

A Study of the Anti-inflammatory Effects of *Abies nephrolepis* MAX. Extract in RAW 264.7 Cells

Min-Jeong Oh, Hyeon-Ji Yeom and Jin-Young Lee*

Department of Cosmetic and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea

Received November 22, 2023 /Revised February 1, 2024 /Accepted February 2, 2024

In this study, *Abies nephrolepis* MAX. was divided into *A. nephrolepis* MAX. stem (AS) extract and *A. nephrolepis* MAX. leaf (AL) extract. Their anti-inflammatory abilities and applicability as cosmetic materials were determined. Tests of the cell survival rate measured using RAW 264.7 cells and extracts of AS and AL showed 97.8% and 95.6% cell viability at a 500 µg/ml concentration. To determine anti-inflammatory activity, we examined the inhibitory effects on the production of LPS-induced NO in RAW 264.7 cells by Griess assay. The results showed that the AS and AL extracts presented a concentration-dependent inhibition of NO production. The protein expression inhibitory effects of AS and AL extracts were measured by western blot at 25, 50, and 100 µg/ml concentrations. β-actin was used as a positive control. The results of western blot of extracts from AS showed that the expression inhibition rate of the iNOS protein was decreased by 50.1% at the 100 µg/ml concentration. Additionally, the results of western blot of AL extracts showed that the expression inhibition rate of COX-2 and iNOS protein was decreased by 66% and 8.2% at the 100 µg/ml concentration. The mRNA inhibitory effect was measured by RT-PCR at 25, 50, and 100 µg/ml concentrations. GAPDH was used as a positive control. Consequently, the iNOS mRNA expression effect by RT-PCR of AS extract demonstrated by RT-PCR decreased by 27.9% at the 100 µg/ml concentration, and the iNOS and IL-6 mRNA expression effect of AL extract measured by RT-PCR decreased by 48.6% and 48.7% at the 100 µg/ml concentration.

Key words : *Abies nephrolepis* MAX., COX-2, cytokine, iNOS

서 론

염증반응은 미생물이나 화합물 등으로부터 가해진 외 부 자극에 대응, 항상성 유지를 위해 인체에서 일어나는 정상적인 방어기전으로[13], 염증성 질환인 피부 알레르기가 일어날 때 분비되는 히스타민(histamine)[5], 전립샘, 정낭에서 분비되는 프로스타글란딘(prostaglandin E₂, PGE₂) 등의 물질이 배출되어 진행되는 염증은 국소증상으로 발적, 열감, 부종 등이 나타난다[22]. 염증반응에 대표적인 대식세포(macrophage)의 분화는 두 가지로 나눌 수 있는데 classically activated macrophages는 pro-inflammation을 하여 병원균을 제어하는데 효과적이며, alternatively activated macrophages는 조직의 상처를 재생시켜주고 항상성을 유지시켜주며 anti-inflammation 작용을 한다[6, 11, 18].

Lipopolysaccharide (LPS)는 세포 외막 요소로 존재하는 내독소로 알려져 있으며, 병원균이 죽으면서 패혈증을 일으킨다. LPS에 의해 자극이 된 RAW 264.7과 같은 대식세포는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 발현되면서 염증반응을 일으킬 때 혈관을 확장하고 신경을 전달하는[1, 21] 산화질소(nitric oxide, NO)를 생성하며, arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 변환시키는 효소로 알려진 cyclooxygenase (COX)는 인체의 혈소판 형성, 신장기능을 유지하는 등 세포내에 계속적으로 존재하는 COX-1과 인간의 염증 부위에서 발견되는 COX-2로 나뉜다. COX-2는 염증 반응이 생성되었을 때 PGE₂를 배출한다[20]. 면역세포(immunocyte)에서 분비되는 단백질 면역조절제인 사이토카인(cytokine)은 다양한 종류로 인해 기능적으로 분류되며 그 중 세포상해인자인 tumor necrosis factor-α (TNF-α), 백혈구를 포함하는 세포에서 분비되는 interleukin 단백질 중 interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β) 등 LPS에 의해 대식세포로부터 증가시키는 것으로 보고되어 있다 [12, 14, 19]. 숙주 방어인자와 염증 매개체로 알려져 있는 TNF-α는 종양세포에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며[23], IL-1β는 폐 질환 등 여러 가지 병변에 따라 활성의 정도가 다르게 나타난다고 보고되어 있으며[10], IL-6는 근

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552, Fax : +82-41-540-9538

E-mail : jylee@hoseo.edu

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.

육 및 지방세포의 신진대사를 촉진한다고 명시되어 있다.

분비나무(*Abies nephrolepis* MAX.)는 소나무과(Pinaceae)의 상록 교목이며 같은 소나무과의 상록 교목인 구상나무(*Abies koreana* E.H.Wilson)와 매우 유사한 형태를 보여 동일종으로 구분되었으나 1920년 식물분류학자 Wilson에 의해 포침의 방향이 구상나무와는 다르다고 검증되어 분비나무와 구상나무는 따로 분류되었으며[17] 또한, 열매의 실편이 곧추서면 분비나무, 뒤집어지면 구상나무라고 알려져 있다. 분비나무의 높이는 25 m, 지름은 75 cm로 잎은 잎 끝의 끝이 길게 뾰족한 모양보다 짧은 예두, 혹은 오목하게 파인 모양의 요두이다. 개화기는 4~5월로 열매는 장란형 또는 난상 원주형이다[2]. 분비나무에 대해서는 현재까지 많은 연구가 진행되지는 않았지만 폐놀성 화합물이 갖는 암과 질병 예방에 대해 보고된 바 있다[9].

