

청견 잎 에탄올 추출물의 NF- κ B와 MAPK 조절을 통한 항염증 효과

박충무^{1,3} · 윤현서^{2,3*}

¹동의대학교 임상병리학과 교수, ^{2*}동의대학교 치위생학과 교수, ³동의대학교 기능성소재연구소

Anti-inflammatory Effects of Kiyomi (*Citrus unshiu* × *C. sinensis*) Leaf Ethanol Extract Via the Regulation of NF- κ B and MAPKs in LPS Induced RAW 264.7 Cells

Chung-Mu Park, Ph.D^{1,3} · Hyun-Seo Yoon, Ph.D^{2,3*}

¹*Dept. of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Professor*

^{2*}*Dept. of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Professor*

³*The Research Institute for Functional Health Materials, Dong-Eui University*

Abstract

Purpose : Though other *Citrus* spp. have reported their anti-inflammatory and antioxidative activities in previous studies, the biological activity of Kiyomi (*Citrus unshiu* × *C. sinensis*) has not been reported yet. Therefore, this study attempted to analyze the anti-inflammatory mechanisms of Kiyomi leaf ethanol extract (KLEE) in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 cells.

Methods : The cytotoxic effect of KLEE in RAW 264.7 cells was determined by WST-1 assay. Bacterial endotoxin, the concentration of nitric oxide (NO) was analyzed by the Griess reaction. In addition, Western blot analysis was applied to measure the protein expression level of inducible NO synthase (iNOS). The phosphorylated status of the critical inflammatory transcription factor, nuclear factor (NF)- κ B, and its upstream signaling molecules, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt as well as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), were also measured by Western blot analysis.

Results : KLEE was not cytotoxic up to a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and protein expression levels of iNOS and cyclooxygenase (COX)-2, enzymes that counteract NO and prostaglandin (PG) E2 production, were inhibited by KLEE treatment. The phosphorylated status of PI3K/Akt as well as MAPKs including extracellular regulated kinase (ERK), c-jun NH2kinase (JNK), and p38, were significantly attenuated by KLEE treatment in LPS stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, one of phase II enzymes, heme oxygenase (HO)-1 which has known for its anti-inflammatory capacity, was strongly induced by KLEE treatment.

Conclusion : Consequently, KLEE treatment significantly attenuated the production of NO as well as the expression levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The inflammatory transcription factor, NF- κ B, as well as its upstream signaling molecules, PI3K/Akt and MAPKs, were also diminished by KLEE treatment with statistical significance in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These results suggest that KLEE might be a promising candidate for the attenuation of inflammatory disorders.

Key Words : cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, Kiyomi leaf ethanol extract, mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- κ B

*교신저자 : 윤현서, yoonhs@deu.ac.kr

I. 서론

1. 연구의 배경 및 필요성

신체 외부에서 발생하는 다양한 물리·화학적 자극과 병원체의 침입에 대응하기 위하여 면역 세포들이 많은 종류의 염증 매개 물질들을 분비함으로써 손상된 조직을 회복하기 위한 일련의 과정을 염증반응이라고 한다 (Lawrence 등, 2002). 이러한 염증반응에 관여하는 주요한 면역 세포 중 하나인 대식세포는 세포 내·외부로부터의 자극이나 병원체에 의해 활성화되어 과량의 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 와 같은 염증성 사이토카인과 염증 매개 물질인 nitric oxide(NO), prostaglandin(PG) E₂를 생성한다(Wautier 등, 2023). 급성의 상태로 발생하는 대다수의 염증은 빠르게 치유되어야 하는 것이 보통이지만 만성으로 이환될 경우 세계보건기구(world health organization)에서도 경고하는, 인류의 건강을 위협하는 질환을 유발하는 가장 주요한 원인이 된다(Pahwa 등, 2022). 특히 만성 염증은 당뇨, 심혈관 질환, 관절염, 만성폐쇄성폐질환 등의 다양한 전신질환을 유발하기 때문에 만성화되기 전에 염증을 조절하는 것이 무엇보다 중요하다(Barcelos 등, 2019; Deepak 등, 2019; Tsai 등, 2019).

Gram 음성 세균의 세포벽을 구성하는 내독소 성분인 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성화된 대식세포는 인산화를 통해 세포내 신호전달물질인 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)와 mitogen activated protein kinase(MAPK)를 활성화시키고, nuclear factor (NF)- κ B와 같은 염증 전사인자의 활성화 또한 유도하는 것으로 알려져 있다(Surh, 2003). NF- κ B와 같은 전사인자는 염증 매개 물질의 생성을 매개하는 효소인 inducible NO synthase(iNOS), cyclooxygenase(COX)-2와 염증성 사이토카인의 발현을 유도하는 역할을 한다(Wu 등, 2023). 이 과정을 통해 세포내에서 과량으로 생성된 염증성 사이토카인과 염증 매개 물질들은 다시 조직 내에서 염증 반응을 유발함으로써 염증을 심화시킨다(Kawada 등, 2012). 또한 항산화 효소로 알려진 heme oxygenase(HO)-1는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할 뿐만 아니라 항염증 효과도 나타내는 것으로 보고되고 있다(Prakash 등, 2023).

