RAW 264.7 세포에서의 단풍잎돼지풀 추출물의 항염증 활성 검증

유단희, 이진영*

호서대학교 한방화장품과학과

Received: October 7, 2019 / Revised: November 15, 2019 / Accepted: November 27, 2019

Anti-inflammatory Activities Verification of *Ambrosia trifida* L. extract in RAW 264.7 Cells

Dan-Hee Yoo and Jin-Young Lee*

Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 31499, Republic of Korea

This study was performed to evaluate the anti-inflammatory activities of 70% ethanol extract from *Ambrosia trifida* L. (AT). The electron donating ability and ABTS⁺ radical scavenging ability of extract from AT was shown to be 84.1% and 92.5% at 1,000 µg/ml concentration. The astringent effect of extract from AT was shown to be 94.7% at 1,000 µg/ml. The anti-inflammatory activities of extract of AT were investigated using RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS). The cell toxicity effect of AT extract on RAW 264.7 performed MTT assay. As a result of the measured cell toxicity effect, 90% or more was shown with cell viability at a 500 µg/ml concentration. In nitric oxide synthesis inhibition effect, it was shown that extract from AT concentration dependent inhibited nitric oxide production. The protein expression inhibitory effect of AT extract was measured by western blot at 25, 50, and 100 µg/ml concentration and the β-actin used as a positive control. Consequently, the inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 protein expression inhibitory effect was decreased by 8.6%, 25.1% at 100 µg/ml concentration. The phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38, c-Jun NH₂-terminal kinase and Iκ-Bα protein expression inhibitory effect was a decreased dependent concentration. The mRNA expression inhibitory effect was measured by reverse transcription - polymerase chain reaction at 25, 50, and 100 µg/ml concentration and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase used as a positive control. Consequently, the iNOS, COX-2, interleukin (IL)-1β, IL-6 and tumor necrosis factor-α mRNA expression inhibition effect was a decreased dependent concentration in an LPS-activated macrophage. In conclusion, AT extract may have some effects on inflammatory factors as potential anti-inflammatory agents and natural substance for cosmetics.

Keywords: *Ambrosia trifida* L., anti-inflammatory, natural substance

서론

최근에는 웰빙(well-being) 열풍과 함께 식물 유래의 천연 성분에 대한 인식이 높아지고 생리활성물질들을 다량으로 함유하고 있다. 각종 식물의 뿌리, 열매, 꽃, 나무껍질, 줄기, 잎, 종자 등은 약용 식물의 부위로부터 유래된 한약재의 경우 예전부터 전해 내려오는 처방으로 증명된 안전성과 효능을 인정받고 있어 건강보조식품, 바이오 식품, 한방화장

품 등 한약재를 원료로 한 다양한 제품들이 활용되어 지고 있다. 또한 인체에 부작용이 낮은 천연물을 이용한 의약품 및 화장품의 기능성 소재로서 많은 연구를 하고 있는 추세이다[1, 2].

면역 반응의 일종인 염증반응은 미생물이나 화합물 등에 의해 유해한 자극이 가해진 후의 인체의 방어기전으로, 자극의 제거 및 손상된 조직의 수복과정까지의 모든 과정을 가리킨다[3]. 면역체계에서 대식세포(macrophage)는 염증반응과 면역기능을 조절하며, 항상성을 유지하는데 있어 중요한 역할을 한다. Lipopolysaccharide (LPS)의 자극에 의해 활성이 증가하며, 이 LPS는 외부의 항원과 공유결합으로 결합된 지질과 다당류의 복합체로서 주로 그람음성균(Gram-negative bacteria)의 외막 성분으로 존재하는 내독소(endotoxin)이다

