by the Griess reaction and enzyme immunoassay (EIA) assay, respectively. In addition, protein expressions for inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 were measured by Western blot analysis. The activated status of an inflammatory transcription factor, NF- $\kappa$  B, and its upstream signaling molecules, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), was also evaluated by Western blot analysis.

**Results** : As a result, APEE treatment did not exhibit any cytotoxicity until the concentration of 200  $\mu$ g/ml. APEE treatment significantly inhibited NO and PGE<sub>2</sub> productions as well as their enzymes, iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner. The inflammatory transcription factor, NF- $\kappa$  B, was also attenuated by APEE treatment. In addition, the phosphorylated status of MAPKs such as extracellular regulated kinase (ERK), c-jun NH2 kinase (JNK), and p38, were significantly diminished by APEE treatment in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

**Conclusion** : Consequently, APEE treatment significantly attenuated the production of inflammatory mediators and their enzyme expressions in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The inflammatory transcription factor, NF- $\kappa$  B, and upstream signaling molecules, MAPKs, were also significantly attenuated by APEE treatment in LPS-activated RAW 264.7 cells. These results indicate that APEE might be a candidate to be utilized as a promising candidate for the treatment of inflammatory disorders.

**Key Words** : actinidia polygama, inflammation, mitogen-activated protein kinase, nuclear factor kappa B

<sup>+</sup>교신저자 : 윤현서, yoonhs@deu.ac.kr

제출일 : 2023년 4월 15일 | 수정일 : 2023년 5월 6일 | 게재승인일 : 2023년 5월 19일

## I. 서론

### 1. 연구의 배경 및 필요성

염증은 신체 내외부로부터의 물리·화학적 자극이나 병원체의 감염 등으로 인해 발생한 조직의 손상을 치유·재생하는 과정을 일컫는다(Lawrence 등, 2002). 이러한 자극으로 발생하는 염증은 급성의 상태에서 대부분 치유되는 것이 일반적이거나 그 중 일부는 만성염증으로 이환되기도 하여 심혈관질환, 암을 일으키기도 한다(Rahaman 등, 2023).

그람 음성 세균의 세포벽 구성 성분 중 하나인 lipopolysaccharide(LPS)는 대식세포의 세포막에 존재하는 CD14와 결합 후 toll like receptor 4(TLR4)를 활성화시키고, 상위 신호전달물질인 mitogen activated protein kinases(MAPKs)의 인산화를 통해 비활성형으로 존재하던 nuclear factor(NF)- $\kappa$  B와 같은 염증 전사인자인 활성을 유도한다.

활성화된 NF- $\kappa$  B는 핵내로 이동하여 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 그리고 염증 매개물질인 nitric oxide(NO)와 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)의 생성을 매개하는 효소인 inducible NO synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현을 촉진할 수 있는 전사체를 과발현시킨다(Wu 등, 2023).

과발현된 전사체는 세포질내에서 과량의 염증성 사이토카인과 염증 매개물질로 다량 생산되고 이들은 다시 조직내의 과도한 염증 반응을 유도함으로써 부종과 통증의 원인이 되고 염증 반응을 심화시킨다(Kawada 등, 2012). 그러므로 이러한 염증반응을 제거하고 완화하기 위하여 많은 항염증제가 개발되고 있으나 부작용이 지속적으로 보고되고 있어 대안으로 천연물에서 유래한 항염증 후보 물질들이 많이 연구되고 있다(Kundu & Surh, 2008; Surh 등, 2003).

개다래(*actinidia polygama*) 열매는 오랫동안 동양의학에서 통증을 완화하고, 통풍, 류마티스성 관절염을 치료하는데 이용되어 왔다(Kim 등,2023). 개다래 열매 추출물은 ovalbumin으로 유도된 알러지성 기도염증 동물모델에서 인터루킨 생성을 조절함으로써 항염증과 항천식

효과를 보였다(Lee 등, 2006). 특히 LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 NO와 PGE<sub>2</sub>의 농도를 유의적으로 억제하였고 carageenan으로 유도한 paw edema 또한 억제하는 결과를 보였으나 정확한 항염증 기전에 대한 연구는 진행되지 못하였다(Kim 등 2003).

### 2. 연구의 목적

본 연구에서는 개다래 열매 추출물이 LPS로 자극된 생쥐 대식세포인 RAW 264.7세포에서의 항염증 기전을 분석함으로써 개다래 열매 추출물의 항염증 후보물질로서의 가치를 확인해보고자 한다.

