

화살나무(*Euonymus alatus*)와 회잎나무(*Euonymus alatus* for. *ciliatodentatus* (Franch. & Sav.) Hiyama) 추출물의 대식세포에 대한 항염증 활성비교

김정화 · 오수연 · 한주환* · 이귀용* · 안찬기* · 황방연** · 이재권#
충북대학교 사범대학 생물교육과, *충청북도 산림환경연구소, **충북대학교 약학대학
(Received July 4, 2014; Revised November 12, 2014; Accepted November 13, 2014)

Compared Anti-inflammatory Activity of *Euonymus alatus* and *Euonymus alatus* for. *ciliatodentatus* (Franch. & Sav.) Hiyama Extract on Macrophages

Jeong Hwa Kim, Su-Yeon Oh, Ju Hwan Han*, Gooi Yong Lee*, Chan Ki An*, Bang Yeon Hwang** and Jae Kwon Lee#
Department of Biology Education, College of Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
*Forest Environment Research Institute, Chungbuk 363-874, Korea
**Department of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract — *Euonymus alatus* (EAE) and *Euonymus alatus* for. *ciliatodentatus* (Franch. & Sav.) Hiyama (EACHE) belong to the Celastraceae family and are one of the medicinal herbs used in traditional medicine as a therapeutic agent for blood circulation diseases. In this study, we prepared leaves methanolic extract of EAE (L-EAE), twigs methanolic extract of EAE (T-EAE), leaves methanolic extract of EACHE (L-EACHE) and twigs methanolic extract of EACHE (T-EACHE), and compared their anti-inflammatory activities. To analyze the anti-inflammatory activities, Raw 264.7 cells were used, since they are immature-macrophages and easily matured by lipopolysaccharide (LPS) stimulation. All extracts showed anti-inflammatory activities in the activated Raw 264.7 cells. That is, we showed that L-EACHE and T-EACHE are potent inhibitors of the production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines. These results are expected to serve as a guide for future studies on the ability of Celastraceae family to inhibit acute and chronic inflammatory diseases.

Keywords □ *Euonymus alatus*, *Euonymus alatus* for. *ciliatodentatus* (Franch. & Sav.) Hiyama, macrophage, anti-inflammation

화살나무(*Euonymus alatus*)는 중북부 중국, 일본, 한국 등에 분포하며 Celastraceae과(family)에 속한다. 일반적으로 방추형의 날개가 달린 줄기가 특징적이며, 붉은 빛깔의 단풍 때문에 '불타는 덩굴'이라는 별명을 가지고 있다. 이 낙엽 관목은 높이 성장보다는 주로 옆으로 퍼지면서 번식한다. 날개 줄기의 특징은 학명에서도 알 수 있는데, *alatus*는 "날개"의 뜻을 지닌 라틴어이다. 화살나무 잎은 2~7 cm 길이에 1~4 cm 넓이로 타원형으로 이루어져 있으며, 꽃은 녹색으로 봄 동안 피어있으며, 열매는 네 잎 모양 분홍색, 노란색 또는 오렌지 캡슐로 둘러싸인 붉은 껍질

로 이루어져있다. 주로 관상용으로 많이 사용되지만, 최근 들어서 항염증,¹⁾ 항산화,^{2,3)} 항비만⁴⁾ 등 다양한 생리활성이 알려지면서 주목을 받기 시작하였다. 반면 회잎나무(*Euonymus alatus* for. *ciliatodentatus*(Franch. & Sav.) Hiyama)는 화살나무와 같은 과에 속하며 매우 유사한 특징을 지니고 있지만, 화살나무의 가장 중요한 특징인 줄기 부분에 날개 구조가 존재하지 않는다. 뿐만 아니라 생물학적인 연구도 거의 이루어지지 않아서 지금까지 보고된 활성 연구 결과를 찾기가 어려운 형편이다. 그러므로 본 연구에서는 화살나무의 항염증을 기준으로 회잎나무의 항염증 활성을 비교분석하였다.