이하의 연구에서는 아직까지 많은 연구가 진행되지는 않은 분비나무를 분비나무 줄기(*Abies nephrolepis* MAX. stem)와 분비나무 잎(*Abies nephrolepis* MAX. leaf)으로 나누어 항염 관련 기능성 메커니즘을 분석하여 화장품 소재로서의 이용가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 연구의 시료로써 사용된 분비나무는 2020년 9월 경기도산림환경연구소에서 채취하였으며 70% 에틸 알코올을 가하여 추출하였다. 채취한 시료는 세척 및 건조하여 분쇄 후 70% 에틸 알코올을 시료 무게의 10배로 가하여 상온에서 24시간 침지 과정을 진행하였다. 침지 후 상등액과 침전물을 분리하여 추출을 진행하였으며 Whatman No.2 여과지를 사용해 시료 추출물을 여과하였다. 이후 EYELA evaporator로 감압농축을 하여 용매를 제거한 뒤 동결건조한 파우더 상태의 시료 추출물을 -20°C에서 보관하며 본 연구에 사용하였다.

시약 및 기기

항염증 측정 실험에 사용된 lipopolysaccharide (LPS), griess reagent 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입 후 사용하였으며, 단백질 발현 억제 효과 측정 실험에 사용된 1차 항체인 β -actin, COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 2차 항체인 anti-mouse은 Santacruz (CA, USA)에서 구입 후 사용하였다. RT-PCR에 사용된 COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 GAPDH primer는 Bionics (Seoul, Korea)에서 제작하여 구입 후 사용하였다.

ATCC (USA)사에서 대식세포인 RAW 264.7을 구입 후 사용하였다. 세포 배양을 위해 Thermo Scientific Hyclone (USA)에서 penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), trypsin, dulbecco's modified eagle medium (DMEM), phos-

phate buffered saline (PBS)을 구입 후 사용하였으며, 세포 독성 측정 실험에 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입 후 사용하였다. 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입 후 사용하였다.

본 연구에서는 vortex (Scientific Industries, Inc., USA), digital shaker (Daihan Scientific, Korea), Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co, Korea), centrifuge (Hanil Science Industrial Co., Korea), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad, USA), UV transilluminator (BioTop, Switzerland), micro centrifuge (Gyrozen, Korea), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), freeze drier (ILShin BioBase Co., Korea), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA), microplate reader (Tecan, Austria), autoclave (JS Research Inc., Korea), PCR (ASTEC Co., Japan), microscope (Olympus, Japan)등의 기기를 사용하였다.

세포 배양

본 연구 진행을 위해 사용된 대식세포인 RAW 264.7의 배양은 penicillin/streptomycin (100 U/ml) 1%와 FBS 10%가 첨가된 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C의 5% CO₂ incubator의 조건으로 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[3]에 따라 진행하였다. 대식세포(RAW 264.7)를 96-well plate에 1×10^5 cells/well의 개수가 되도록 180 μ l씩 분주하여 seeding하였고, 시료를 농도구간 별로 희석하여 20 μ l를 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이후 MTT 용액을 2.5 mg/ml 농도로 희석하여 모든 구간에 40 μ l 첨가, 3시간 반응시킨 뒤 배양액을 제거하고 DMSO 100 μ l를 각 well당 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

Nitric oxide (NO) 생성 저해 활성 측정

Green 등의 방법[4]에 따라 RAW 264.7 cell로부터 발생된 NO의 양을 측정하였다. 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태를 griess 시약을 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 RAW 264.7 cell을 1×10^5 cells/well로 분주하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 1x PBS로

2회 washing 하였다. Normal을 제외한 농도구간에 lipopolysaccharide (LPS) 20 µg/ml을 처리하고 2시간 후 농도 별로 조제한 시료용액을 처리하였다. 24시간 배양한 뒤 상층액을 얻은 후 동일한 양의 griess 시약을 가하여 96-well plate에서 10분 동안 반응 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 억제 활성 측정은 시료 첨가구과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{NO level (\%)} = \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

염증인자인 COX-2, iNOS, IL-1β, IL-6 및 TNF-α 인자들의 단백질 발현 억제능을 확인하기 위해 대식세포 RAW 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1×10⁶ cells/dish로 seeding한 후 24시간 배양하여 안정화시켰다. Dish의 배지를 제거한 후 LPS를 1 µg/ml의 농도로 2시간 동안 처리하여 반응시켰다. 농도 구간별로 희석하여 처리한 배지로 24시간 배양한 후 배지를 제거한 뒤 1× PBS로 2회 washing 하였다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab을 가한 100 µl로 용해하여 4°C의 centrifuge를 이용하여 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하였다. BCA protein assay kit를 이용하여 분리된 상층액을 정량 후 20 µl 단백질의 질량 차이를 이용한 10%의 SDS-PAGE 상에서 전기영동 하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮기기 위해 transfer 기기를 이용하였고 skim milk와 TBST를 혼합하여 제조한 blocking buffer (5%)를 사용해 실온에서 60분간 blocking을 실시하였다. 1차 항체를 알맞은 비율로 희석하여 4°C에서 over night 한 후, tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 7분 간격, 3회 washing을 진행하였다. 2차 항체는 1:500의 비율로 희석하여 실온에서 90분 반응시킨 후 TBST로 3회 washing하였다. 이후 Davinch-Chemi™

Imager CAS-400SM 기기를 이용하여 밴드를 확인하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

Total RNA 분리 및 cDNA 합성을 위해 대식세포 RAW 264.7을 100 mm culture dish에 1×10⁶ cells/dish로 cell을 seeding하였고 24시간 배양하여 LPS를 1 µg/ml 농도로 2시간 처리하여 반응시켰다. 추출물을 농도별로 희석하여 dish에 처리한 뒤 24시간 배양, 안정화시켰다. Dish의 배지를 제거한 뒤 trizol lysis buffer를 dish에 1 ml 씩 분주하여 세포를 lysis 하였고 200 µl 용량의 chloroform을 분주하여 30초간 위아래로 흔들어 반응시켜 주었다. Centrifuge를 이용하여 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 isopropanol 500 µl와 1:1로 혼합하였다. 다시 이전과 동일한 조건으로 원심분리 후 상층액 제거, 75% EtOH-diethylpyrocabonate (DEPC) water를 각 tube에 1 ml 씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이후 상층액을 제거하고 건조시킨 뒤 DEPC water를 50 µl씩 가하여 용해한 뒤 tube에 멸균수 195 µl와 RNA 5 µl를 총 양이 200 µl가 되도록 첨가하여 A260/A280의 비율을 이용하여 1.8-2.0 순도의 total RNA를 추출하였고 microvolume spectrometer를 이용해 total RNA 값을 측정하였다.