*Corresponding author

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

E-mail: jylee@hoseo.edu

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

[4, 5]. 손상된 조직에 있는 세포나 단백질들은 사이토카인의 분비를 촉진시키면서 다른 세포들과 작용하여 면역반응이 시작되고 염증상태가 유도된다. 염증매개물들은 전사 후 RNA 단계에서 조절을 받고 있는 물질들이 많으며, RNA단계에서 조절을 받게되는 mRNA 전사물들은 3'untranslated (UTR) region에 AU-rich element (ARE)를 가지고 있어 불안정한 상태의 RNA로 존재하므로 전사 후 단계에서 그 발현이 조절된다[6]. 이러한 염증 매개 물질들이 형성되면 arachidonic acid가 cyclooxygenase (COX)의 작용을 거쳐 leukotriene, thromboxane, prostaglandin 등으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide (NO)의 대량 생성에 관여함으로써 염증매개에 큰 역할을 하며, 숙주의 치명적 손상을 입힌다고 알려져 있다[7, 8]. 그 중 free radical인 NO는 반응성이 높은 물질로 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)의 두 그룹으로 나누어진다. 특히 iNOS는 외부자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면, hepatocytes, smooth muscle cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현되어 NO를 다량으로 생산한다고 보고되고 있다[9]. 전 염증성 사이토카인의 생성에는 extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), p38 kinases (p38), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases (MARKs), nuclear factor kappa B (NF- κ B) nuclear factor kappa B (NF- κ B)가 관여하는 것으로 알려져 있다. 대식세포에서 LPS의 자극이 오면 MAPKs와 NF- κ B가 활성화되어 각종 염증인자들의 생성을 유도시킨다[10, 11]. 따라서 다양한 염증성 질환들을 개선하기 위해서는 염증을 유발하는 염증인자와 염증반응에 관여하는 MAPKs와 NF- κ B의 활성을 조절하는 것이 중요하다[12].

일반적으로 귀화 식물이란 비자생종으로 외국으로부터의 도적이나 비의도적으로 유입되어 인간의 도움없이 야생에서 자라는 식물을 말한다. 이러한 귀화식물의 생태적 특징은 대부분 다년생보다는 일년생과 같이 생활사가 짧은 식물이 많으며, 빠른 속도로 성장하여 많은 종자를 생산하고, 그 번식력이 우리 생태계에서 점차 서식지를 확대하여 토종식물을 위협하며 산림생태계를 교란시키고 있는 실정이다[12, 13]. 생태계 위해 외래잡초의 하나인 단풍잎돼지풀은 국화과에 속하며 원산지가 북아메리카인 종자로 번식하는 일년생 식물로서 유럽, 일본 등을 포함하여 전세계적으로 분포한다. 높이는 1 m 이상으로 자라며, 줄기는 곧추서고 많은 가지를 치고 거친 털이 있다. 잎은 대생하면서 3-5갈래로 갈라지는 특징을 가지며, 꽃은 7-9월에 피며 길이 6-12 mm, 폭 4-5 mm, 5-7능선이 있는 종자를 생산한다[15, 16].

본 논문에서는 아직까지 여러 가지 연구가 진행 되지 않

은 생태계교란식물인 단풍잎돼지풀을 새로운 식물자원으로 활용하기 위해 항염증 메커니즘을 연구하고, 화장품 천연물 소재로서의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 단풍잎돼지풀은 경기도산림환경연구소에서 경기도 오산시 인근에서 6월에 채취한 재료를 사용하였다. 채취한 시료는 분쇄한 시료의 중량의 10배 양의 70% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 침지한 후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거 후 동결 건조하여 -20℃에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

항산화 및 수렴 활성 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), hemoglobin 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 세포주인 RAW 264.7 cell은 ATCC (USA)으로부터 구입하였으며, 세포 배양에 사용한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Thermo Scientific Hyclone (USA) 및 Gibco BRL Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corporation (USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였다. NO assay에 사용한 LPS와 griess 시약은 Sigma-Aldrich Corporation에서 구입하였으며, western blot에 iNOS, COX-2, ERK1/2, p-ERK, p38, p-p38, JNK-1, p-JNK, I κ B α , β -actin의 primary antibody와 goat anti-rabbit 등의 secondary antibody는 Santa Cruz (USA)에서 구입하였다. RT-PCR에 이용한 GoScript™ Reverse Transcription System은 Promega Corporation (USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 Rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), microcentrifuge (gyrozen, Korea), microscope (Olympus, Japan), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), hemocytometer (Marienfeld, Germany), microplate reader (Tecan, Austria), PCR (ASTEC Co., Japan), Davinch-Chemi™ imager CAS-400SM System (Davinch-K Co., Korea), UV transilluminator (BioTop, Switzerland), digital

shaker (Deihan Scientific, Korea), Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)을 사용하였다.