## II. 연구방법

### 1. 실험재료

개다래 열매 추출물은 천일한약방(Daegu)에서 건초를 구입하여 건조된 시료 100 g을 분쇄한 후 주정(에탄올)을 1:4 (v/v)의 비율로 가해 초음파추출기(Powersonic410, Hhashin instrument Co., Korea)로 30분간 추출한 후, 80℃에서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 또한 여과된 추출액은 진공농축기(N-110, Eyela Co., Japan)로 완전 농축하여 테시케이터에 24시간 보관 후 추출물 무게를 측정하였으며 회수율은 16.7이었다.

### 2. 세포배양

실험에 사용한 생쥐 대식세포인 RAW 264.7 세포 한국세포주은행(No. 40017, KCLB Korea)에서 분양받아 10 % fetal bovine serum(FBS, Cytiva, USA)를 영양성분으로 추가하고, 항생제인 100 unit penicillin과 streptomycin(cytiva)을 첨가하여 complete medium인 DMEM 배지를 조성하여 사용하였고, 배양은 가습된 37 ℃, 5 % CO<sub>2</sub>의 조건에서 실시하였다. 개다래 열매 에탄올 추출물(*A. polygama* ethanol extract; APEE)은 건조하여 분쇄한 후 70 % 에탄올을 사용하여 50 ℃에서 24시간동안 추출하였다. 추출물은 1  $\mu$  m 필터를 사용하여 여과한 후 감압 농축하였다. 시료는 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, USA)에 용해

하여 실험에 사용하였다. Western blot 분석에 사용한 1차 항체인 iNOS, COX-2, phospho-p65, phospho-Akt, Akt, phospho-extracellular signal-regulated kinase(ERK), ERK, phospho-c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase(JNK), JNK, phospho-p38, p38, actin과 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG 항체는 cell signaling technology(USA)에서 구입하였다.

### 3. 세포독성 평가

세포독성은 EZ-Cytox cell viability assay kit(Daeil Lab. Service, Korea)을 사용하여 분석하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 파종하여 24시간동안 배양하고 APEE를 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 그리고 2시간 후 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 20시간동안 다시 배양하였다. 세포생존율의 분석을 위해 각 well마다 EZ-Cytox 시약 10  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 1시간 동안 배양한 후 microplate reader(BioTek Instruments Inc., USA)로 480 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

### 4. Nitrite 농도 측정

Nitrite 생성억제 효과의 분석을 위하여 RAW 264.7 세포를 24 well plate에 파종하여 24시간 동안 배양하고 APEE를 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 그리고 2시간 후 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 20시간 동안 다시 배양하여 염증 반응을 유도하였다. Nitrite의 농도 측정을 위해 100  $\mu\text{l}$ 의 배지 상등액과 동량의 Griess 시약을 혼합하고 실온에서 10분간 반응 후 550 nm의 파장에서 microplate reader(BioTek Instruments Inc., USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 5. PGE<sub>2</sub> 농도 측정

Nitrite 생성억제 효과의 분석을 위하여 RAW 264.7 세포를 24 well plate에 파종하여 24시간 동안 배양하고 APEE를 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 그리고 2시간 후 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 20시간 동안 다시 배양하여 염증 반응을 유도하였다. 생성된 PGE<sub>2</sub>의 농도 분석은 제조사(Cayman chemical, USA)에서

제공하는 표준 프로토콜을 따라 진행하였다.

### 6. 면역형광 분석

RAW 264.7세포를 cell culture slide(SPL life science, Pocheon, Korea)에 파종하여 24시간 동안 배양하고 APEE를 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 그리고 2시간 후 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 20시간 동안 다시 배양하여 COX-2 발현을 유도하였다. 그 후 세포는 4 % paraformaldehyde로 10분간 실온에서 고정하고 .25 % Triton X-100에서 10분 동안 permeabilization을 진행하였다. 그리고 30분간 1 % bovine serum albumin(BSA)가 포함된 PBST로 blocking을 진행하고 1차 항체는 1:500의 비율로 희석 후 24시간동안 4 °C에서 반응을 하고 Alexa fluor 594(cell signaling technology)가 결합된 2차 항체로 보합반응을 하였다. 세포의 핵은 DAPI로 염색하고 형광현미경(DM2500, Leica Microsystems, Germany)으로 사진을 촬영하였다.