따라서 염증반응을 초기에 조절함으로써 만성으로의 이환을 억제하는 것이 무엇보다 중요한 부분이기 때문에 염증반응을 완화하기 위한 소재의 개발이 계속되고 있다. 그러나 이들로 인한 부작용 또한 지속적으로 보고되고 있어 항염증 효과가 뛰어나고 부작용이 적은 천연물 유래의 소재들이 대안으로 연구되고 있다(Kundu & Surh, 2008; Surh, 2003).

우리나라 과일 생산의 25 %를 차지하는 감귤류는 운향과(Rutaceae)의 감귤속(Citrus), 금강속(Fortunella), 탕자속(Poncirus)에 속하는 식물의 열매를 총칭하는 말이다 (Penjor 등, 2013). 그리고 감귤 속에는 만다린(mandarin), 오렌지(orange), 레몬(lemon), 자몽(grapefruit), 그리고 라임(lime) 등이 속하고 이들의 교잡으로 탄골(tangor, Citrus reticulata x C. sinensis), 탄젤로(tangelo, C. reticulata x C. maxima) 등과 같은 다양한 변종들이 만들어졌다(Hong 등, 2016). 이중 탄골인 청견(Kiyomi)은 1949년 일본에서 온주밀감(C. unshiu Marcov)과 트로비타 오렌지(C. sinensis Osbeck)를 교잡하여 만들어졌고 1978년 한국으로 들어왔다(Song, 2008). 청견은 껍질이 얇고 부드러우며 오렌지처럼 달콤하고 상큼할 뿐만 아니라 과즙 또한 풍부하다(Rural development administration, 2020). 제주에서 생산되는 감귤 중 당유자(C. grandis Osbeck)의 경우 미숙과에 대한 항염증 및 항산화 활성(Lee 등, 2006; Lim 등, 2006), 그리고 당유자 잎 추출물의 항염증 활성 또한 분석되었으나(Yang, 2009), 많이 재배되고 있는 청견의 잎에 대한 생리활성은 보고되지 않았다.

2. 연구의 목적

본 연구에서는 청견 잎의 항염증 활성을 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에서 염증 매개 물질인 NO의 생성과 관련된 전사인자인 NF- κ B, 상위 신호전달물질인 PI3K/Akt, MAPK의 활성 억제뿐만 아니라 항산화 효소 중 하나인 HO-1의 발현 유도를 통해 확인해보고자 하였다.

II. 연구방법

1. 세포배양 및 시약

생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포(한국세포주은행, No. 40017, KCLB Korea)는 10 % fetal bovine serum(FBS, Cytiva, USA), 100 unit/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin(Cytiva)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Cytiva)에 배양하였다. Kiyomi로도 불리는 청견(Citrus unshiu x C. sinensis) 잎 추출물(Kiyomi leaf ethanol extract; KLEE, No. JBRI-10179, Jeju biodiversity research center, Korea)은 제주생물다양성연구소에서 분양받아 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, USA)에 녹여 사용하였다. DMSO, LPS(*Escherichia coli* O111:B4), sodium nitrite, sulfanilamide 등의 시약은 Sigma-Aldrich에서, iNOS, COX-2, HO-1, phospho-p65, phospho-Akt, Akt, phospho-extracellular signal-regulated kinase(ERK), ERK, phospho-c-Jun NH2-terminal kinase(JNK), JNK, phospho-p38, p38, actin의 1차 항체와 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-rabbit IgG 항체는 Cell signaling technology(USA)에서 구입하여 분석에 이용하였다.

2. 세포독성 분석

RAW 264.7 세포에 대한 KLEE의 독성은 EZ-Cytox cell viability assay kit(Daeil Lab., Service, Korea)으로 분석하였다. 24-well plate에 파종된 RAW 264.7 세포에 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 KLEE를 처리하고 2시간이 지난 다음 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하고 다시 20시간 동안 배양하였다. 그리고 각 well마다 EZ-Cytox 시약 10 μl 를 첨가한 후 1시간 동안 배양하여 생성된 formazan을 480 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(BioTek Instruments Inc., USA).

3. Nitrite 농도 측정

RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 nitrite와 PGE2의 생성을 KLEE가 억제하는지 분석하기 위하여

24-well plate에 파종된 세포에 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 CEE를 처리하고 2시간 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS를 처리한 후 20시간동안 배양하여 염증을 유도하였다. 생성된 nitrite의 농도를 분석하기 위하여 배지 상등액 100 μl 와 동량의 Griess 시약을 혼합한 후 10분간 실온에서 반응을 진행하고 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(BioTek Instruments Inc., USA).