Reverse transcription-PCR

본 연구 진행을 위해 실험에 사용된 인자인 COX-2, iNOS, IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 mRNA 발현 억제능을 확인하기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였으며 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 합성한 cDNA와 5× green GoTaq flexi buffer, PCR nucleotide mix (10 mM), primer, nuclease free water, MgCl₂, GoTaq DNA polymerase 혼합하여 잘 mixing 한 뒤 PCR을 실행하였다. GAPDH, iNOS는 96°C 2분, 96°C 10초, 64°C 30초, 72°C 1분(40 cycles), COX-2는 96°C 2분, 94°C 10초, 51°C

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

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
GAPDH	sense	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC
	anti-sense	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC
COX-2	sense	GGAGAGACTATCAAGATAGT
	anti-sense	ATGGTCAGTAGACTTTTACA
iNOS	sense	AATGGCAACATCAGGTCGGCCATCACT
	anti-sense	GCTGTGTGTACAGAAGTCTCGAACTC
IL-1β	sense	AGGACACGACTGCTTTCTTC
	anti-sense	GCACCGCAGTAGGGAAGTGT
IL-6	sense	GGCTTTTAAGTGGGGCTGTC
	anti-sense	CCCAAGATCCACTGCAAATG
TNF-α	sense	GAGAGGAACACGTTCTGGCTCC
	anti-sense	TGCTGGAGGCTGAGGCATCC

30초, 72°C 1분(40 cycles), IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 94°C 30초, 56°C 59초, 72°C 1분(35 cycles)을 진행하였으며 그 후 PCR 기기로 합성하였다. 10 mg/ml solution의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V의 조건에서 30분간 전기영동하여 UV transilluminator를 사용하여 밴드를 확인, 분석하였다.

결과 및 고찰

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과

화장품 제조 시 함유되는 추출물이 독성을 함유하고 있는지 판단하기 위해 MTT assay를 통한 세포 생존율 측정을 진행하였다. 기질로써 사용된 MTT를 이용하여 생 세포에서 formazan을 생성시킨 후 사멸한 세포에서는 반응하지 않아 formazan이 환원되지 않는 정도를 확인하여 세포의 생존율을 알아보았다[24].

분비나무 추출물에 대해 대식세포인 RAW 264.7의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과, Fig. 1과 같이 나타내었다. RAW 264.7 세포에 대해 분비나무 줄기와 잎 추출물은 500 μ g/ml 농도에서 97.8%, 95.6%의 세포 생존율을 나타내었으며 이에 본 실험에서는 시료용액을 100%

에 가까운 세포 생존율이 확인된 25, 50, 100 μ g/ml의 농도 구간으로 설정하여 실험을 진행하였다.

Nitric oxide (NO) 생성 저해 활성 측정

NO 생성 억제제는 혈관 확장, 혈압 및 신경전달 기능 등의 생체의 신호를 전달하는 물질로써 세포의 기능 유지에 중요한 역할을 한다. 하지만 높은 농도의 NO 생성은 세포의 손상, 염증을 유발하여 세포가 사멸하는 경우가 발생한다[7, 8, 15, 16].

분비나무 추출물의 NO 저해활성을 측정한 결과, Fig. 2와 같이 나타내었다. LPS 처리구는 LPS 무처리구에 비해 NO 발현량이 높았음을 확인할 수 있었으며, 분비나무 추출물의 농도가 증가함에 따라 NO의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 분비나무 줄기 추출물의 경우 500 μ g/ml의 농도에서 71.1%, 분비나무 잎 추출물은 42.9%의 저해율을 나타내었으며, 분비나무 추출물이 염증발현 억제에 우수한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Western blot을 통한 단백질 발현 측정 결과

대식세포(RAW 264.7)에서의 COX-2 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

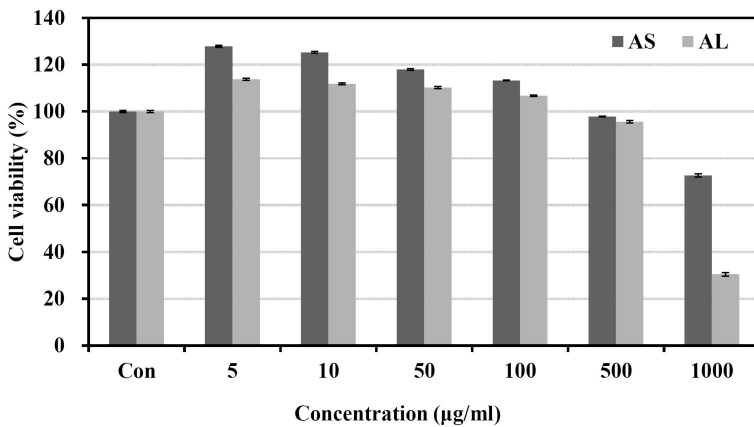


Fig. 1. Cell viability of extract from *Abies nephrolepis* MAX. on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells were incubated for 24 hr in DMEM, the cells were treated with various concentrations of *Abies nephrolepis* MAX. for 24 hr, and not treated with LPS. Result are means \pm SD of triplicate data. ■ AS : *Abies nephrolepis* MAX. stem, □ AL : *Abies nephrolepis* MAX. leaf.