### 7. Western blot 분석

RAW 264.7세포를 100-mm dish에 파종하고 24시간 동안 배양하여 부착하고 APEE를 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 그리고 2시간 후 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 20시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 RAW 264.7세포를 PBS로 2회 세척하고 200  $\mu\text{l}$ 의 protein lysis buffer(PRO-PREP, Intron Biotechnology, Korea)로 세포내 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질의 농도는 bradford 법을 이용하여 결정하였다. 전기영동을 위하여 50  $\mu\text{g}$ 의 추출된 단백질이 포함된 시료를 4x laemmli buffer(Bio-Rad Laboratories, USA)와 섞고 준비된 10 % SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 하였다. 전기영동된 SDS-PAGE gel은 polyvinylidene fluoride(PVDF, Bio-Rad Laboratories, USA) membrane으로 이동시킨 후 5 % non-fat dry milk가 포함된 PBST를 blocking 용액으로 사용하여 실온에서 1시간 동안 blocking을 진행하였다. 그 후 membrane은 1:1,000의 비율로 희석된 1차 항체와 4 °C에서 24시간 동안 반응을 진행하고, 다시 1:1,000의 비율로 희석한 2차 항체와 실온에서 2시간 동안 보합반응을 진행하였다. 2차 항체까지 보합반응이 완료된

membrane은 enhanced chemiluminescence solution(ECL, Santa cruz biotechnology)을 이용하여 반응을 유도한 후 ChemiDoc XRS+ system(Bio-Rad laboratories)을 이용하여 단백질의 발현 변화를 측정하고 Gel Doc EQ system(Bio-Rad laboratories)으로 단백질 발현도를 정량 분석하였다.

4. 통계적 방법

모든 실험 결과는 3회 반복 시행한 후 SPSS 통계 프로그램(version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균 ± 표준편차(mean ±SD)로 나타냈다. 실험군간의 유의성 검증을 위하여 일원배치 분산분석법(one-way ANOVA)을 이용하였고, Duncan's multiple range test를 사후 검증법으로 진행하였다.

III. 결과

1. APEE의 NO, PGE2 생성과 이의 매개 효소인 iNOS와 COX-2의 발현 억제 효과

APEE가 RAW 264.7 세포에 미치는 독성을 확인하기 위하여 WST-1 assay를 시행하였고, 그 결과는 Fig. 1에서 보는 것과 같이 본 실험에서 사용한 농도인 25, 50, 100, 200 µg/ml의 범위에서는 유의미한 세포 생존율의 변화는 없는 것으로 확인하였다. 그리고 APEE가 LPS에 의해 유도된 염증에 대한 억제효과를 보이는지의 여부를 확인하기 위하여 NO와 PGE2의 생성 억제량을 확인한 결과, Fig 2에서 보는 바와 같이 APEE의 처리로 인해 NO와 PGE2의 생성이 농도 의존적으로 유의미하게 감소하는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 이들의 합성을 매개하는 효소인 iNOS와 COX-2의 발현 또한 Fig 3에서와 같이 APEE의 처리로 인해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 그리고 COX-2의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 결과 Fig 4에서 보는 것과 같이 200 µg/ml의 APEE를 처리한 RAW 264.7 세포는 COX-2의 발현이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 APEE는 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 억제함으로써 염증을 완화할 수 있는 능력이 있음을 알 수 있었다.

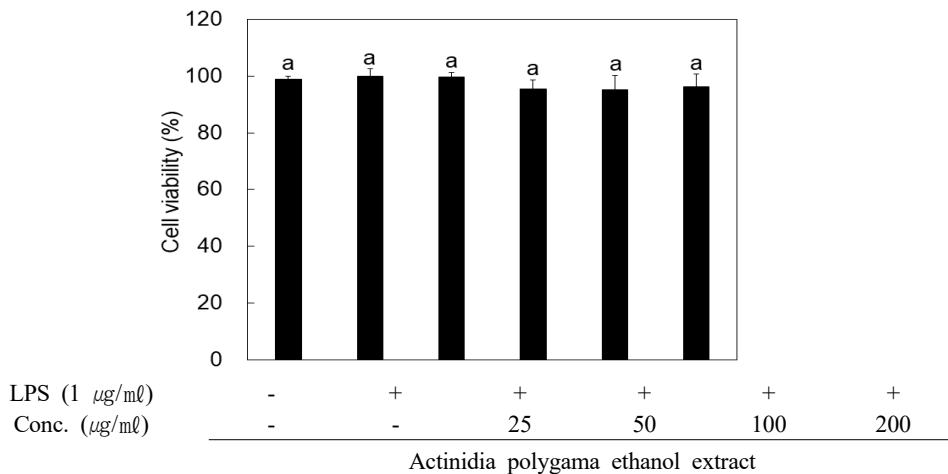


Fig 1. APEE treatment showed no cytotoxic effect on RAW 264.7 cells Cytotoxicity was determined by WST-1 assay and the result is expressed as ratio compared to the control group (LPS treated cells), Data represent the mean±SD of triplicate experiments, Values sharing the same superscript are not significantly different at p<.05 by Duncan' s multiple range test