감염 및 질병의 발생은 면역 기능이 저하된 상태에서 주로 발생하기 때문에 신체 면역체계의 기능이 저하된 경우 천연물을 통해 이들 면역 반응을 증진시킬 수 있는 다양한 연구가 이루어지고 있다. 최근 이러한 요구에 부응하여 천연물 중에 존재하는 성분들의 단순한 영양소 역할 외에 기능성 물질로서의

#Corresponding Author

Jae Kwon Lee
Department of Biology Education, College of Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
Tel.: 043-261-2734 Fax.: 043-260-3361
E-mail: chemokine@cbnu.ac.kr

역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 천연 식물 자원을 대상으로 면역증강 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁵⁾ 최근의 연구결과에 따르면 염증은 암을 포함하여 대부분의 만성 질환에 원인으로 작용할 수 있기 때문에 많은 관심을 받는 주제 중 하나이다. 그러므로 염증을 억제하는 물질은 임상적으로 큰 의의가 있으며, 더욱이 예로부터 오랜 시간동안 먹어 왔던 천연물 성분으로부터 항염증 성분을 찾아낸다면, 활성 성분의 생체독성으로부터 어느 정도 자유로울 수 있다는 장점이 있다. 대표적인 예로 허브를 들 수 있는데, 부작용이 없으며 이론적으로 설명이 가능한 기전을 통해 항염증 효과가 규명된 바 있다.

대식세포(Macrophage)는 내재면역 뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 면역 반응에 관여하여 숙주의 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다. 면역 활성을 받은 대식세포는 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 사이토카인(cytokine)과 산화질소(nitric oxide)의 생산을 통하여 감염 초기 생체 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁶⁻¹⁰⁾ 그러나 이 같은 면역 물질의 지나치거나 잘못된 생성은 강력한 염증 반응을 유도하게 된다.

본 연구에서는 동일한 과에 속하며 외형적으로도 매우 유사한 두 나무의 항염증 활성을 비교하기 위하여, 염증 활성이 증가된 마우스 대식세포(Raw 264.7)로부터 분비되는 염증 유도 물질들(산화질소, inducible nitric oxide(iNOS) 및 염증성 사이토카인)의 생성 변화를 실험하였다.

재료 및 실험방법

메탄올 추출물의 제조

화살나무와 회잎나무의 잎과 줄기를 분리하여 수돗물로 2~3번 씻어내고 건조기를 사용하여 완전히 건조한 후 파쇄기로 미세하게 파쇄 시켜 사용 시까지 냉동보관(-20°C)하였다. 건조물 500 g에 100% 메탄올 500 ml를 가하여 상온에서 4일간 추출한 다음 추출물을 거즈로 1차 여과하였다. 여과액을 3000 \times g에서 3분간 원심 분리한 다음, 상층액만을 취하여 0.2 μ m filter로 여과하였다. 여과시킨 추출물은 감압건조기(evaporator)를 이용하여 농축하였다.

실험 재료

Lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, U.S.A.)에서, WST-8은 Takara Bio Inc.(Takara Bio Inc, Japan)에서, COX-2, iNOS, β -actin의 단클론 항체 그리고 이 항체들에 대한 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, U.S.A.)에서 구입하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen(Rockford, IL, U.S.A.)에서 구입하였다.

세포 배양

쥐 대식구 세포주(mouse macrophage cell line)인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Hyclone Laboratories, Logan, UT, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone Laboratories), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin(Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

세포 독성 측정

96 well plate 에 5 \times 10⁵ cells/well의 농도로 Raw 264.7 세포를 분주하여 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 시료의 농도를 3.1255~100 μ g/ml으로 1시간 동안 전 처리 후, LPS(1 μ g/ml)를 첨가하였다. 28시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양한 후, WST-8 시약을 각 well에 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 정도 배양하였다. 측정은 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소(nitric oxide) 생성량 측정

Raw 264.7 세포를 '세포 독성 측정' 방법과 동일한 방법으로 배양하였다. 배양 상층액 중 산화질소의 농도는 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid+1% α -naphthylamide in H₂O)을 이용하여 흡광도 550 nm에서 측정하였다.

효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay)

사이토카인을 측정하기 위하여 6 well plate에 세포(0.5 \times 10⁶ cells/ml)를 분주하고 시료의 농도를 50 μ g/ml이 되도록 1시간 동안 전 처리한 후, LPS(1 μ g/ml)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 상층액을 수거하여 사이토카인을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, U.S.A.)를 사용하여 측정 하였다.

웨스턴 블롯법(Western blot)

Raw 264.7 세포를 6 well plate(1.5 \times 10⁶ cells/ml)에 시료의 농도를 50 μ g/ml이 되도록 처리하여 1시간 동안 전 처리 후, LPS(1 μ g/ml)를 첨가하였다. 일정 시간 배양 후 원심분리 방법으로 세포를 수거하였다. 회수한 세포를 Proprep(Intron, Seoul, Korea)으로 분쇄하여 세포 추출물을 준비하였다. 준비된 시료는 bicinchoninic acid(BCA)법으로 총 단백질량을 구하였다. 정량된 단백질을 동일한 농도로 12% SDS-PAGE에 전기영동한 후 polyvinylidene difluoride(PVDF) 막에 옮기고 나서 5% BSA로 2시간 blocking 하였다. β -Actin, iNOS, COX-2 단백질의 발현은 각각의 단 클론 항체를 이용하여 확인하였다.