전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법[17]을 변형하여 측정하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 60 µl와 농도별로 조제한 추출물을 120 µl씩 넣고 혼합한 후 15분간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

ABTS⁺ cation radical scavenging activity assay 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay의 방법에 의하여 측정하였다[18]. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 ethanol로 희석시켜 사용하였으며, ABTS⁺ 100 µl에 시료 100 µl를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

Astringent 활성 측정

Astringent 활성 측정은 Lee 등의 방법[19]에 따라 측정하였다. 피부 단백질과 유사한 혈액 단백질인 hemoglobin을 사용하여, 원심분리관에 각각의 시료용액과 hemoglobin 용액을 1:1로 넣어서 진탕 혼합한 다음 1,500 rpm에서 3분간 원심분리한 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. Astringent 활성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

세포 배양

본 실험에 이용한 세포의 배양을 위하여 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael 등의 방법[20]에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 0.18 ml 분주하였고, 시료를 농도별로 조

제하여 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.

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

Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Green 등의 방법[21]에 따라 griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 6 well plate에 RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well로 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양한 후 LPS 10 µg/ml을 normal을 제외하고 처리한 후 2시간 이후 농도별로 조제한 시료용액을 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 상등액과 동량의 griess 시약을 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-2, IκB-α, MAPKs의 활성을 알아보기 위하여 cell line RAW 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 LPS를 1 µg/ml 농도로 2시간 처리한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. RIPA buffer 10 ml에 100 µl의 Complete mini 1tab을 가하여 용해하고, 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit로 정량하였으며, 20 µl의 단백질을 10% acryl amide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였으며, 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 μ g/ml 농도로 2시간 처리해준 뒤 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200 μ l를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어 주었다. 그 후, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 μ l가 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조하였다. DEPC를 처리한 증류수를 50 μ l씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 μ l와 멸균수 195 μ l를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 μ g/ml) 1 μ l, 추출한 RNA (2 μ g)와 nuclease free water로 10 μ l를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, $MgCl_2$, 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

iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5X green Go Taq flexi buffer, $MgCl_2$, PCR nucleotide mix (10 mM),

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
IL-1 β	sense	AGG ACA CGA CTG CTT TCT TC
	anti-sense	GCA CCG CAG TAG GGA AGT GT
IL-6	sense	GGC TTT TAA GTG GGG CTG TC
	anti-sense	CCC AAG ATC CAC TGC AAA TG
TNF- α	sense	GAG AGG AAC ACG TTC TGG CTC C
	anti-sense	TGC TGG AGG CTG AGG CAT CC

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(40 cycles), COX-2는 96°C에서 2분, 94°C에서 10초, 51°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(40 cycles), IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 94°C에서 30초, 56°C에서 59초, 72°C에서 1분 (35 cycles)을 실행하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel을 100 V에서 40분간 전기영동한 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

통계 처리

실험결과는 Mean $\pm$ SD (Standard deviation)으로 나타내었고 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 ANOVA를 실시하여 유의성이 있을 경우 post-hoc test로 Tukey range test를 실시하여 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

단풍잎돼지풀 추출물의 전자공여능 측정 결과

활성산소는 체내 방어기전에 의해 대부분이 제거되지만 제거되지 않을 경우 인체 내에서 단백질과 지질 등과 결합하여 단백질의 변성이나 생체막의 지질 과산화, DNA 손상등을 일으켜 노화를 촉진시킬 수 있다[22]. 전자공여능 측정 실험에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 짙은 자색을 띄며 비교적 안정적인 free radical로 알려져 있다. DPPH는 시스테인, 글루타치온과 같은 함유황 아미노산과

Fig. 1. Electron donating ability of extract from *Ambrosia trifida* L. ■ AT: *Ambrosia trifida* L. extracted with 70% ethanol, □ BHT: dibutyl hydroxy toluene. Result are means $\pm$ S.D. of triplicate data.

ascirbic acid, butylated hydroxyanisole (BHA) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연 소재로부터 항산화능 검증에 많이 이용되고 있다[23].