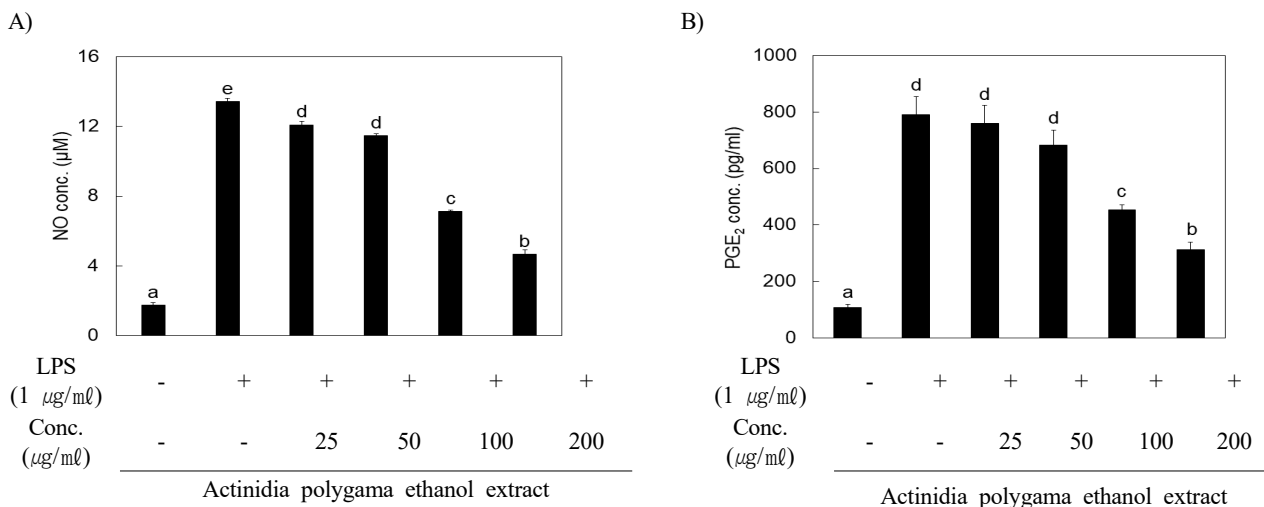


Fig 2. PYEE significantly attenuated NO and PGE<sub>2</sub> productions in LPS stimulated RAW 264.7 cells. Panel A and B show the concentrations of NO and PGE<sub>2</sub> in LPS stimulated RAW 264.7 cells. NO and PGE<sub>2</sub> concentrations were decided by the Griess reaction and EIA assay, respectively. Data represent the mean±SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at p<.05 by Duncan's multiple range test