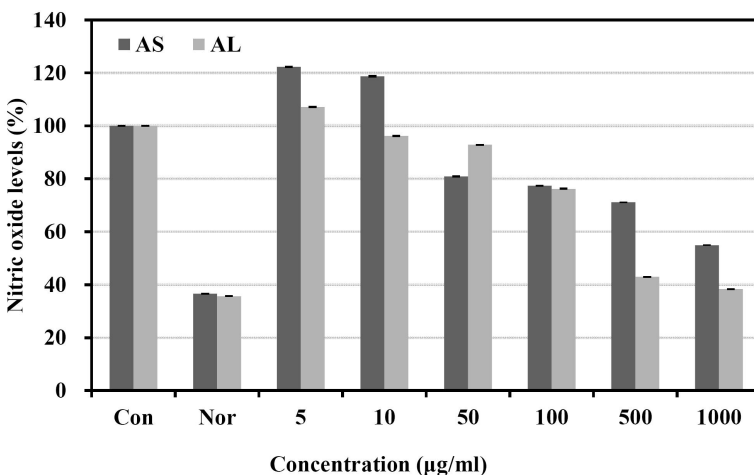


Fig. 2. Effect of *Abies nephrolepis* MAX. extract on production of nitric oxide in RAW 264.7. After RAW 264.7 cells were incubated with 1 μ g/ml of LPS for 2 hr and then treated with various concentrations (5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 μ g/ml) of extract from *Abies nephrolepis* MAX. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. Data are represented as means \pm SD of three individual experiments. ■ AS : *Abies nephrolepis* MAX. stem, □ AL : *Abies nephrolepis* MAX. leaf.

분비나무 줄기와 잎 추출물에 대한 염증유발 인자인 COX-2와 iNOS의 단백질 발현 억제 효과를 확인하기 위해 western blot을 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과를 Fig. 3, 4에 나타내었다. 이때 β -actin을 세포의 다양한 조건에서도 발현 정도의 차이가 매우 적은 house keeping gene인 positive control로 사용하였다. RAW 264.7 세포에 추출물을 25, 50, 100 μ g/ml의 농도구간별로 처리한 후, LPS를 처리하여 염증 활성을 과발현시킨 control 구간과 LPS를 처리하지 않은 normal 구간으로 설정하였다. 분비나무 줄기와 잎의 COX-2 발현량을 확인한 결과, 분비나무 잎이 66%의 단백질 발현을 억제하여 대조군인 Vit. C보다 우수하였다. 분비나무 줄기와 잎의 iNOS 발현량은 줄기가 50.1%, 잎이 8.2%로 분비나무 줄기의 단백질 발현 억제가 우수함을 확인할 수 있었다.

Pro-inflammatory cytokine의 단백질 발현에 미치는 영향

염증유발 인자인 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 분비나무 줄기와 잎 추출물이 pro-inflammatoty cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 단백질 발현양에 미치는 영향을 측정하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과를 Fig. 5, 6에 나타내었다. 이때 β -actin이 세포의 다양한 조건에서도 발현 정도의 차이가 매우 적어 house keeping gene인 positive control로 사용하였다. Raw 264.7 세포에 추출물을 25, 50, 100 μ g/ml의 농도구간별로 처리한 후 LPS를 처리하여 control 구간은 과발현시키고, LPS를 처리하지 않은 구간으로 normal을 설정하였다. 그 결과, 농도가 증가함에 따라 단백질 발현 억제율을 보였으며, 특히 분비나무 잎 추출물의 IL-6 및 TNF- α 의 인자가 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 우수한 단백질 발현 억제를 보였다.

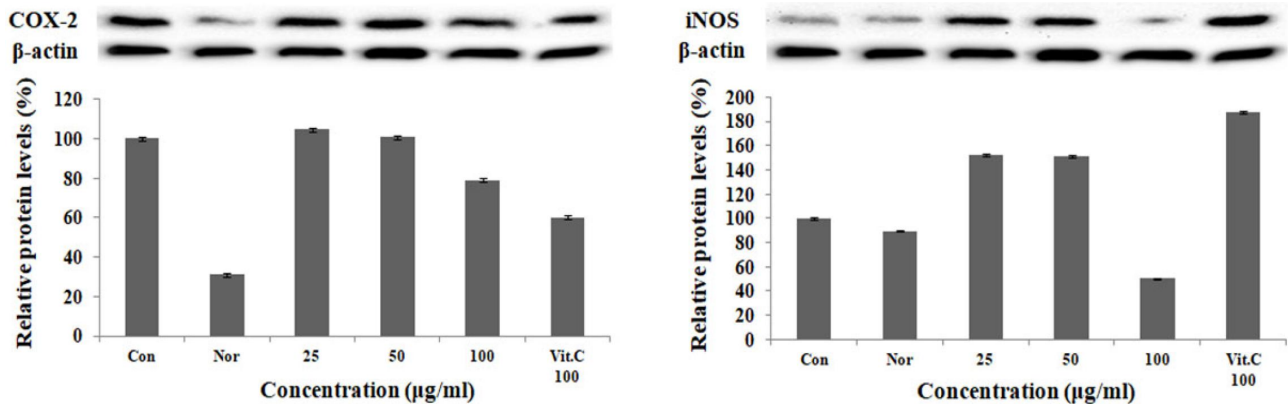


Fig. 3. COX-2, iNOS protein expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. stem extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. stem extract of 25, 50 and 100 μ g/ml concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