4. Western blot analysis

KLEE에 의해 조절되는 염증 관련 마커들의 발현을 분석하기 위하여 100-mm dish에 파종된 RAW 264.7 세포에 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 시료를 처리하고 2시간 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS를 처리하였다. 그리고 LPS에 의한 염증에서 KLEE의 효과를 유도하기 위하여 20시간동안 다시 배양하여 iNOS, COX-2와 HO-1을 분석하였다. 그리고 전사인자와 상위 신호전달물질을 분석하기 위하여 100-mm dish에 파종된 RAW 264.7 세포에 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 KLEE와 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 동시에 처리한 후 4시간동안 배양하였다. 단백질 추출은 protein extraction buffer(PRO-PREP, Intron Biotechnology, Korea)를 이용하였고 추출물의 농도는 Bradford법으로 결정하였다. 추출한 단백질 시료는 LDS sample buffer(Thermo Fisher Scientific, USA)와 섞고 10 % SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 진행하였다. 그리고 polyvinylidene fluoride(PVDF, Bio-Rad Laboratories, USA) membrane으로 전기영동된 단백질을 이동시킨 후 5 % non-fat dry milk를 이용하여 실온에서 1시간동안 blocking 단계를 진행하였다. 그리고 각각의 비율로 희석된 1차 항체와 4 °C에서 24시간 동안 반응하고 실온에서 2시간동안 2차 항체와 반응을 진행한 후 기질인 enhanced chemiluminescence solution(ECL, Santa cruz biotechnology)을 이용하여 ChemiDoc XRS+ system(Bio-Rad laboratories)에서 발현을 측정하고, Gel Doc EQ system(Bio-Rad laboratories)을 이용하여 정량분석을 진행하였다.

5. 통계적 방법

모든 실험 결과는 3회 반복하여 시행 후 SPSS 프로그램(version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여

평균 ± 표준편차(mean ±SD)로 표현하였다. 실험군 간의 유의성 검증은 일원배치 분산분석법(one-way ANOVA)으로 진행하였고 사후분석은 Duncan's multiple range test를 사용하였다.

III. 결 과

1. KLEE의 NO 생성과 iNOS 발현 억제 효과

RAW 264.7 세포에 미치는 KLEE의 독성을 분석하기 위하여 WST-1 assay를 수행한 결과는 Fig 1에서 보는 것과 같이 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 KLEE는 RAW 264.7 세포에 독성을 전혀 미치지 않는 것을 확인하였다. 그리

고 KLEE가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증반응을 억제하는지의 여부를 확인하기 위하여 Griess reaction을 통해 NO 생성량을 분석한 결과 Fig 2에서 보는 것과 같이 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS 처리에 의해 과량의 NO가 생성되었고 KLEE의 처리로 인해 NO의 생성량이 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였으며 이러한 결과는 NO의 합성을 조절하는 효소인 iNOS의 발현이 억제되는 결과와 일치하는 것을 확인하였다(Fig 3). 또한 염증의 주요한 마커로 알려진 PGE2의 생성을 조절하는 효소인 COX-2 또한 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS에 의해 과발현되었고 KLEE의 처리로 인해 농도 의존적으로 유의미하게 감소하였다(Fig 3). 따라서 KLEE는 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO와 생성과 iNOS, COX-2의 발현을 억제함으로써 염증을 완화하는 것을 알 수 있었다.