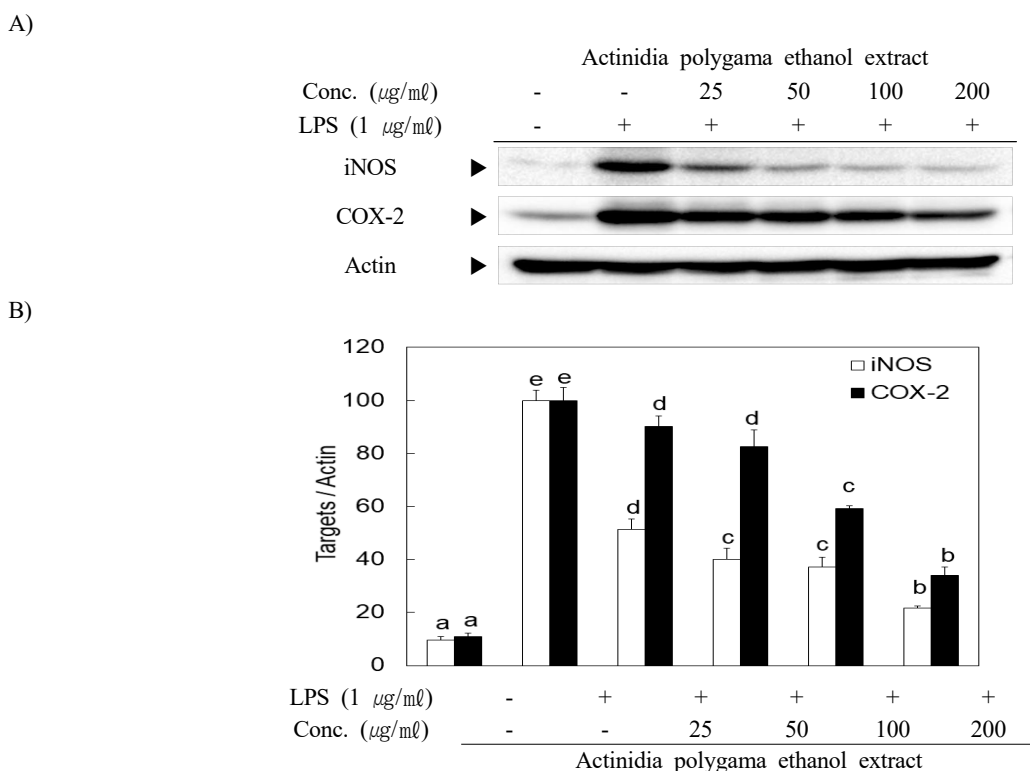


Fig 3. PYEE attenuated protein expression levels of iNOS and COX-2 in LPS stimulated RAW 264.7 cells. Panel A shows protein expression levels of iNOS and COX-2 by APEE treatment. All signals were normalized to protein levels of actin, an internal control, and expressed as a ratio (Panel B). Data represent the mean±SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at p<.05 by Duncan's multiple range test (APEE; A. polygama ethanol extract, LPS; lipopolysaccharide, iNOS; inducible nitric oxide synthase, COX-2; cyclooxygenase-2)

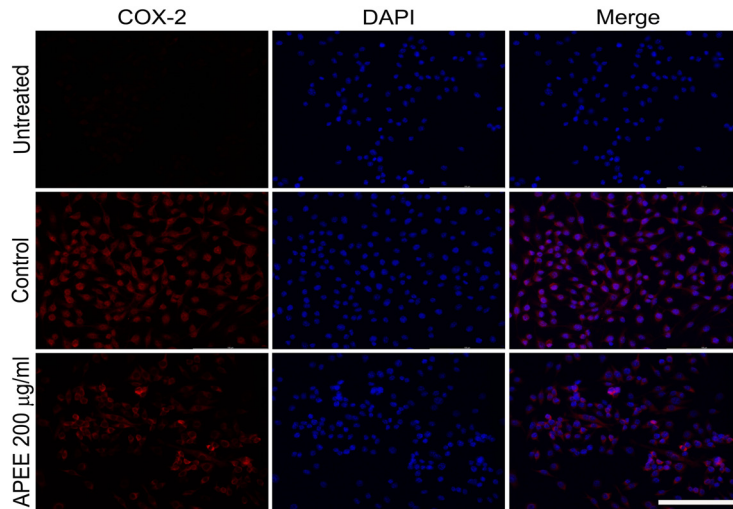
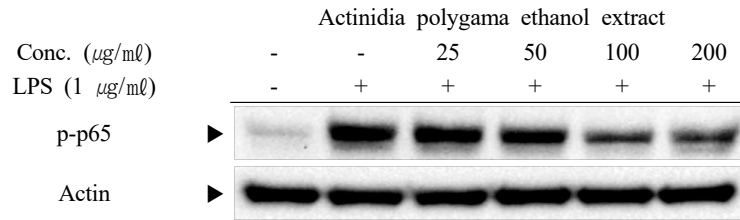


Fig 4. APEE inhibited COX-2 expression in LPS stimulated RAW 264,7 cells. The expression level of COX-2 was visualized by immunofluorescent analysis with anti-COX-2 antibody-bound Alexa Fluor 594 (red)-conjugated secondary antibody. The nuclei were stained by DAPI (blue). The scale bar is 100  $\mu\text{m}$  (APEE; A. polygama ethanol extract, LPS; lipopolysaccharide, COX-2; cyclooxygenase-2)

A)



B)