통계처리

실험 결과는 mean±SD로 나타냈으며, t-test의 통계처리 방법으로 통계적 유의성을 검정하였다.

실험결과

화살나무와 회잎나무 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성 Fig. 1에 나타난 것과 같이 실험군은 화살나무의 잎 추출물(L-EAE)과 줄기 추출물(T-EAE), 회잎나무 잎 추출물(L-EACHE)과

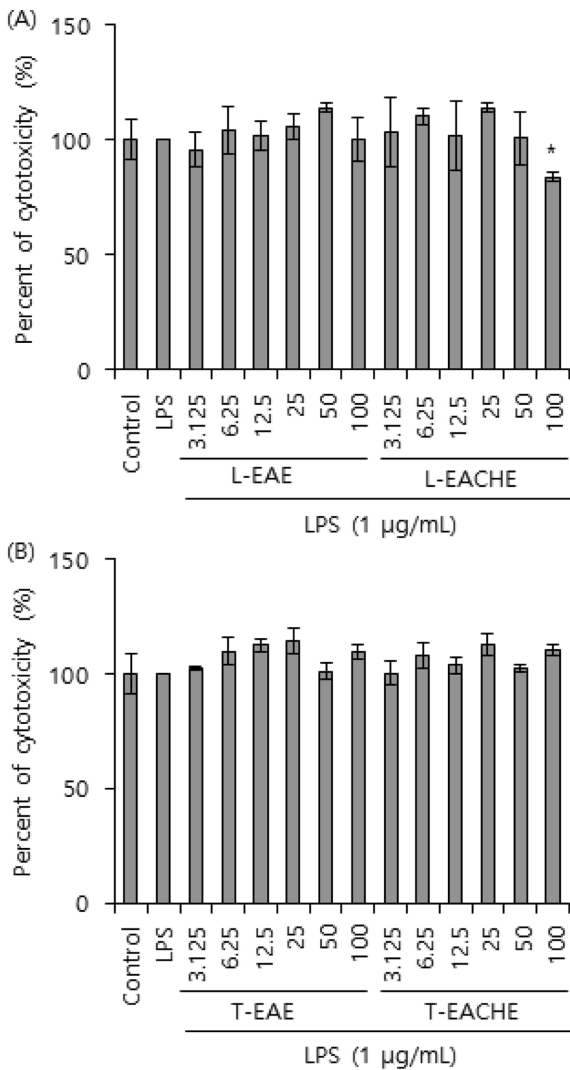


Fig. 1 – Cytotoxicity of leaves and twigs methanolic extract of EAE or EACHE on Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with various concentrations (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml) of leaf extracts (A) and stem extracts (B) for 1 hour and then the cells were stimulated with 1 µg/ml of LPS. After 30 hour, cytotoxicity was determined using the WST-8 reagent. The values that are shown are the means±SDs of the three independent experiments. **p*<0.05 as compared to the cells treated with LPS.

줄기 추출물(T-EACHE)을 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하고, 음성 대조군은 무처리군(control), 양성 대조군은 LPS(1 µg/ml)만 처리한 실험군으로 하여 30시간 배양 후 WST-8을 이용하여 Raw 264.7 세포에 대한 세포 독성을 비교하였다. 실험 결과 화살나무의 잎과 줄기 그리고 회잎나무의 줄기 추출물은 100 µg/ml까지도 세포 독성이 나타나지 않는 반면, 회잎나무의 잎 추출물은 100 µg/ml에서 약간의 세포 독성이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

화살나무와 회잎나무 추출물이 대식세포가 산화질소를 생성하는데 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 화살나무의 잎과 줄기 추출물과 회잎나