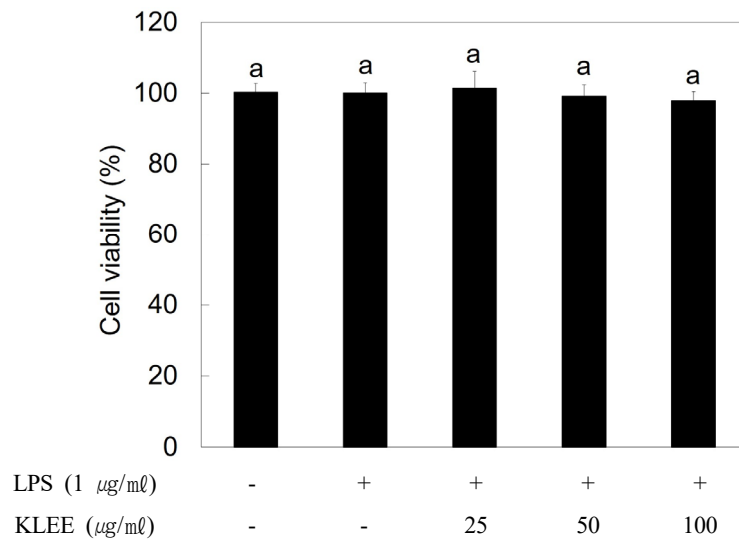


Fig 1. Cytotoxic effect of KLEE treatment in RAW 264.7 cells

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

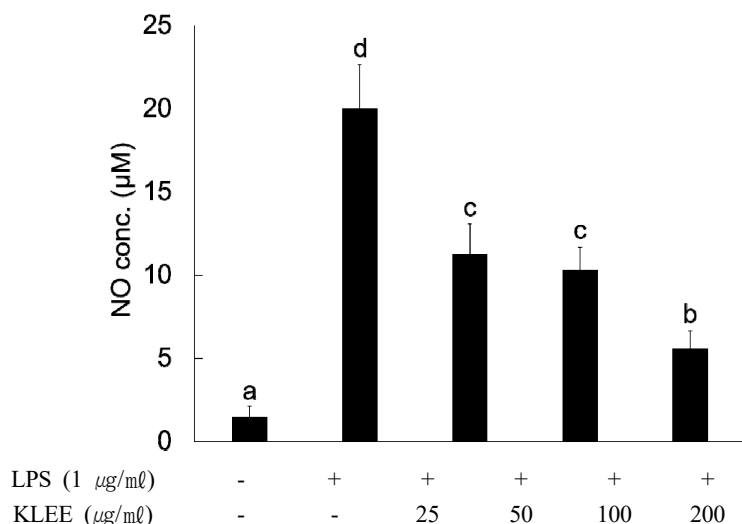


Fig 2. NO inhibitory effect of KLEE in LPS stimulated RAW 264.7 cells

Accumulated NO concentrations was determined by the Griess reaction. 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

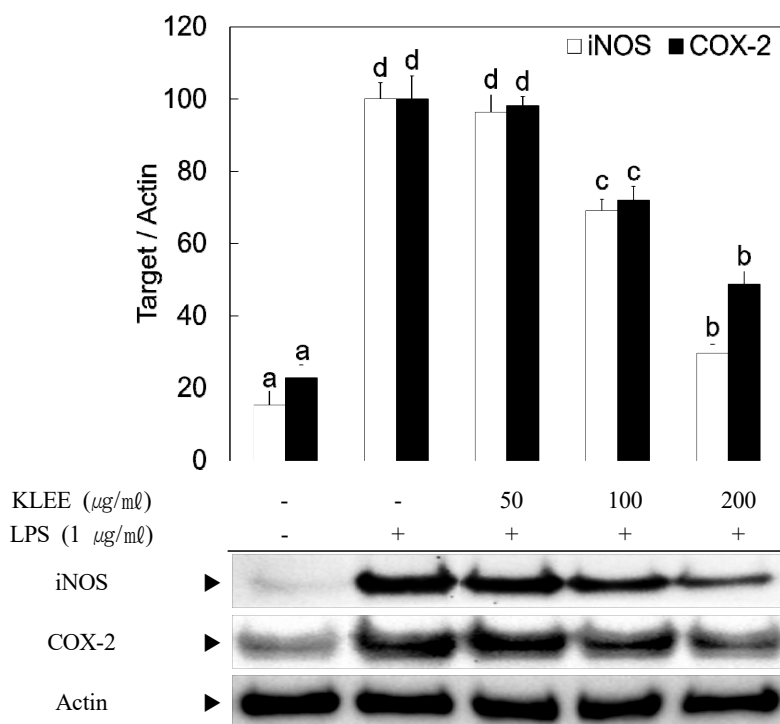


Fig 3. Inhibited effect of KLEE on iNOS and COX-2 expressions in LPS stimulated RAW 264.7 cells

Protein expression levels of iNOS and COX-2 by KLEE treatment were decided by Western blot analysis. All signals were normalized to protein levels of actin, an internal control, and expressed as a ratio. 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

2. KLEE의 NF-κ B 활성화와 PI3K 및 MAPK의 인산화 조절 효과

염증 전사인자인 NF-κ B는 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유발되는 iNOS와 COX-2의 과발현을 매개하는 것으로 알려져 있다. 세포질 내에서 비활성형으로 존재하는 이 전사인자는 LPS와 같은 염증성 자극에 의해 활성화되고, 활성화된 NF-κ B는 핵막을 통과하여 염증매개인자의 전사를 조절하는 promoter region에 결합함으로써 이들의 전사를 유도한다(Surh, 2003). 시료의 처리에 의한 NF-κ B의 활성화 조절은 Fig 4에서 보는 것과 같이

LPS에 의해 NF-κ B의 구성단백질인 p65가 인산화되었고 KLEE의 처리에 의해 유의적으로 억제되는 것을 볼 수 있었다. 그리고 NF-κ B의 활성을 조절하는 것으로 알려진 상위 신호전달 물질인 PI3K/Akt와 MAPK의 활성화 정도 또한 Western blot을 통해 분석하였다. 그 결과 Fig 5와 같이 KLEE는 Akt, ERK, JNK, p38의 인산화를 모두 유의하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 KLEE는 PI3K/Akt와 MAPK의 인산화를 억제함으로써 염증을 조절하는 활성이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