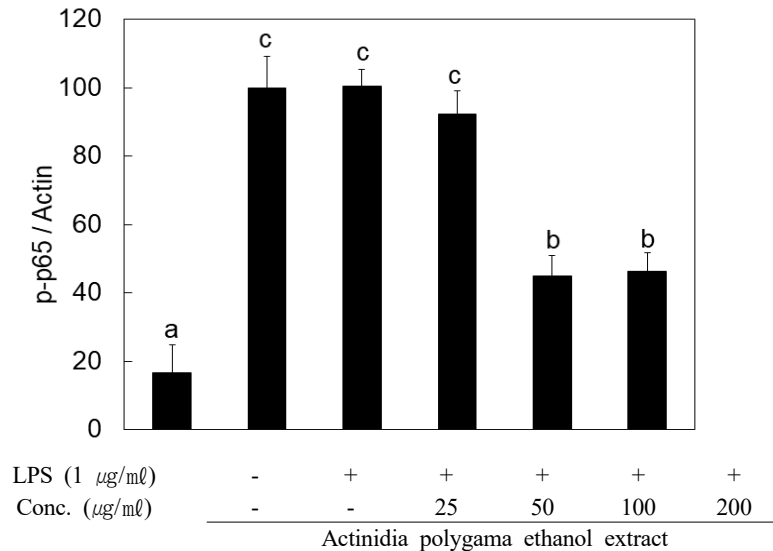


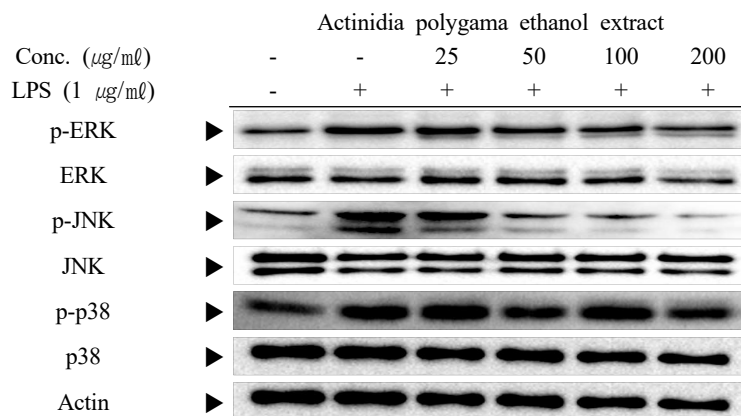
Fig 5. PYEE inhibited phosphorylation of NF- $\kappa$  B in LPS stimulated RAW 264,7 cells. Panel A shows phosphorylated status of p65 by APEE treatment. All signals were normalized to protein levels of actin, an internal control, and expressed as a ratio (Panel B). Data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at  $p < .05$  by Duncan's multiple range test (APEE; A. polygama ethanol extract, LPS; lipopolysaccharide, NF- $\kappa$  B; nuclear factor- $\kappa$  B)

## 2. APEE의 NF- $\kappa$ B와 MAPKs의 발현 조절 효과

LPS로 인해 야기되는 iNOS와 COX-2의 과발현은 염증성 전사인자인 NF- $\kappa$  B의 활성화에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. NF- $\kappa$  B는 세포질내에서 비활성형으로 존재하다가 염증성 자극으로 인해 NF- $\kappa$  B의 subunit인 p65가 인산화되어 활성화가 이루어지고, 활성화된 p50과 p65 dimer는 핵내로 이동하여 염증매개인자들의 합성을 위한 promoter region에 결합함으로써 이들의 전사를 강하게 유도한다. 본 실험에서는 Fig 5에서 보는 것과 같이 APEE가 LPS의 처리로 활성화된 NF- $\kappa$  B의 구성단백질인 p65의 인산화를 억제함으로써 염증을 억제한다는 것

을 알 수 있었고, 또한 NF- $\kappa$  B의 상위신호전달체계인 MAPKs의 인산화의 정도 또한 Western blot으로 분석하였다. LPS로 인해 인산화가 유도된 ERK, JNK, p38의 활성 억제 정도를 확인한 결과 Fig 6과 같이 APEE는 p38의 인산화는 거의 억제하지 못한 반면 ERK의 인산화는 약하게, JNK의 인산화는 유의하게 억제하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과를 통해 APEE는 MAPKs 중 JNK와 NF- $\kappa$  B의 인산화를 억제함으로써 염증을 조절한다는 것을 알 수 있었다.

A)



B)