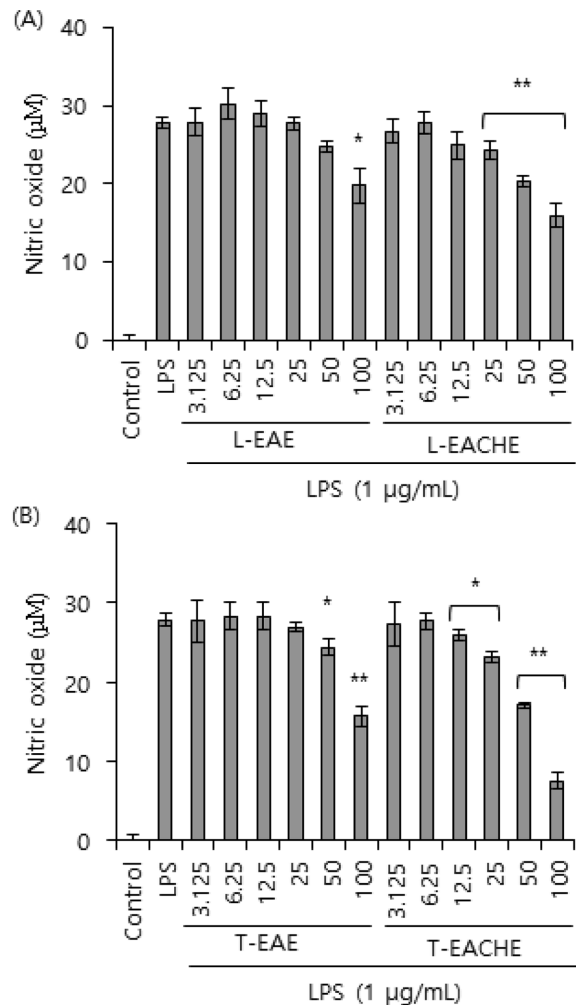


Fig. 2 – Effects of leaves and twigs methanolic extract of EAE or EACHE on the NO production of the LPS-stimulated Raw 264.7 cells. The test samples were treated as described in Fig. 1. After 30 hour, the culture supernatant was subjected to nitrite assay. The values shown are the means±SDs for three independent experiments. **p*<0.05; ***p*<0.01 as compared to the cells treated with LPS.

무 잎과 줄기 추출물에 의한 산화질소 생성 억제 효과를 관찰하기 위하여 시료를 Fig. 1에서와 동일한 조건으로 처리한 후 얻어지는 세포배양 상층액에서 산화질소 생성을 측정하였다. Fig. 2에서 확인할 수 있듯이 무처리 대조군에서는 산화질소가 생성되지 않은 반면, LPS 처리한 양성 대조군에서 28 μM 정도의 산화질소가 생성되었다. LPS에 의해 증가된 산화질소의 생성량은 회잎나무의 잎(L-EACHE)과 줄기(T-EACHE) 추출물 그리고 화살나무 잎(L-EAE)과 줄기(T-EAE) 추출물 모두의 전 처리에 의해 감소되었다. 단, Fig. 1의 결과로 미루어 볼 때 회잎나무 잎 추출물(L-EACHE) 100 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서 보이는 산화질소 생성 억제 효과는 세포독성으로 볼 수 있다. 회잎나무 줄기 추출물(T-EACHE)은 가장 강력한 산화질소 억제 효과를 나타내었는데, LPS만 첨가한 실험군과 비교하여 산화질소 생성이 70% 이상 차단되었다.