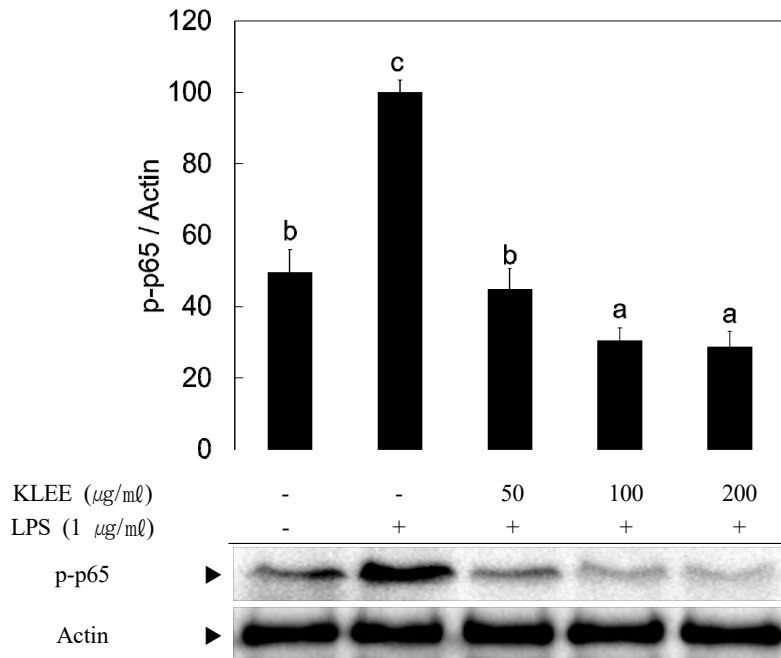


Fig 4. Inhibitory effect of KLEE on NF-κ B activation in LPS stimulated RAW 264.7 cells
 Phosphorylated status of p65 by KLEE treatment was determined by Western blot analysis. Induced signal was normalized to protein level of actin, an internal control, and expressed as a ratio. Data represent the mean±SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at p<.05 by Duncan's multiple range test

3. KLEE의 HO-1 발현 유도 효과

세포 내 항산화 효소계에 속하는 HO-1은 heme을 biliverdin, 일산화탄소, 유리철로 분해하는 과정에 관여하는 효소로 염증성 사이토카인의 생성을 줄이고, 활성화된 대식세포의 NO 생성을 억제하는 활성이 보고되기

도 하였다(Iwata 등, 2020). 시료의 처리에 의한 HO-1 발현의 조절은 Fig 5에서 보는 것과 같이 LPS에 의해 untreated cell보다는 강하게 유도되었으나 KLEE의 농도가 높아짐에 따라 매우 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 KLEE는 항산화 효소인 HO-1을

강하게 발현함으로써 염증을 조절할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

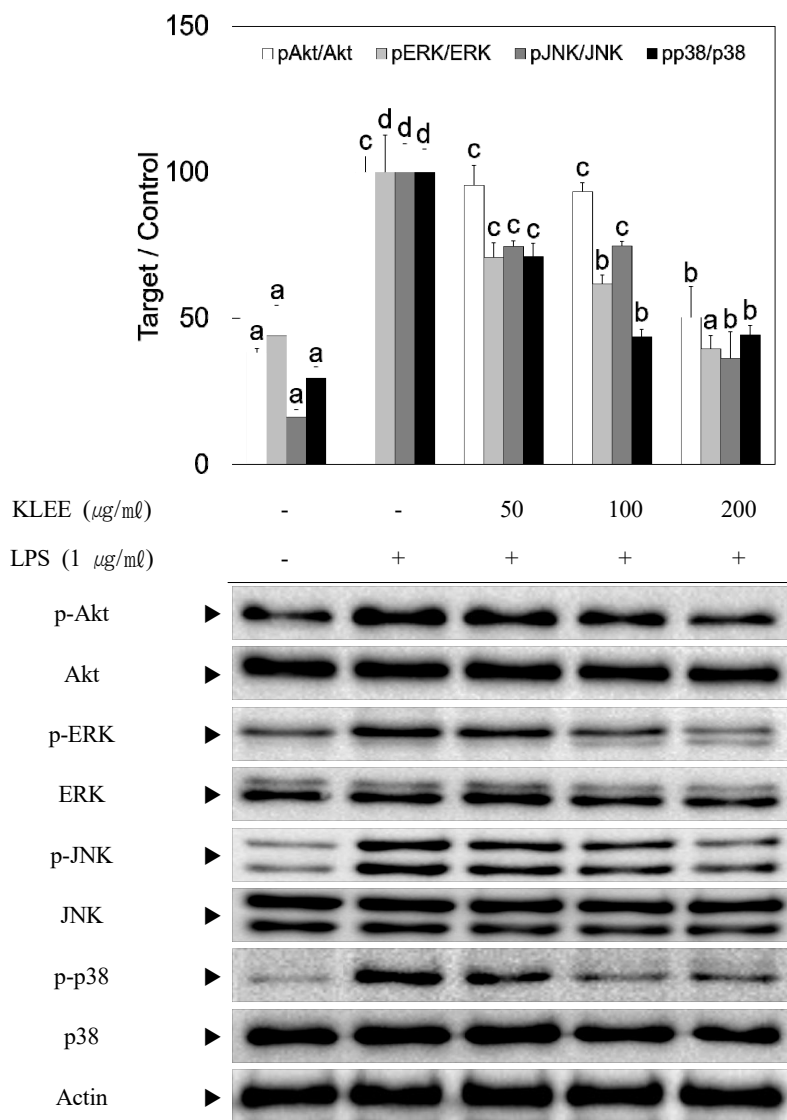


Fig 5. Inhibited phosphorylation of KLEE treatment on PI3K and MAPKs in LPS stimulated RAW 264.7 cells
 KLEE treatment inhibited phosphorylation levels of Akt, ERK, JNK and p38 by KLEE treatment. All signals were normalized to protein levels of unphosphorylated targets, internal controls, and expressed as a ratio. 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