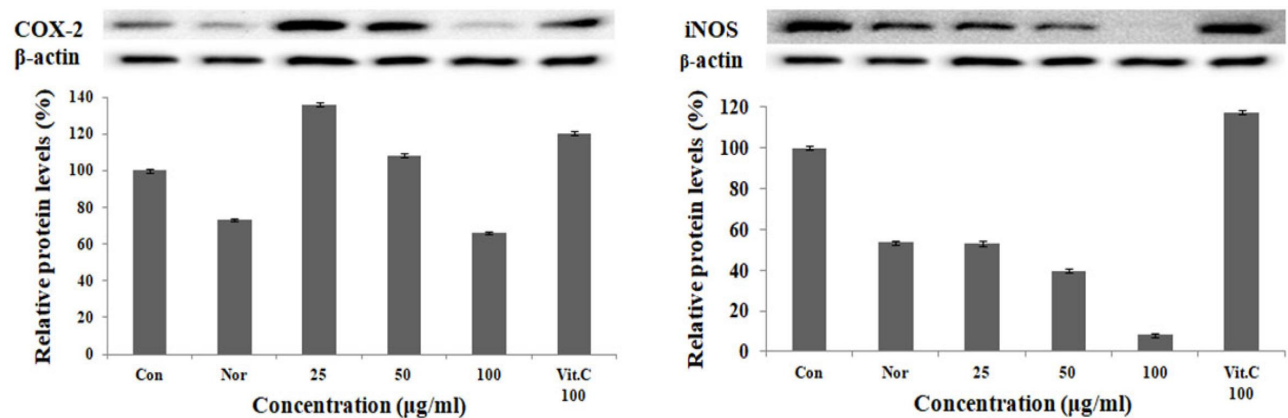


Fig. 4. COX-2, iNOS protein expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract of 25, 50 and 100 μ g/ml concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

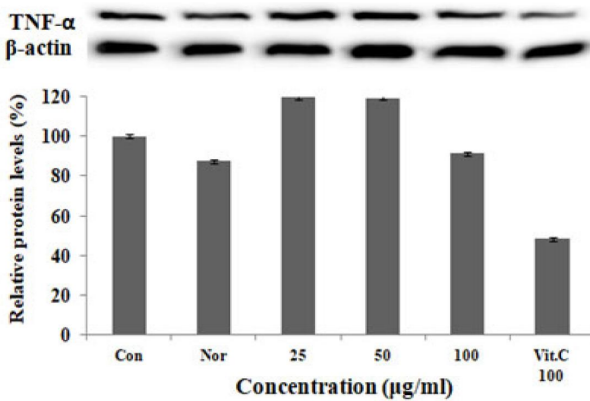
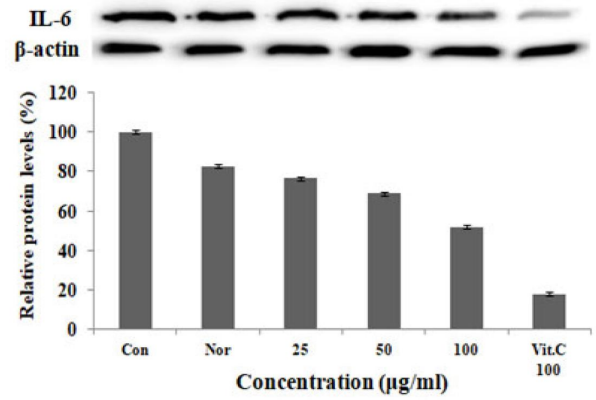
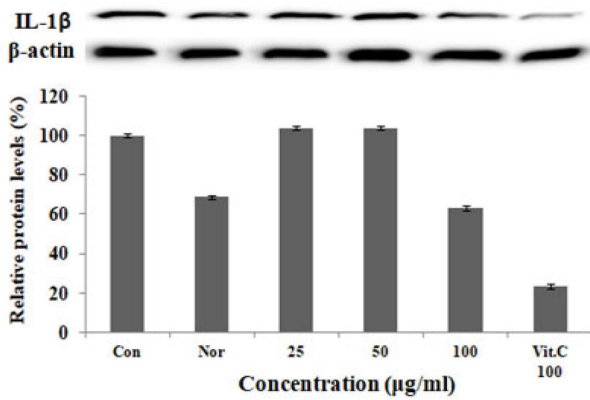


Fig. 5. IL-1β, IL-6, TNF-α protein expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. stem extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. stem extract of 25, 50 and 100 µg/ml concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

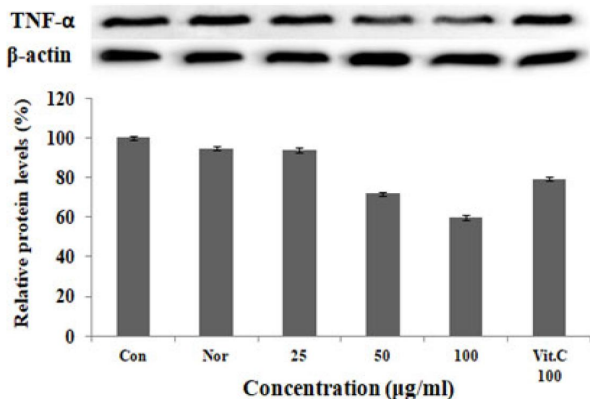
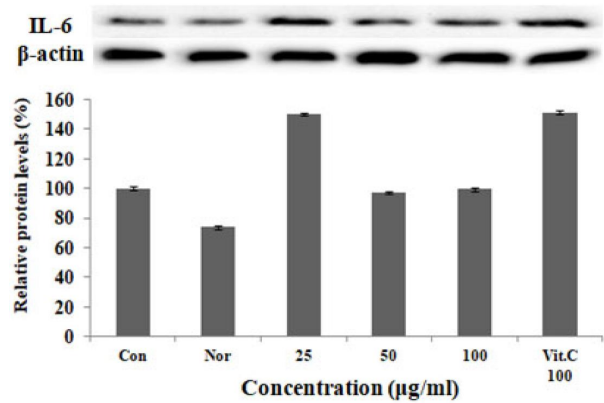
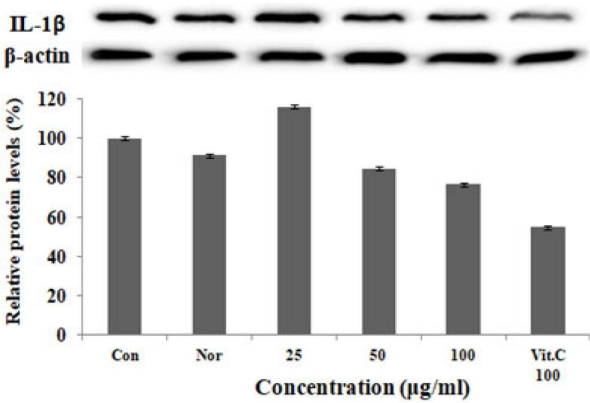