화살나무와 회잎나무 추출물의 iNOS 발현에 미치는 영향

화살나무와 회잎나무 추출물에 의한 산화질소 생성 억제 효과

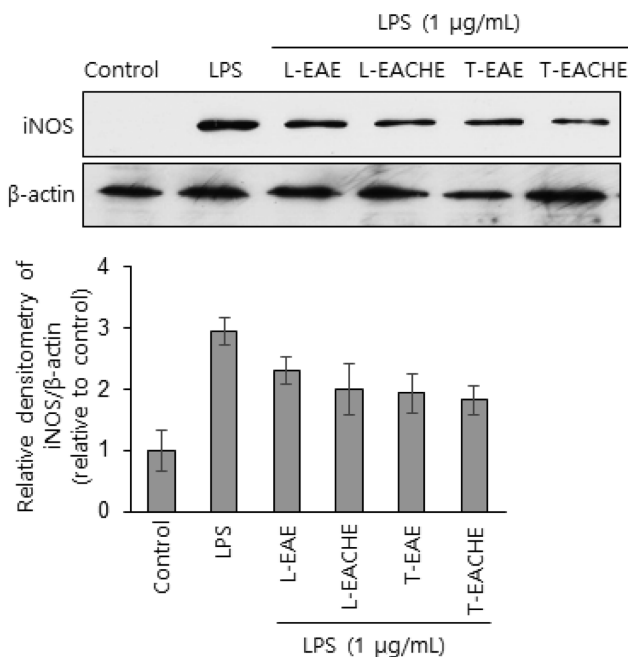


Fig. 3 – Effects of leaves and twigs methanolic extract of EAE or EACHE on the iNOS production in the LPS-stimulated Raw 264.7 cells. LPS (1 $\mu\text{g}/\text{m}$) was added in Raw 264.7 cells pretreated with each samples (50 $\mu\text{g}/\text{m}$) and the cells were incubated for 6 hour. Total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared and the resolved proteins by western blot were analyzed by anti-iNOS antibody. Each immunoreactive band was digitized and expressed as a ratio of β -actin levels. The ratio of the normal group band was set to 1.00. The values shown are means \pm S.D. for three independent experiments. $**p < 0.01$ as compared to the cells treated with LPS.

의 기전을 분석하기 위하여 산화질소 생성에 중요한 효소인 iNOS의 생성을 웨스턴 블롯 방법을 이용하여 확인하였다. 화살나무의 잎·줄기 추출물과 회잎나무 잎·줄기 추출물을 모두 비독성 농도인 50 $\mu\text{g}/\text{m}$ 로 Raw 264.7 세포에 1시간 동안 전 처리한 다음, LPS를 첨가하고 6시간 동안 추가 배양한 후에 iNOS 발현을 확인하였다. Fig. 3의 결과와 같이 LPS의 처리에 의해 증가된 iNOS의 발현은 화살나무의 잎·줄기 추출물과 회잎나무 잎·줄기 추출물을 모두의 처리에 의해 감소되었다. 대조군으로는 β -actin의 발현을 관찰하였다.

화살나무와 회잎나무 추출물의 COX-2 생성에 미치는 영향

화살나무와 회잎나무 추출물의 항염증 활성을 더 알아보기 위하여 또 다른 염증 지표인 COX-2의 생성에 대한 시료들의 억제 활성을 실험하였다. iNOS 시료와 동일한 조건에서 시료를 준비한 후, COX-2 단클론 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 하였다. Fig. 4에서와 같이 LPS에 의해 증가된 COX-2 생성은 화살나무와 회잎나무 줄기 추출물에 의해 현저하게 감소하였다. 그러나 두 나무의 잎 추출물은 LPS에 의해 증가된 COX-2 생성을 감소

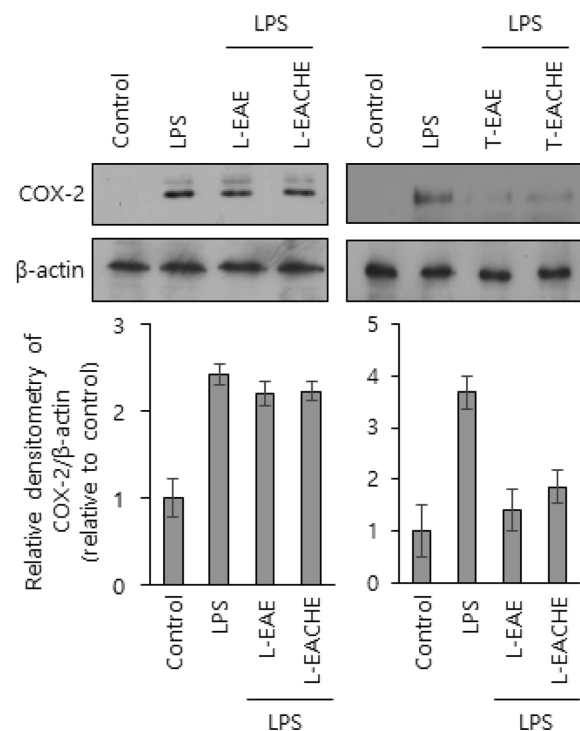


Fig. 4 – Effect of leaves and twigs methanolic extract of EAE or EACHE on COX-2 production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated as described in Fig. 3, harvested and used as an western blot analysis. Each immunoreactive band was digitized and expressed as a ratio of β -actin levels. The ratio of the normal group band was set to 1.00. The values shown are means \pm S.D. for three independent experiments. $**p < 0.01$ as compared to the cells treated with LPS.

시키지 못하였다.

을 나타내었다.