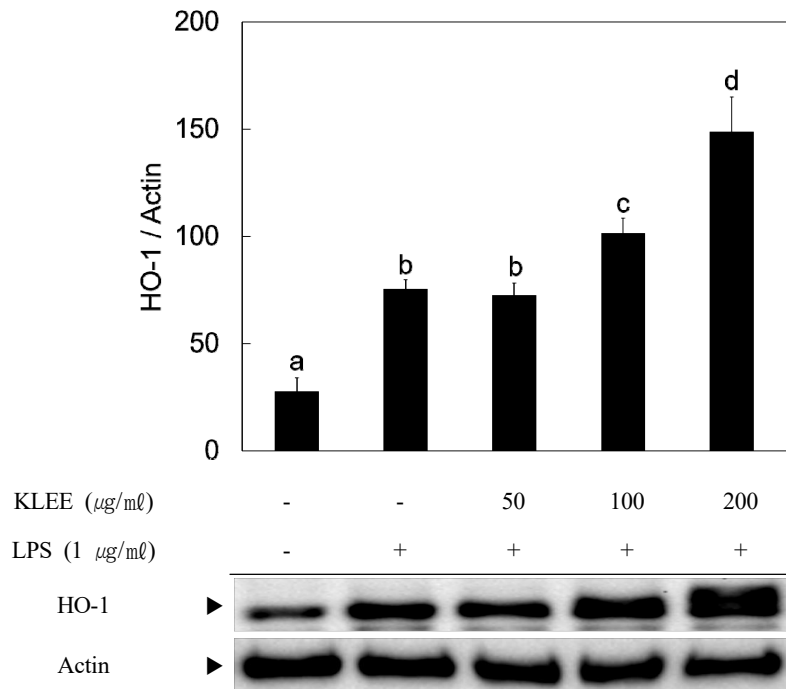


Fig 6. Effect of KLEE on HO-1 expression in LPS stimulated RAW 264.7 cells
 Protein expression level of HO-1 by KLEE treatment was decided by Western blot analysis. A signal was normalized to protein level of actin, an internal control, and expressed as a ratio. Data represent the mean±SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at p<.05 by Duncan' s multiple range test

IV. 고찰

본 연구에서는 청견 잎 에탄올 추출물(KLEE)의 항염증 기전을 분석하기 위하여 RAW 264.7 세포에 그람 음성 박테리아 외벽에 존재하는 독소 성분인 LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 후 염증 매개 물질인 NO와 염증 매개물질의 생성 효소인 iNOS와 COX-2의 발현 정도를 Western blot analysis로 확인하였다. 그리고 염증 매개물질의 발현을 조절하는 전사인자인 NF-κ B와 세포 내 신호전달 물질인 PI3K/Akt와 MAPK의 활성화 또한 Western blot으로 분석하였다.

체내에서 비특이적인 면역기전을 담당하고 있는 대식세포는 LPS와 같은 염증성 인자에 의해 활성화되면 염증매개물질인 NO와 PGE2의 생성을 유도하는 효소인 iNOS와 COX-2를 과발현함으로써 염증과 관련된 다양한

질환이 발병한다(Hong 등, 2023). 특히, L-arginine으로부터 NOS에 의해 생성되는 NO는 iNOS, neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS)의 세 가지 형태가 존재하고, 이 가운데 iNOS의 발현에 의해 생성되는 NO는 조직손상, 동맥경화, 천식, 류마티스관절염 등 다양한 염증성 질환을 유발한다(Huang 등, 2023; Sarmah 등, 2022). 또한 COX-2에 의해 arachidonic acid로부터 생성되는 PGE2는 과량생성될 경우 만성 염증을 유발하기도 한다(Na & Surh, 2006). 그러므로 염증을 매개하는 물질인 iNOS와 COX-2의 발현을 조절에 관한 연구는 염증을 효과적으로 억제할 수 있는 후보 소재의 개발에 매우 중요한 부분이다. 본 연구에서 KLEE는 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유의적으로 상승한 NO 생성을 효과적으로 억제하였고, 그 결과는 LPS의 처리로 과발현된 iNOS의 발현이 KLEE에 의해 농도 의존적으로 감소하는 결과와 일치하였다(Fig 1 & 2). 특히, 염증의 지표로 활용되기도

하는 PGE2의 생성을 매개하는 효소인 COX-2 또한 세포 독성 없이 농도 의존적으로 억제하는 결과를 보였다(Fig 2).