Fig. 6. IL-1β, IL-6, TNF-α protein expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract of 25, 50 and 100 µg/ml concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정 결과

RAW 264.7 세포에서 COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향

분비나무 줄기와 잎 추출물의 염증유발 인자인 COX-2와 iNOS에 미치는 mRNA 발현 정도를 측정하기 위해 RT-PCR을 이용하여 실험하였다. 이때 GAPDH를 세포의 다양한 조건에서도 발현의 정도 차이가 매우 적은 house keeping gene인 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 7, 8과 같이 LPS에 의해 증가된 COX-2와 iNOS mRNA 발현양이 억제된 것을 확인할 수 있었으며, 분비나무 줄기의 COX-2 mRNA 발현양은 같은 농도의 대조군과 비교하였을 때 유의한 억제율을 확인할 수 있었다. 반면에, 100 µg/ml의 농도에서 분비나무 줄기의 iNOS는 27.9%, 분비나무 잎의 COX-2와 iNOS는 각각 77.8%, 48.6%로

mRNA의 발현양이 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 우수한 억제율을 확인할 수 있었다.

Pro-inflammatory cytokine의 mRNA 발현에 미치는 영향

분비나무 줄기와 잎 추출물을 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 pro-inflammatoty cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α 인자의 mRNA 발현양을 RT-PCR을 사용하여 측정하였으며, 결과를 Fig. 9, 10에 나타내었다. 이때 GAPDH를 세포의 다양한 조건에서도 발현의 정도 차이가 매우 적은 house keeping gene인 positive control로 사용하였다. 분비나무 추출물의 처리에 따라 농도 의존적으로 mRNA 발현양이 억제되는 것을 확인하였으며, 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때, 분비나무 줄기 추출물의 IL-1β는 대조군과 유의한 결과를 나타내었지만, 나머지 인자에서는 대조

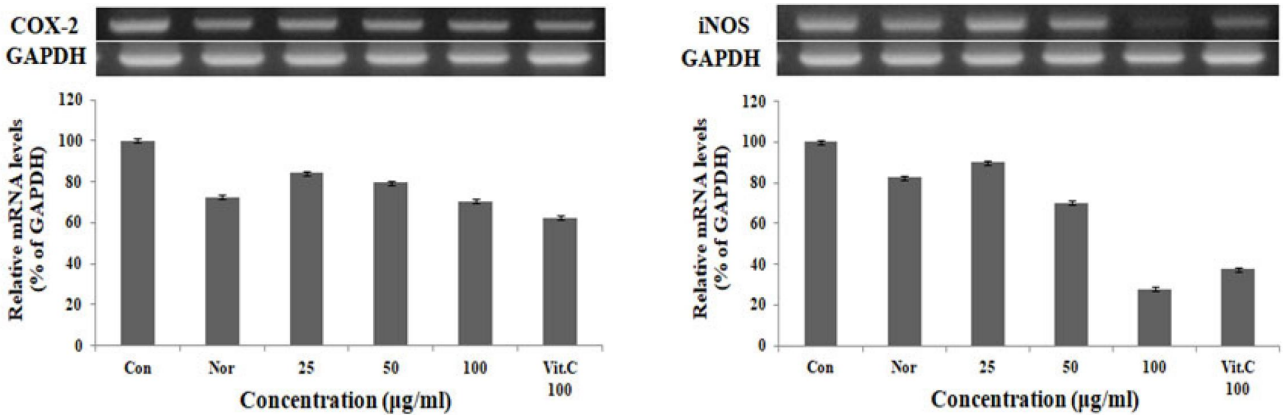


Fig. 7. COX-2, iNOS mRNA expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. stem extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. stem extract of 25, 50 and 100 µg/ml concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

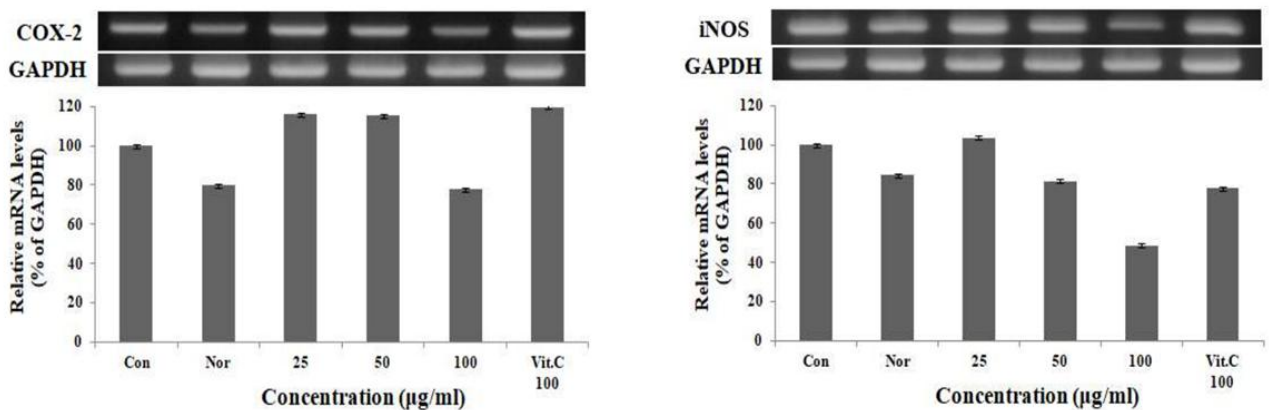


Fig. 8. COX-2, iNOS mRNA expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract of 25, 50 and 100 µg/ml concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