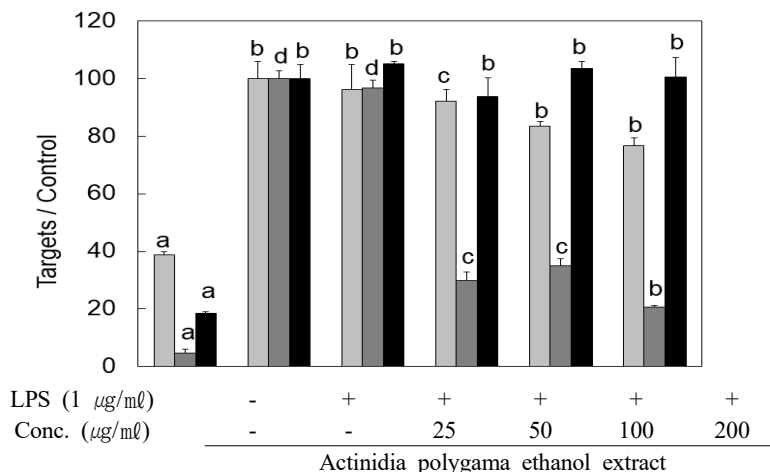


Fig 6. PYEE inhibited phosphorylation of ERK and JNK in LPS stimulated RAW 264.7 cells. Panel A shows phosphorylation levels of ERK, JNK and p38 by APEE treatment. All signals were normalized to protein levels of actin, an internal control, and expressed as a ratio (Panel B). Data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at  $p < .05$  by Duncan's multiple range test (APEE; A. polygama ethanol extract, LPS; lipopolysaccharide, ERK; extracellular signal-regulated kinase, JNK; c-Jun NH2-terminal kinase)

#### IV. 고찰

본 연구에서는 개다래 열매 에탄올 추출물(APEE)의 항염증 효과를 확인하기 위하여 생쥐 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도하고, 염증 매개 물질인 NO, PGE2의 생성과 이들의 생산을 유도하는 효소인 iNOS, COX-2의 발현정도를 Western blot으로 분석하였다. 그리고 이들 염증 매개 물질의 발현을 조절하는 염증 매개 전사인자인 NF-κ B와 그 상위 신호전달 물질인 MAPKs의 인산화 또한 Western blot으로 분석함으로써 APEE가 RAW 264.7 세포에서 보이는 정확한 항염증 기전을 확인하고자 하였다.

대식세포가 LPS와 같은 염증 유발물질에 노출되면 NO와 PGE2등이 과량 분비된다. 본 연구에서 염증의 지표물질로 사용된 NO는 L-arginine으로부터 NOS에 의해 합성되고, neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), iNOS의 세가지가 존재하여 이 중 iNOS에 의한 NO 생성 축진은 조직손상, 유전자 변이 등의 손상을 유발하여 염증 반응을 촉진시키기도 한다(Lee 등 2011; Nathan, 1992). COX-2는 prostaglandin을 arachidonic acid로부터 생성하는 효소이고 생성된 PGE2는 만성 염증 조직에서의 과발현이 주로 관찰된다(Na & Surh, 2006). 따라서 본 연구에서 APEE는 NO와 PGE2의 생성과 유전자 발현을 농도의존적으로 억제하는 결과를 보인 것은 등골나무 추출물(Lee 등, 2011)과 유사한 결과를 보였으며 iNOS와 COX-2의 발현 조절을 통해 염증 매개 물질인 NO와 PGE2생성을 유의적으로 억제할 수 있는 물질은 염증을 완화할 수 있는 활성을 가진 항염증 후보물질이 될 수 있다.

염증성 전사인자인 NF-κ B는 면역반응, 세포분화 등과 같은 다양한 세포의 변화에 관여하는 전사인자로 세포질 내에서 p50, p65가 Iκ B에 결합된 비활성의 형태로 존재하다가 LPS와 같은 염증성 자극으로 인산화된 Iκ B가 분해되면서 활성형으로 바뀌게 된다(Surh, 2003). 활성화된 NF-κ B는 핵내로 이동한 후 iNOS와 COX-2의 전사를 위한 promoter부위에 결합함으로써 발현을 촉진시킨다(Surh, 2003). 그러므로 NF-κ B 활성을 조절함으로써 염증 매개 물질의 생성을 억제하게 되면 다양한 염증

성 질환의 치료에 효과적인 소재가 될 수 있으리라 생각한다.

세포내 존재하는 다양한 신호전달 물질 중 MAPKs는 세포 분화, 증식, 사멸과 같은 다양한 세포내 반응의 조절에 관여하는 효소로서 염증 전사인자인 NF-κ B의 활성화에 영향을 주는 대표적인 신호전달물질이다. MAPKs 중 ERK는 세포 외부로부터의 자극에 대해 반응하고 전사인자를 활성화하는 반면, JNK와 p38은 LPS와 같은 염증 유발물질이나 세포내 스트레스를 유발하는 물질에 의해 활성화되는 것으로 보고되고 있다(Hidding 등, 2002; Robinson & Cobb, 1997; Waetzig 등, 2005). 본 실험에서는 APEE가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증에서 MAPKs 인산화에 미치는 영향을 Western blot으로 분석한 결과 APEE는 p38의 활성화에는 영향을 미치지 못하였으나 ERK의 인산화는 약하게, JNK의 활성화는 강하게 억제하는 것을 알 수 있었다. 큰열매모자반 에탄올추출물(Cheon 등, 2017)과 단풍잎돼지풀 추출물(Yoo & Lee, 2020)의 결과와 동일한 결과를 보였다. 이 결과를 통해 APEE는 ERK, JNK의 활성화 억제를 통해 NF-κ B 활성을 조절함으로써 LPS로 인해 야기된 RAW 264.7 세포의 염증을 억제하는 것으로 생각된다.