염증 매개 물질은 NF- κ B, PI3K/Akt, MAPK와 같은 전사인자와 상위 신호전달 물질의 네트워크에 의해 조절된다(Kwon & Lee, 2023). NF- κ B는 p50과 p65 subunit 이 heterodimer를 이루며 구성되고, 이 전사인자는 anchor protein인 inhibitor κ B α (I κ B α)에 결합하여 비활성의 형태로 세포질에 존재하는 전사인자이다(Surh, 2003). 비활성의 형태로 존재하는 NF- κ B는 다양한 인자의 자극으로 인해 I κ B α 가 인산화되면서 p50과 p65 heterodimer에서 떨어지고, 활성형으로 바뀐 NF- κ B는 핵내로 이동하게 되어 염증 매개인자의 과발현을 유도하는 전사조절인자로 작용하여 염증을 유도한다(Yoon & Park, 2021). PI3K/Akt와 MAPK는 세포의 분화와 증식, 사멸의 조절 및 세포 내 스트레스에 대한 조절작용 등에 다양한 기능을 하는 신호전달물질로 이들 신호전달물질은 NF- κ B 등 여러 염증 전사인자의 조절을 통해 염증 매개 물질인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 등의 발현을 조절하는 것으로 보고되고 있다(Lu 등, 2022; Zhang & Liu, 2002). 이들 신호전달물질은 세포외부로부터 자극이 발생할 경우, 일련의 신호전달경로를 통해 염증성 전사인자의 활성을 조절하고 그 과정을 통해 염증성 사이토카인의 발현을 유도하거나 주요 염증 매개 물질인 NO와 PGE2를 생성하는 효소인 iNOS와 COX-2의 발현을 유도하기 때문에 PI3K/Akt와 MAPK의 활성 조절은 염증반응의 억제에 있어 주요한 목표 중 하나로 여겨진다. 본 연구에서 염증성 사이토카인과 염증 매개 물질의 상위 신호전달물질인 PI3K/Akt와 MAPK의 조절 및 염증 전사인자인 NF- κ B의 활성에 미치는 영향을 Western blot으로 분석한 결과 KLEE는 p65의 인산화를 효과적으로 억제하였을 뿐만 아니라 Akt, ERK, JNK와 p38 모두에서 농도 의존적으로 유의미하게 인산화를 감소시켰다.

한편 HO-1와 같은 제2상 효소의 발현을 통한 세포보호 작용은 산화적 스트레스에 대응하기 위한 세포의 주요한 방어 기전 중 하나이다. HO-1은 heme을 biliverdin, free iron 및 일산화탄소로 분해하고, HO-1에 의해 생성된 대사물질들은 강력한 항산화 활성과 동시에 항염증 활성 또한 나타낸다(Kang 등, 2017). 그러므로 항산화 효

소로 알려진 HO-1의 유도를 통해 산화적 스트레스의 감소뿐만 아니라 염증반응도 조절할 수 있는 것으로 보고되고 있기 때문에 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증반응이 HO-1의 발현과 관련이 있는지 분석하였다. 그 결과 KLEE에 의하여 농도 의존적으로 강한 HO-1의 발현이 유도되었고, 이를 통해 KLEE는 제2상 효소의 유도를 통해 항염증 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과를 통해 KLEE는 PI3K/Akt, MAPK의 활성 조절을 통해 NF- κ B 활성을 조절하고, 항산화 효소인 HO-1의 발현을 유도함으로써 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포의 염증을 유의미하게 억제하는 활성을 나타냈다. 이러한 연구 결과를 통해 KLEE는 염증 억제에 효과적인 새로운 소재가 될 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