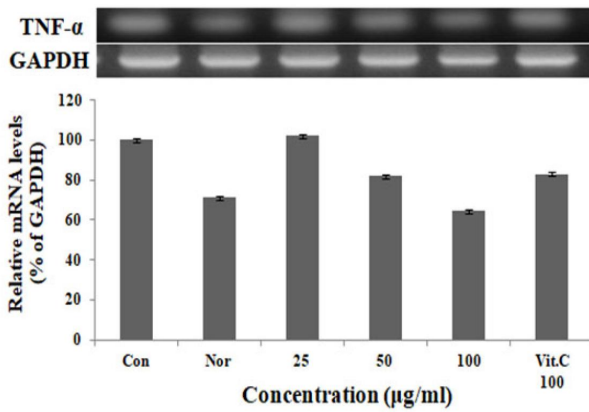
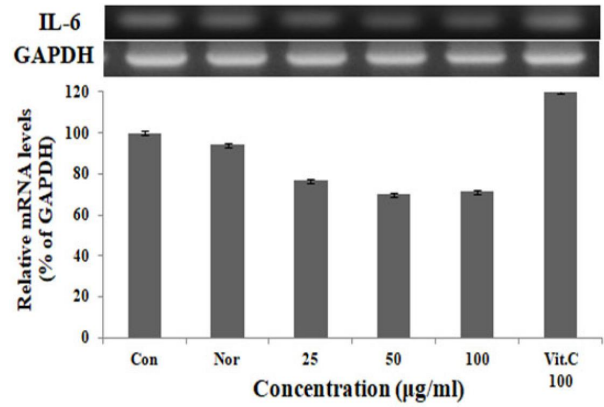
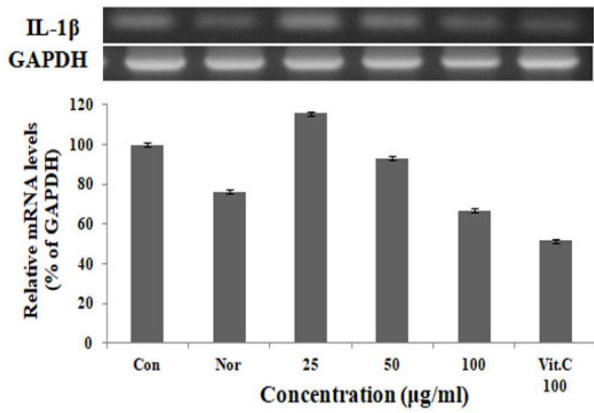


Fig. 9. IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. stem extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. stem extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

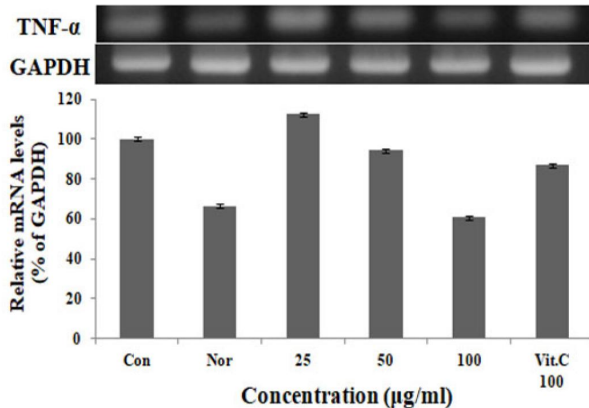
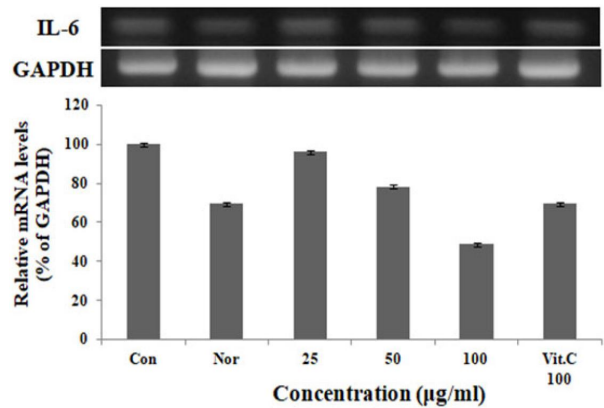
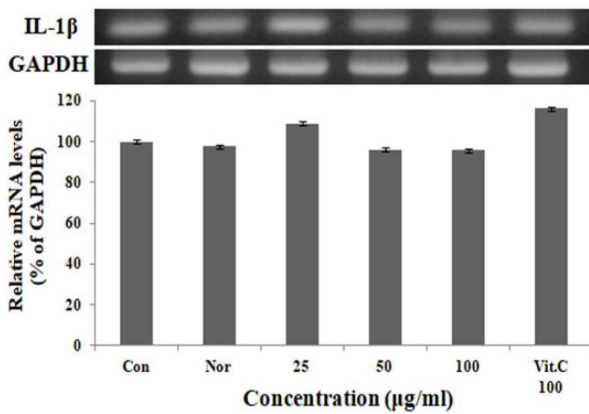


Fig. 10. IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA expression rate of *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. leaf extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations for 24 hr. Con: control, treated with LPS; Nor: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