단풍잎돼지풀 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가되는 것을 나타내었고, 1,000 µg/ml에서 84.1%의 활성을 나타내었다. Cha 등[24]의 두릅 순수용성 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 1,000 µg/ml 농도에서 28.69%의 활성을 나타내었고, Kwak 등[25]의 들깨잎, 참깨잎 추출물의 4,000 µg/ml 농도에서 각각 9%, 18.2%의 활성을 나타내는 결과와 비교하였을 때 단풍잎돼지풀 추출물의 전자공여능이 높은 활성을 나타내었음을 확인할 수 있었다.

ABTS⁺ cation radical scavenging activity assay 측정 결과

ABTS⁺ radical cation 소거능은 ABTS diammonium salt와 potassium persulfate의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 파괴되면서 특유의 색인 청록색에서 연한 녹색으로 탈색되는 것을 이용한 방법이다[26].

단풍잎돼지풀 추출물의 ABTS 소거능을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 추출물은 1,000 µg/ml 농도에서 92.5%의 소거능을 보였으며, 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 유의한 결과를 나타내었다. 이는 Park의 연구[27]에서 쑥바귀의 에탄올 추출물이 1,000 µg/ml 농도에서 8.09%의 효능을 나타낸 결과와 비교하였을 때 단풍잎돼지풀 추출물의 ABTS 소거능이 높았음을 확인할 수 있었다.

Fig. 2. ABTS⁺ cation radical scavenging activity of *Ambrosia trifida* L. extract. ■ AT: *Ambrosia trifida* L. extracted with 70% ethanol, □ Vit. C: L-ascorbic acid. Result are means ± S.D. of triplicate data.

Fig. 3. Astringent activity of extract from *Ambrosia trifida* L. ■ AT: *Ambrosia trifida* L. extracted with 70% ethanol, □ Vit. C: L-ascorbic acid. Result are means ± S.D. of triplicate data.

Astringent 저해활성 측정 결과

수렴(astringency)이란 라틴어의 as (to)와 stingere (bind)에서 유래된 말로 결합반응으로 정의하며, 수렴이란 뜻은 기본적으로 주름이 지고 혹은 움츠린다는 의미를 나타낸다. 작용의 원리는 피부 단백질이 고분자 flavonoids와 결합하여 가교결합을 형성시켜 피부가 수축되는 현상을 말한다. 이 작용으로 수렴제는 피부와 점막 혈관 등을 수축시키는 작용을 하며, 세포간극 및 림프간극을 가로막아 점액의 분비를 억제시키는 효과가 있다. 또한 수렴제는 단백질과 결합하는 성질을 가지고 있기 때문에 일반적으로 헤모글로빈의 단백질이 결합하는 정도에 따라 수렴효과를 판단할 수 있다[19, 28-30].

단풍잎돼지풀 추출물의 astringent 활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 추출물의 astringent 저해활성은 1,000 µg/ml에서 94.7%의 저해활성을 나타내었다. 이는 Lee 등[19]의 함초 추출물을 이용한 연구에서 10,000 µg/ml에서 50%의 수렴효과를 나타낸 것과 비교하였을 때 단풍잎돼지풀 추출물의 활성이 더 우수함을 확인할 수 있었다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)는 담황색의 기질로서 생 세포의 미토콘드리아 내의 호흡연쇄 효소에 의해 환원되어 암적색의 formazan을 생성한다. Formazan의 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 되며, 죽은 세포에서는 반응이 일어나지 않고 formazan 생성하는 생 세포를 측정하는 검사법이다[31].

단풍잎돼지풀 추출물의 대식세포(RAW 264.7) 세포에서의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 4와 같

Fig. 4. Cell viability of extract from *Ambrosia trifida* L. on macrophage cells (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (5×10^4 cells) were started in medium for 24 h the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml of extracted AT for 24 h. Result are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 추출물은 500 µg/ml 이하의 농도에서 97.6% 이상의 세포 생존율을 나타내었으며, 본 실험에서는 100% 이상의 생존율을 보이는 100 µg/ml 농도 이하에서 실험을 진행하였다. Park 등[32]의 아글리콘 분획물은 50 µg/ml 농도에서 29%의 독성을 보였으며, Kwen 등[33]의 백강잠 추출물은 500 µg/ml에서는 16.7%의 생존율을 나타낸 결과와 비교하였을 때 단풍잎돼지풀 추출물의 세포 생존율이 상당히 높았음을 확인할 수 있었다.