V. 결론

본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 LPS로 염증을 유도하고 청견에탄올 추출물(KLEE)의 항염증 기전을 전사인자와 상위 신호전달물질을 중심으로 분석하였다. 그 결과 LPS에 의해 유도된 NO의 생성과 iNOS, COX-2의 발현은 KLEE의 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. 그리고 전사인자인 NF- κ B와 신호전달물질인 PI3K/Akt, MAPK의 인산화 또한 KLEE의 처리에 의해 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다. 그리고 염증을 억제하는 활성이 있는 것으로 알려진 항산화 효소인 HO-1의 발현 또한 KLEE에 의해 강하게 유도되었다. 이상의 결과를 통해 LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 KLEE는 PI3K/Akt, MAPK와 NF- κ B의 활성 억제 및 HO-1의 발현 유도를 통해 염증을 억제하였고, 이는 KLEE가 신체 내 염증 반응을 조절할 수 있는 새로운 염증 완화 소재로서의 가능성을 시사한다. 따라서 본 논문의 결과를 바탕으로 향후 KLEE의 유효성분에 대한 분리 연구 및 항염증 기전의 in vivo 동물 실험이 진행된다면 KLEE가 염증반응을 조절할 수 있는 천연 염증 치료 소재로 이용될 수 있는 가치가 충분히 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Barcelos IP, Troxell RM, Graves JS(2019). Mitochondrial dysfunction and multiple sclerosis. *Biology (Basel)*, 8(2), 37. <https://doi.org/10.3390/biology8020037>.
- Deepak P, Axelrad JE, Ananthkrishnan AN(2019). The role of the radiologist in determining disease severity in inflammatory bowel diseases. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 29(3), 447-470. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2019.02.006>.
- Hong JH, Chae CW, Cho KJ, et al(2016). A database of simple sequence repeat (SSR) marker-based DNA profiles of citrus and related cultivars and germplasm Korean. *J Horti Sci Technol*, 34(1), 142-153. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20160012>.
- Hong HH, Park TJ, Choi BM, et al(2023). Anti-inflammatory effect of naringenin-7-O-phosphate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Appl Biol Chem*, 66, 46-52. <https://doi.org/10.3839/jabc.2023.007>.
- Huang JB, Chen ZR, Yang SL, et al(2023). Nitric oxide synthases in rheumatoid arthritis. *Molecules*, 28(11), 1-18. <https://doi.org/10.3390/molecules28114414>.
- Iwata M, Inoue T, Asai Y, et al(2020). The protective role of localized nitric oxide production during inflammation may be mediated by the heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway. *Biochem Biophys Rep*, 23, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100790>.
- Kang HJ, Choi EO, Jeong JW, et al(2017). Inhibition of NO production by ethanol extract of prunus mume fruits in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through regulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Herb Formula Sci*, 25(1), 1-10. <https://doi.org/10.14374/hfs.2017.25.1.1>.
- Kwon SP, Lee SR(2023). Inhibitory effect of rosa davurica pall. on LPS-mediated nitric oxide production via NF- κ B signaling. *J Life Sci*, 33(1), 50-55. <https://doi.org/10.5352/JLS.2023.33.1.50>.
- 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>.
- 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 HJ, Kang GJ, Yoon WJ, et al(2006). Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW 264.7 and HaCaT cells. *Korean J Pharmacogn*, 37(2), 74-80.
- Lim HK, Yoo ES, Moon JY, et al(2006). Antioxidant activity of extracts from Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) fruits produced in Jeju island. *Food Sci Biotechnol*, 15(2), 312-316.
- Lu TC, Wu YH, Chen WY, et al(2022). Targeting oxidative stress and endothelial dysfunction using tanshinone IIA for the treatment of tissue inflammation and fibrosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, Printed Online. <https://doi.org/10.1155/2022/2811789>.
- 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>.
- Penjor T, Yamamoto M, Uehara M, et al(2013). Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on matK gene sequences. *PLoS ONE*, 8(4), Printed Online. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062574>.
- Prakash AN, Prasad N, Puppala ER, et al(2023). Loganic acid protects against ulcerative colitis by inhibiting TLR4/NF- κ B mediated inflammation and activating the SIRT1/Nrf2 anti-oxidant responses in-vitro and in-vivo. *Int Immunopharmacol*, 122, Printed Online. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110585>.

- Sarmah N, Nauli AM, Ally A, et al(2022). Interactions among endothelial nitric oxide synthase, cardiovascular system, and nociception during physiological and pathophysiological states. *Molecules*, 27(9), 2-14. <https://doi.org/10.3390/molecules27092835>.
- Song HS(2008). The volatile composition of kiyomi peel oil (Citrus unshiu Marcov.×C. sinensis Osbeck) cultivated in Korea. *Prev Nutr Food Sci*, 13(4), 292-298. <https://doi.org/10.3746/jfn.2008.13.4.290>.
- Surh YJ(2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 768-780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>.
- Tsai DH, Riediker M, Berchet A, et al(2019). Effects of short- and long-term exposures to particulate matter on inflammatory marker levels in the general population. *Environ Sci Pollut Res Int*, 26(19), 19697-19704. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05194-y>.
- Wautier JL, Wautier MP(2023). Pro- and anti-Inflammatory prostaglandins and cytokines in humans: a mini review. *Int J Mol Sci*, 24(11), 2-13. <https://doi.org/10.3390/ijms24119647>.
- Wu J, Mo J, Xiang W, et al(2023). Immunoregulatory effects of tetrastigma hemsleyanum polysaccharide via TLR4-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in Raw264.7 macrophages. *Biomed Pharmacother*, 161, Printed Online. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114471>.
- Yang EJ(2009). Anti-inflammatory effect of Citrus grandis Osbeck leaves in RAW 264.7 cells. Graduate school of Jeju national university, Republic of Korea, Master's thesis.
- Yoon HS, Park CM(2021). Chrysoeriol ameliorates COX-2 expression through NF- κ B, AP-1 and MAPK regulation via the TLR4/MyD88 signaling pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Exp Ther Med*, 22(1), 1-6. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10150>.
- Zhang W, Liu H(2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, 12(1), 9-18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>.
- Pahwa R, Goyal A, Jialal I. Chronic inflammation. in: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/> Accessed June 23, 2023.
- Rural Development Administration. The tastes and smells of winter tell the story of the evolution of the national fruit, the citron. *Green Magazine*, Available at <http://www.rda.go.kr/webzine/2020/12/sub1-2.html/> Accessed July 16, 2023.