화살나무와 회잎나무 추출물이 사이토카인의 발현에 미치는 영향

대식세포에 의해 발생 가능한 염증반응을 억제하는 화살나무와 회잎나무의 잎과 줄기 추출물의 활성을 좀 더 알아보기 위하여 염증 활성이 증가된 대식세포로부터 분비되는 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비량을 효소면역분석법으로 분석하였다. 사이토카인의 양을 측정하기 위하여 세포에 시료(50 μ g/ml)를 1시간 동안 전 처리한 후, LPS를 첨가하고 24시간 동안 배양한 다음 배양 상층액에 존재하는 사이토카인의 양을 측정하였다. Fig. 5에서와 같이 무처리 대조군에서는 3 종류의 사이토카인이 매우 소량 검출되는 반면, LPS의 처리에 의해 사이토카인의 생성이 급격히 증가되었다. TNF- α 의 생성은 화살나무와 회잎나무 잎·줄기 추출물 모두의 전처리에 의해 억제되지 않았다. 반면 IL-1 β 와 IL-6의 생성은 화살나무와 회잎나무 잎·줄기 추출물 모두에 의해 억제되었다. 특히 회잎나무의 잎·줄기 추출물 모두 화살나무보다 더 강한 억제 활성

고 찰

본 연구는 동일한 과에 속해있으며 외형적으로 매우 유사한 화살나무와 회잎나무 추출물의 항염증 활성을 비교하였다. 화살나무는 다양한 생리활성에 대한 연구가 이루어 졌으며, 그 중에서도 항염증 활성은 이미 많은 연구를 통하여 검증 된 바 있다. 기존에 발표된 연구결과에 따르면 화살나무의 잎과 줄기로부터 분리한 isoprenoids, phenolics, flavonoids가 Raw 264.7 세포로부터 산화질소 생성을 억제한다고 보고된 바 있다.¹¹⁾ 뿐만 아니라 화살나무의 잎과 줄기에서 분리된 20 여종의 리그난들의 대부분이 Raw 264.7 세포로부터 산화질소의 생성을 억제한다는 보고도 있다.¹²⁾ 화살나무 줄기에서 발견된 새로운 구조의 phenolics 중 일부도 산화질소의 생성을 억제한다는 보고가 있다.¹⁾ 그러나 회잎나무의 경우에는 항염증 활성에 대한 보고가 전무하므로 산화질소의 억제 효과 또한 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 화살나무와 회잎나무의 잎과 줄기 추출물에 의한 산화질소 생성 억제 효과를 검증하였다. 산화질소는 강력한 염증 유도인자로서^{13,14)} 대식세포에서 iNOS와 같은 효소에 의해 생성이 유도된다. 산화질소는 혈관확장과 병원체 사멸과 같은 목적에 의해 생산된다.¹⁵⁾ 그러나 산화질소의 지나친 생산은 세포에 대한 산화 독성을 나타내어 염증과 같은 질병 상황을 만들게 된다. 뿐만 아니라 산화질소는 염증성 사이토카인의 생성을 강력히 유도할 수 있기 때문에 염증 반응 초기에 생성되어 질환을 악화시키는 역할을 수행한다. 본 연구 결과로 볼 때 산화질소의 생성 억제 효과는 잎 보다는 줄기 추출물이 더 강한 것을 알 수 있었다. 다만 회잎나무 잎 추출물을 100 μ g/ml로 Raw 264.7 세포에 첨가한 경우 약 17% 정도의 세포독성이 나타났기 때문에 이 농도에서 나타난 산화질소 억제 효과는 세포독성에 의한 것으로 볼 수 있다. 그러나 그 밖의 실험 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았기 때문에 화살나무와 회잎나무 추출물은 산화질소 억제 효과가 있는 것으로 볼 수 있다.

COX-2도 산화질소와 동일하게 염증을 유도하는 물질로 알려져 있으며, 대표적인 기능으로는 prostaglandin을 활성 구조로 변형시켜주는 역할을 한다. COX-2는 병원체로부터 나오는 내독소(endotoxin)나 염증 반응에 의해 분비되는 산화질소 또는 전염증성 사이토카인에 의해 생성이 촉진 된다. 그러므로 많은 연구자들이 COX-2 억제제를 이용하여 염증 반응을 제어하려는 연구를 수행하고 있다.^{16,17)} Fig. 4에서 확인 할 수 있듯이 화살나무와 회잎나무의 줄기 추출물은 모두 COX-2의 생성을 강력하게 억제하였으므로, 두 추출물 모두 항염증을 활성을 지닌 물질을 포함하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