Nitric oxide (NO) 저해활성 측정

NO는 혈액응고, 혈압 및 신경전달 기능의 조절 등 생리학적 과정에 관여하며, 농도에 따라 세포 기능 유지에 중요한 작용한 작용을 하지만 고농도의 NO 생성은 염증을 유발시키게 되며, 조직의 손상, 유전자 변이 등을 일으키고, 유해물질을 생성하여 암의 형성과 진행에 중요한 역할을 하고 세포 내 유해한 산화물질의 축적, DNA 손상을 일으키며 미토콘드리아에 감지되어 cytochrome C, apoptosis inducing factor를 방출하게 되어 세포자멸사를 초래하는 것으로 알려져 있다[34-37].

활성산소 중 하나이며 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 단풍잎돼지풀 추출물의 효과를 측정한 결과를 Fig. 5와 같이 나타내었다. LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 생성량을 보였으며, 단풍잎돼지풀 추출물을 처리한 군은 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 가장 높은 농도인 1,000 µg/ml에서 45.1%의 저해율을 나타낸 것으로 확인하였으며, RAW 264.7 세포

Fig. 5. An effect of *Ambrosia trifida* L. extract on production of nitric oxide in RAW 264.7 cells. The effect of AT extract on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells was measured. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells) were treated with AT 70% ethanol extract and LPS (1 µg/ml) for 24 h. NO production was determined in culture supernatant by griess reagent. Con: control, in RAW 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in RAW 264.7 cells not treated with LPS. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

에서 염증발현을 억제시키는 것에 단풍잎돼지풀 추출물이 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

RAW 264.7 세포에서 단백질 발현 억제 효과 측정 결과

염증반응이 일어나면 염증매개물질인 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), 염증성 cytokine 등이 분비된다. 그 중 염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase (NOS)에 의해 합성되며, NOS에는 endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS (iNOS)의 세가지 형태가 존재한다. 이들 중 iNOS에 의한 NO형성은 병리학적으로 중요한 역할을 한다[15]. 다른 염증인자 중 하나인 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2가 존재하며, 이는 다양한 세포에서 다른 경향을 나타낸다. COX-1은 정상적인 세포에서 정상적인 생체기능을 하지만 COX-2는 염증반응 부위에서 발현이 된다. COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 통증, 발열 등에 관여하는 염증 매개체로서 염증반응, 면역반응에 관여하고 혈관신생을 촉진시키는 것에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[12].

단풍잎돼지풀 추출물이 염증유발 인자인 iNOS, COX-2, IκB-α, MAPKs 단백질의 발현억제에 기인하여 생성을 억제시키는지에 대해 알아보기 위하여 western blot을 진행하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거

Fig. 6. iNOS (A), COX-2 (B) protein expression rate of *Ambrosia trifida* L. extract on macrophage cells (RAW 264.7). (A) iNOS protein expression rate of AT extract. (B) COX-2 protein expression rate of AT extract. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from AT for 24 h. Con: control, in RAW 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in RAW 264.7 cells not treated with LPS. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 7. An effect of *Ambrosia trifida* L. extract on the LPS-stimulated MAPKs phosphorylations in macrophage cells (RAW 264.7). (A) ERK1/2 protein expression rate of AT extract. (B) P38 protein expression rate of AT extract. (C) JNK-1 expression rate of AT extract. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from AT for 24 h. Con: control, in RAW 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in RAW 264.7 cells not treated with LPS. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 8. Iκ-Bα protein expression rate of *Ambrosia trifida* L. extract on macrophage cells (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 25, 50 and 100 μg/ml of extracts from AT for 24 h. Con: control, in RAW 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in RAW 264.7 cells not treated with LPS. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

의 없는 house keeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 단백질 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 그 결과 Fig. 6에 나타내었다. 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 iNOS는 대조군인 Vit. C보다 단백질 발현양이 억제되었음을 확인하

였고, COX-2는 Vit. C와 비교하였을 때 유의한 결과를 나타내었다. LPS로 유도된 cytokine의 생성을 억제하는 기전을 알아보기 위해 MAPK family인 ERK1/2, p38, JNK-1의 활성화 정도를 알아보았다. MAPKs의 활성화는 각각의 인산화를 통해 이루어진다. 그 결과 Fig. 7과 같이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 단풍잎돼지풀 추출물을 처리한 군에서 ERK1/2, p38, JNK-1의 인산화가 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다. NF-κB 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 Iκ-Bα의 분해 정도를 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. LPS에 의해 증가된 Iκ-Bα의 단백질 발현양이 농도의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 100 μg/ml 농도에서 52.9%의 발현억제를 나타내었다.