군인 Vit. C와 비교하였을 때 mRNA 발현 억제율이 우수한 것을 확인할 수 있었다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Ambs, S., Hussain, S. P. and Harris, C. C. 1997. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *The FASEB J.* **11**, 443-451.
2. Bae, K. E., Chong, H. S., Kim, D. S., Choi, Y. W., Kim, Y. S. and Kim, Y. K. 2009. Inhibitory effect on the lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in RAW 264.7 and on the proliferation of HeLa cell lines by the stem bark extracts of *Abies nephrolepis*. *Korean Journal of Pharmacognosy* **40**, 77-81.
3. Carmichael, J., Graff, 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.
4. 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**, 131-139.
5. Hong, I. K., Kim, E. J., Seok, J. H., Kim, B. H., Jang, J. D., Joe, G. J. and Choi, S. W. 2014. Effects of *Eucommia ulmoides* Oliver extract on inhibition of β -hexosaminidase and keratinocyte differentiation. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* **40**, 21-28.
6. Italiani, P. and Boraschi, D. 2014. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 1664-3224.
7. Knowles, R. G. and Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249-307.
8. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. and Moilanen, E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4**, 471-479.
9. Lee, S. J., Lee, K. W. and Lee, H. J. 2004. *Abies nephrolepis* leaf phenolics prevent the inhibition of gap junction intercellular communication by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells. *Biofactors* **21**, 357-360.
10. Lemaire, I., Jones, S. and Khan, M. F. 1991. Bombesin-like peptides in alveolar macrophage: Increased release in pulmonary inflammation and fibrosis. *Neuropeptides* **20**, 63-72.
11. Martinez, F. D., Sica, A., Mantovani, A. and Locati, M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* **13**, 453-461.
12. Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M. and Smith, W. G. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3228-3232.
13. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **7203**, 428-435.
14. Moon, T. C., Chung, K. C., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. 1998. Screening of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors from Natural Products. *Yakhak Hoeji* **42**, 214-219.
15. Nathan, C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *Journal of Clinical investigation* **100**, 2417-2440.
16. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
17. Park, H. C., Lee, J. H., Lee, G. G. and Um, G. J. 2015. Environmental features of the distribution areas and climate sensitivity assesment of Korean Fir and Khinghan Fir. *Environmental Impact Asswssment* **24**, 260-277.
18. Qin, H., Holdbrooks, A. T. Liu, Y., Reynolds, S. L. and Yanagisawa, L. L. 2012. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *Journal of Immunology.* **189**, 3439-3487.
19. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, S. and Perkins, W. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 12013-12017.
20. Shin, H. M., Kim, M. H., Kim, B. H., Jung, S. H., Kim, Y. S., Park, H. J., Hong, J. T., Min, K. R. and Kim, Y. S. 2004. Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF- κ B without affecting I κ B degradation. *FEBS Letters* **571**, 50-54.
21. Tamir, S. and Tannenbaum, S. R. 1996. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochem. Biophys. Acta.* **1288**, 31-36.
22. Trowbridge, H. O. and Emling, R. C. 1997. Inflammation: A Review of the Process, Fifth Edition (Chicago: Quintessence Pub. Co.)
23. Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T. and Huez, G. 1995. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J. Inflamm.* **46**, 1-12.
24. Yoo, D. H. and Lee, I. C. 2020. Antioxidant effect and iNOS, COX-2 expression inhibition on RAW 264.7 cell of *Mangifera indica* L. leaves. *J. Life Sci.* **30**, 783-790.

초록 : RAW 264.7 세포에서 분비나무(*Abies nephrolepis* MAX.) 추출물의 항염 효과에 대한 연구

오민정 · 염현지 · 이진영*

(호서대학교 화장품생명공학부)

본 연구에서는 분비나무(*Abies nephrolepis* MAX.)를 분비나무 줄기(*Abies nephrolepis* MAX. stem) 추출물과 분비나무 잎(*Abies nephrolepis* MAX. leaf) 추출물로 나누어 항염 관련 기능성을 연구하여 화장품 소재로서의 이용가능성을 알아보려고 하였다. MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인한 결과, 대식세포(RAW 264.7)에서 분비나무 줄기와 잎 추출물의 500 µg/ml의 농도에서 각각 97.8%, 95.6%의 생존율을 보였다. 이에 따라 세포 관련 실험을 세포의 생존율이 100%에 가까운 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 진행하였다. 염증을 유발하는 활성산소인 NO 생성에 대해 분비나무 추출물을 측정된 결과, 분비나무 추출물을 처리한 구에서 NO 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 분비나무 줄기와 잎은 100 µg/ml의 농도에서 71.1%, 42.9%의 저해율을 나타내었다. 분비나무 추출물을 RAW 264.7 세포에 처리하여 단백질 발현을 측정된 결과, COX-2, iNOS 및 pro-inflammototy cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 인자에서 농도 의존적으로 단백질 발현이 억제되었으며, 분비나무 줄기의 iNOS와 분비나무 잎의 COX-2, iNOS, IL-6 및 TNF- α 의 인자가 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 우수한 단백질 발현 억제를 보였다. 또한, RAW 264.7 세포에 분비나무 추출물을 처리하여 mRNA 발현을 측정된 결과, 분비나무 줄기의 iNOS, 분비나무 잎의 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현 양은 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 우수한 억제율을 확인할 수 있었으며, pro-inflammototy cytokine인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 인자에서는 분비나무 줄기 추출물의 IL-1 β 는 대조군과 유의한 결과를 나타냈지만, 나머지 인자에서는 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 mRNA 발현 억제율이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이에 따라 분비나무 추출물이 항염 관련 기능성 활성화에 우수함을 나타내어 화장품 소재로서의 이용가능성을 확인할 수 있었다.