TNF- α , IL-1 β , IL-6는 염증 초기에 생성이 증가되어 다양한

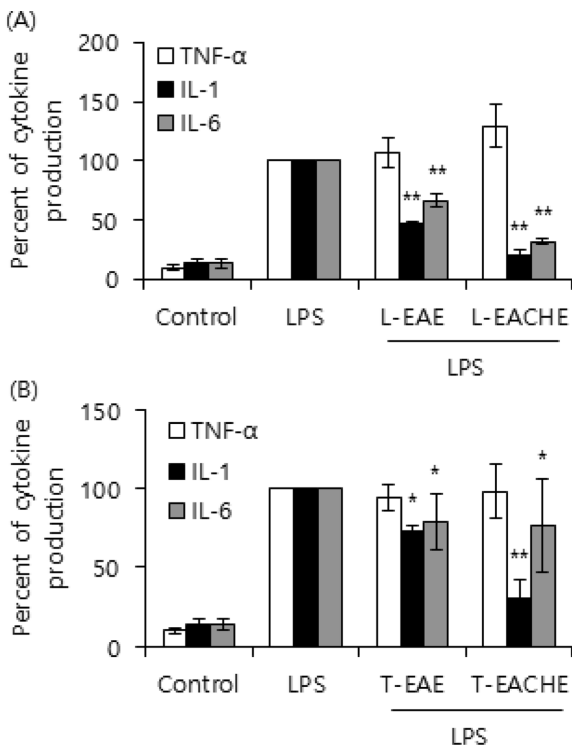


Fig. 5 – Effects of leaves and twigs methanolic extract of EAE or EACHE on TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were pretreated with 50 μ g/ml of samples for 1 hour, then LPS (1 μ g/ml) was added and the cells were incubated for 24 hour. The culture supernatant, which was subject to enzyme-linked immunosorbent assay of cytokines, was harvested. The values shown are means \pm S.D. for three independent experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01 as compared to the cells treated with LPS.

염증인자들의 생성 및 활성을 촉진하는 역할을 수행하기 때문에 전염증성 사이토카인이라고 불린다. 이 중에서도 TNF- α 는 가장 강력한 전염증성 사이토카인으로서 다른 어떤 염증 유도인자 보 다도 먼저 다량이 생성되어 염증 반응을 촉진한다. 본 연구에 사 용된 화살나무와 회잎나무의 잎·줄기 추출물은 TNF- α 의 생성 을 억제하지는 못하는 것을 나타냈다. 그러나 TNF- α 와 함께 전 염증성 사이토카인으로 분류되는 IL-1 β 와 IL-6의 생성은 화살나 무와 회잎나무의 잎·줄기 추출물에 의해 감소되었다. IL-1 β 는 TNF- α 와 함께 염증 초기에 분비되어서 세균감염, 비감염성 간 염, 자가면역질환, 이식편대숙주증과 같은 심각한 염증 반응이 진행되도록 하는 역할을 한다.¹⁸⁾ IL-6는 TNF- α 나 IL-1 β 보다 염 증을 촉진하는 활성은 약하지만, 화상이나 그 밖의 심각한 조직 손상으로 인한 염증 반응을 진행시키는데 중요한 역할을 하는 것 으로 알려져 있다¹⁹⁾. 본 연구의 결과에서 제시한 화살나무의 항 염증 효과는 이미 기존 문헌들을 통하여 발표된 바 있으나 3종 류(TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 전염증성 사이토카인의 생성 억제를 모두 실험한 연구결과는 보고 된 바 없으며, 더욱이 회잎나무와 의 활성비교 연구는 본 논문에서 처음으로 시도된 것이다.

본 논문에서는 항염증 활성에 대한 기전 연구 결과를 제시하 지 못하였다. 이전에 발표된 논문에서 화살나무의 항염증 활성 이 NF κ B의 신호전달 과정을 차단하였기 때문으로 밝혀진 바 있 다.²⁰⁾ 그러므로 후속 논문에서는 화살나무와 회잎나무의 항염증 기전을 염증성 신호 전달 체계인 NF κ B나 MAP kinases의 세포 내 신호 전달과정을 통하여 증명할 계획이다.