RAW 264.7 세포에서 mRNA 발현 억제 효과 측정 결과

LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증유발 인자인 iNOS, COX-2와 pro-inflammato cytokine인 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 mRNA 발현 억제 효과를 mRNA의 수준에서 조절되는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 실험하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 9와 같이 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2 mRNA 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 대조군 Vit. C보다 단풍잎돼지풀 추출물에서 iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 유사하거나 억제되었음을 확인할 수 있었다. 또한 pro-inflammato cytokine인 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 mRNA 발현양의 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 단풍잎돼지풀 추출

Fig. 9. iNOS, COX-2 mRNA expression rate of extract from *Ambrosia trifida* L. on macrophage cells (RAW 264.7). (A) iNOS mRNA expression rate of AT extract. (B) COX-2 mRNA expression rate of AT extract. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 25, 50 and 100 μg/ml of extract from AT for 24 h. Con: control, in RAW 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in RAW 264.7 cells not treated with LPS. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 10. Pro-inflammatory cytokine mRNA expression rate of extract from *Ambrosia trifida* L. on macrophage cells (RAW 264.7). (A) IL-1 β mRNA expression rate of AT extract. (B) IL-6 mRNA expression rate of AT extract. (C) TNF- α mRNA expression rate of AT extract. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of extract from AT for 24 h. Con: control, in RAW 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in RAW 264.7 cells not treated with LPS. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

물의 처리한 농도가 높아질수록 mRNA 발현양이 억제되는 것을 확인하였으며, 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때, IL-1 β 는 대조군에 비해 감소하는 결과를 나타내었고, IL-6와 TNF- α 는 대조군에 비해서 감소하지는 않았지만 유의한 결과를 확인하였다.

요 약

본 연구는 단풍잎돼지풀 70% 에탄올 추출물의 항염증 활성을 검증하기 위해 수행되었다. 단풍잎돼지풀 70% 에탄올 추출물의 전자공여능 측정과 ABTS $^+$ 라디칼 소거능을 측정

한 결과, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 84.1%와 92.5%의 효과를 나타냈고, 수렴활성 측정을 한 결과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 94.7%의 효과를 보였다. 단풍잎돼지풀 70% 에탄올 추출물의 항염증 효과를 측정하기 위해 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW 264.7세포를 사용하여 효과를 측정하였다. 세포에서 단풍잎돼지풀 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다. Nitric oxide 생산을 억제하는 효과를 측정한 결과, 단풍잎돼지풀 추출물에서 농도가 증가할수록 NO 생성이 감소되는 효과를 확인하였다. 단풍잎돼지풀 추출물의 단백질 발현효과를 western blot을 통