결론적으로 APEE는 RAW 264.7세포에서 LPS에 의해 과량 생성된 NO, PGE2의 농도와 매개하는 유전자인 iNOS와 COX-2 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 그리고 이 활성화는 염증 전사인자인 NF-κ B와 신호전달 물질인 ERK, JNK의 활성화 억제를 통해 유도되는 것을 알 수 있었다.

#### V. 결론

본 연구에서는 생쥐 대식세포인 RAW 264.7세포에 LPS를 이용하여 염증 반응을 유도하고 개다래 에탄올 추출물(APEE)의 항염증 기전을 분석하였다. 실험 결과 LPS에 의해 유도된 NO와 PGE2의 생성 뿐만 아니라 이들을 매개하는 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 또한 APEE의 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. 또한 염증성 전사인자인 NF-κ B 또한 APEE의 처리로



인해 유의적으로 억제되는 것을 발견할 수 있었다. 그리고 이들의 발현을 조절하는 상위신호전달 체계인 MAPKs 중 p38의 인산화는 억제되지 않았고, ERK는 약하게, JNK의 인산화는 강하게 억제되었다. 결론적으로 APEE는 NF- $\kappa$ B와 ERK, JNK의 인산화를 억제하여 LPS로 인해 유도되는 염증 매개 물질인 NO, PGE2의 생성을 조절함으로써 염증을 억제하는 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Cheon JM, Kim HS, Choi EO, et al(2017). Anti-inflammatory activities of an ethanol extract of *Sargassum macrocarpum* in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Life Sci*, 27(12), 1437-1444. <https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.12.1437>.
- Hidding U, Mielke K, Waetzig V, et al(2002). The c-Jun N-terminal kinases in cerebral microglia: immunological functions in the brain. *Biochem Pharmacol*, 64(5-6), 781-788. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01139-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01139-5).
- Kawada N, Moriyama T, Kitamura H, et al(2012). Towards developing new strategies to reduce the adverse side-effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Exp Nephrol*, 16(1), 25-29. <https://doi.org/10.1007/s10157-011-0492-3>.
- Kim YJ, Lee JO, Kim SY, et al(2023). Effect of A. polygama APEE (actinidia polygama ethanol extract) or APWE (actinidia polygama water extract) on wrinkle formation in UVB-irradiated hairless mice. *BJ J Cosmet Dermatol*, 22(1), 311-319. <https://doi.org/10.1111/jocd.14925>.
- Kim YK, Kang HJ, Lee KT, et al(2003). Anti-inflammation activity of actinidia polygama. *Arch Pharm Res*, 26(12), 1061-1066. <https://doi.org/10.1007/BF02994759>.
- Kundu JK, Surh YJ(2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*, 659(1-2), 15-30. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.002>.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW(2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2(10), 787-795. <https://doi.org/10.1038/nri915>.
- Lee HN, Lim DY, Lim SS, et al(2011). Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. *Korean Soc Food Sci Technol*, 43(1), 65-71. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.1.065>.
- Lee YC, Kim SH, Seo YB, et al(2006). Inhibitory effects of actinidia polygama extract and cyclosporine a on OVA-induced eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Int Immunopharmacol*, 6(4), 703-713. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.10.007>.
- Na HK, Surh YJ(2006). Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol Nutr Food Res*, 50(2), 152-159. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500154>.
- Nathan C(1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6(12), 3051-3064.
- Rahaman MM, Hossain R, Herrera-Bravo J, et al(2023). Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: an update. *Food Sci Nutr*, 11(4), 1657-1670. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3217>.
- Robinson MJ, Cobb MH(1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2), 180-186. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80061-0).
- Surh YJ(2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 768-780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>.
- Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, et al(2005). c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*, 50(3), 235-246. <https://doi.org/10.1002/glia.20173>.
- Wu J, Mo J, Xiang W, et al(2023). Immunoregulatory effects of tetra stigma hemsleyanum polysaccharide via TLR4-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in Raw264.7 macrophages. *Biomed Pharmacother*, 161,

Printed Online. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114471>.  
Yoo DH, Lee JY(2020). Anti-inflammatory activities

verification of ambrosia trifida L. extract in RAW 264.7 cells. *Microbiol Biotechnol Letters*, 48(1), 79-89. <http://doi.org/10.4014/mbl.1910.10004>.