결 론

본 연구에서는 동일한 과에 속하며 매우 유사한 외형을 지닌 화살나무와 회잎나무의 항염증 활성을 마우스 대식세포(Raw 264.7)를 이용하여 비교하였다. 정확한 활성 비교를 위하여 각 나 무의 잎과 줄기를 따로 분리하여 메탄올로 추출한 후 농축하여 실험용 시료를 얻었다. 회잎나무와 화살나무의 잎과 줄기 추출 물 모두 대식세포의 염증 유도 물질인 산화질소의 생성을 억제 하였으며, 이 억제 활성은 산화질소의 생성을 유도하는 iNOS의 발현을 억제하였기 때문이었다. 특히 회잎나무 줄기 추출물 대 식세포의 산화질소 생성을 70% 이상 차단하였다. 화살나무와 회 잎나무 줄기 추출물은 대식세포의 또 다른 염증 유도 인자인 COX-2 생성을 현저하게 감소시켰다. 그러나 두 나무의 잎 추출 물은 LPS에 의해 증가된 COX-2 생성을 감소시키지 못하였다. 화살나무와 회잎나무의 잎·줄기 추출물은 강력한 염증 유도 물 질인 전염증성 사이토카인의 생성도 억제하였다. 특히 잎·줄기 추출물 모두 회잎나무가 화살나무보다 더 강한 억제 활성을 나 타내었다. 이상의 결과로부터 화살나무와 회잎나무의 잎·줄기 추출물에는 대식세포에 의한 염증 반응을 억제하는 성분이 포함

되어 있음을 알 수 있었다.

감사의 말씀

“이 논문은 2013년도 산림청 임업기술개발 R&D 연구비 지원 에 의하여 연구되었음”.

References

- 1) Kim, K. H., Ha, S. K., Choi, S. U., Kim, S. Y. and Lee, K. R. : Phenolic constituents from the twigs of *Euonymus alatus* and their cytotoxic and anti-inflammatory activity. *Planta Med.* **79**, 361 (2013).
- 2) Kim, K. W., Suh, S. J., Kim, J. D., Kim, S. S., Lee, I. S., Kim, J. K., Chang, G. T., Kim, D. S. and Kim, C. H. : Effects on lipid peroxidation and antioxidative enzymes of *Euonymus alatus* in cultured rat hepatocytes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **104**, 60 (2009).
- 3) Oh, B. K., Mun, J., Seo, H. W., Ryu, S. Y., Kim, Y. S., Lee, B. H. and Oh, K. S. : *Euonymus alatus* extract attenuates LPS-induced NF-kappaB activation via IKKbeta inhibition in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **134**, 288 (2010).
- 4) Park, S. H., Ko, S. K. and Chung, S. H. : *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *J. Ethnopharmacol.* **102**, 326 (2005).
- 5) Arend, W. P. and Dayer, J. M. : Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**, 151 (1995).
- 6) Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee, S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. : Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 617 (2004).
- 7) Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. : Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425 (1990).
- 8) McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A. and Corbett, J. A. : Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**, 24 (1996).
- 9) Corbett, J. A. and Mac Daniel, M. L. : Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* **181**, 559 (1995).
- 10) Cetkovic-Cvrlje, M. and Eizirik, D. L. : TNF- α and IFN- γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* **6**, 399

- (1994).
- 11) Jeong, E. J., Yang, H., Kim, S. H., Kang, S. Y., Sung, S. H. and Kim, Y. C. : Inhibitory constituents of *Euonymus alatus* leaves and twigs on nitric oxide production in BV2 microglia cells. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1394 (2011).
 - 12) Jeong, E. J., Cho, J. H., Sung, S. H., Kim, S. Y. and Kim, Y. C. : Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells by lignans isolated from *Euonymus alatus* leaves and twigs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 2283 (2011).
 - 13) Duval, D. L., Miller, D. R., Collier, J. and Billings, R. E. : Characterization of hepatic nitric oxide synthase: identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants. *Mol. Pharmacol.* **50**, 277 (1996).
 - 14) Lawrence, T., Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R. and Willoughby, D. A. : Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat. Med.* **7**, 1291 (2001).
 - 15) Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash Vili, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partyka, L., Patton, S. and Malinski, T. : Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br. J. Surg.* **85**, 1080 (1998).
 - 16) Zhang, Y., Mills, G. L. and Nair, M. G. : Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine* **10**, 386 (2003).
 - 17) O'leary, K. A., De Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'brien, N. M. and Williamson, G. : Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* **551**, 245 (2004).
 - 18) Dinarello, C. A. : Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095 (1996).
 - 19) Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. and Taga, T. : Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. **86**, 1243 (1995).
 - 20) Oh, B. K., Mun, J., Seo, H. W., Ryu, S. Y., Kim, Y. S., Lee, B. H. and Oh, K. S. : *Euonymus alatus* extract attenuates LPS-induced NF-kappaB activation via IKKbeta inhibition in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **134**, 288 (2010).