해 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 측정하였고, 양성 대조군으로 β -actin을 사용하였다. 그 결과, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 단백질 발현효과는 100 µg/ml 농도에서 8.6%, 25.1%의 감소됨을 확인하였다. ERK1/2, p38, JNK와 I κ -B α 의 단백질발현 효과는 인산화를 통해 확인하였고, 농도의존적으로 감소하였음을 확인하였다. mRNA 발현 억제 효과를 RT-PCR을 통해 25, 50, 100 µg/ml의 농도에서 측정하였고, 양성 대조군으로 GAPDH를 사용하였다. 그 결과, LPS로 유도된 대식세포에서 iNOS, COX-2, interleukin (IL)-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현 억제 효과는 농도가 증가할수록 발현이 감소됨을 확인하였다. 결론적으로 단풍잎돼지풀 추출물은 염증을 억제할 수 있는 가능성이 있는 항염증 소재의 가능성을 증명하였다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Jang YA, Kim HA, Yang JC, Lee JW, Kim BA, Lee JT. 2015. A study on the possibility of extracts from *Sparassis crispa* for cosmetic ingredients. *J. Korean Soc. Appl. Biol.* **32**: 731-739.
- Ge J, Wang D, He R, Zhu H, Wang Y, He S. 2010. Medicinal herb research: serum pharmacological method and plasma pharmacological method. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 1459-1465.
- Yoo HJ. 2008. Anti-angiogenic and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* extract. Dissertation, Sookmyung Women's University of Korea.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine -dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**: 1425-1431.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, et al. 2000. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur. J. Pharmacol.* **406**: 301-309.
- Stumpo DJ, Lai WS, Blackshear PJ. 2010. Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *Wiley Interdiscip Rev. RNA* **1**: 60-80.
- McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**: 24-32.
- Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. 2009. Antiinflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Korean J. Herbol.* **24**: 39-47.
- Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, et al. 2007. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF- κ B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol. Cells* **23**: 398-404.
- Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, et al. 1999. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J. Immunol.* **163**: 6403-6412.
- Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Balcwin AS. 2003. A nucleosomal function for I κ B kinase- α in NF- κ B-dependant gene expression. *Nature* **423**: 659-663.
- Kim DW, Yun HJ, Heo JY, Kim TH, Cho HJ, Park SD. 2010. Antioxidative and anti-inflammatory effect of Do-Ki-Tang methanol extract in mouse macrophage cells. *Korean J. Herbology* **25**: 103-112.
- Kim JM, Lim YJ, Jeon ES. 2000. Naturalized Plants of Korea. Science Books, Korea.
- Luken JO, Thiert JW. 1996. Assessment and Management of Plant Invasion. Springer, USA.
- Ryang HS, Kim DS, Park SH. 2004. Weed forms, physiology and ecology II. Previous Agricultural Resources Book, Korea.
- Lee CB. 2003. Fundamental colors Korean Plant Dictionary. Hyangmunsa, Korea.
- Blois MS. 1958 Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**: 1199-1200.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
- Lee JT, Jeong YS, An BJ. 2002. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J. Herbology* **17**: 51-60.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochem.* **126**: 131-138.
- Slater TF. 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* **222**: 1-5.
- Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 128-134.
- Cha JY, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Cho YS. 2009. Antioxidative Activity of *Aralia elata* Shoot and Leaf Extracts. *J. Life Sci.* **19**: 652-658.
- Kwak YE, Ki SH, Noh EK, Shin HN, Han YJ, Lee YN, et al. 2013. Comparison of antioxidant and anti-proliferative activities of *Perilla* (*Perilla frutescens* Britton) and Sesame (*Sesamum indicum* L.) leaf extracts. *Korean J. Food Cookery Sci.* **29**: 241-248.
- Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of tricholoma matsutake sing. (Pine

- Mushroom). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 555-560.
27. Park SJ. 2014. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from *Ixeris dentata* Nakai. *Korean J. Culinary Res.* **20**: 133-142.
28. Kwon KM. 2007. Studies on cosmeceutical using mycelium culture extracts of Korean native mushrooms. Dissertation, Sungkyunkwan University of Korea.
29. Lodetti G, D'Abrosca F, Fontana P, Pavoni E, Gigola P. 2004. Set up of in vitro methods able to detect the safety of astringent liquids. *Minerva Stomatol.* **53**: 361-367.
30. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. 2001. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* **74**: 283-290.
31. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, 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.
32. Park SA, Park J, Park CI, Jie YJ, Hwang YC, Kim YH, et al. 2013. Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifer* leaf extracts. *Korean J. Microbiol. Biorechnol.* **41**: 407-415.
33. Kwon IH, Du IS, Park MC, Hwang CY, Kim NK. 2005. Effect of *Batryticatus bombycis* extract on apoptosis in B16F10 cells. *Korean J. Ori. Physiol. Pathol.* **19**: 765-771.
34. Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. 2005. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology* **208**: 249-258.
35. Ide N, Lau BH. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J. Nutr.* **131**: 1020S-1026S.
36. Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* **569**: 321-326.
37. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon HJ, Weise MF, Nathan CF. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7773-7777.