

Anti-inflammatory Effect of *Morinda citrifolia* on LPS-induced Inflammation in RAW 264.7 Cells Through the JAK/STAT Signaling Pathway

Beom Gil Jo and In Seok Bang*

The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 31499, Korea

Received November 16, 2021 / Revised February 4, 2022 / Accepted February 8, 2022

This study investigated whether or not the major bioactive compounds of Noni (*Morinda citrifolia*) are involved in anti-inflammatory activity through the JAK/STAT upper signaling pathway in RAW 264.7 cells. The experimental results show that the *M. citrifolia* ethyl acetate fraction (Mc-EtOAc) obtained by sequential fractionation with organic solvents from the plant's dried fruits exhibits the highest antioxidant activity. In addition, the cytoprotective effects of Mc-EtOAc against H₂O₂-induced oxidative stress in the RAW 264.7 cells suppressed cytotoxicity in a dose-dependent manner. The group pretreated with Mc-EtOAc at a concentration of 240 µg/ml showed higher cell viability of 84.5%, compared to 71.6% in the LPS-treated group, and LPS-induced NO production decreased to half the amount in the positive control group. Mc-EtOAc treatment also led to a significant dose-dependent reduction in iNOS expression. Although COX-2 expression was increased by 300% following LPS induction, it was significantly decreased in a dose-dependent manner by pretreatment with Mc-EtOAc at concentrations of 120 and 240 µg/ml. An inhibition of the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α was observed. The investigation also revealed that the phosphorylation levels of pJAK1 and pSTAT3 in LPS-induced RAW 264.7 cells were significantly reduced by Mc-EtOAc treatment.

Key words : Anti-inflammation, JAK/STAT pathway, *Morinda citrifolia*, pro-inflammatory cytokines, RAW 264.7 cell

서 론

염증(inflammation)은 병원균, 박테리아 및 자극 물질을 포함한 많은 유해한 자극에 의해 발생하는 조직의 손상에 대한 복잡한 생물학적 반응 중 하나로 면역세포, 혈관, 염증 매개체들이 관여하는 비특이적 면역작용이다[23, 33]. 또한 염증은 대식세포(macrophage)를 포함한 면역세포들이 조직의 손상을 최대한 억제하고, 감염체를 제거하며, 조직을 재생하는 보호 기능을 가지지만, 동시에 염증의 결과로 조직의 손상이나 질병이 일어날 수 있다[19, 24]. 염증의 개시는 Toll-like receptor (TLR)-4와 TLR-2 등의 수용체와 그 리간드(ligand)로서 세균 유래의 lipopolysaccharides (LPS) 등의 상호작용에 의해 유발된다[31]. LPS에 의해 활성화된 대식세포는 주로 nuclear factor (NF)- κ B, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) 신호전달 경로로 염증반응의 진행에 필수적인

전염증 매개체(pro-inflammatory mediator), nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine을 유도한다 [16, 20, 27]. 이러한 전염증 매개체와 cytokine은 염증 및 다양한 임상 증상으로 이어질 수 있다[9]. 과발현된 전염증 매개체와 cytokine은 동맥경화, 염증성 장 질환, 관절염, 감염성 질환 및 암을 비롯한 많은 급성 및 만성 염증성 질환에서 면역반응을 더욱 악화시킨다[36]. 따라서 이들을 억제할 수 있는 물질 또는 화합물은 잠재적 항염증제(anti-inflammatory agents)로서 고려되어 왔으며, 이들의 합성 또는 방출을 효과적으로 억제할 수 있는 것은 전신 면역반응 증후군(systemic immune response syndrome, SIRS) 치료를 위한 중요한 전략이다[12].

JAK/STAT 연쇄반응(cascade)은 면역반응을 매개하는 중요한 염증 신호전달 경로이다[28]. 특히, STATs는 LPS, interferon gamma (IFN- γ)와 같은 여러 cytokine에 의해 유발되는 염증 신호전달 연쇄반응에서 중추적인 역할을 한다[21, 25, 26]. TLR-4 활성화로 STATs의 활성화 인자로 알려진 수용체 관련 효소 JAKs의 인산화가 일어난다[29]-흥미롭게도 대부분의 cytokine 수용체는 그들의 활동에 JAKs의 조합을 사용한다 [6]. 그들의 수용체에 리간드의 결합은 JAKs의 인산화를 유도하며, 이는 STATs의 인산화를 유도하여 수용체 복합체로부터 STATs의 방출을 유도한다. 방출된 STATs는 동중 또는 이중 이량체를 형성하고 핵으로 이동하여 염증 유발 cytokine이나

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9595

E-mail : isbang@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.

inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 효소를 암호화하는 표적 유전자의 전사를 조절한다[11, 17, 35]. 이와 같이 JAK/STAT 신호전달 경로는 염증 관련 유전자 발현의 매개에 관여하기 때문에 그 활성을 엄격하게 조절, 억제하여 염증 예방 및 질병 치료를 위한 신약 개발의 핵심 분야이다.

열대 및 아열대 지역에서 자라는 노니(noni) (*Morinda citrifolia* L.)는 용담목(Gentianales) 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하며, 동의보감에는 해파극(海巴戟) 또는 파극천(巴戟天)으로 소개되어 있다. *M. citrifolia*는 씨, 줄기, 잎, 꽃, 열매 등 어느 부분이든 약효가 뛰어나다고 알려져 있으며, 그 약효가 인정되어 면역계, 신경계는 물론 소화계통과 호흡계통 병후군의 증상까지 치유 효과가 크다고 알려져 있어 그동안 임상에서 다양한 증상에 사용되어졌다. 특히 열매는 소염진통, 혈당 상승 억제, 변비 해소 및 염증해소 등 다방면에 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다[38]. *M. citrifolia* 열매에는 다양한 화합물들을 포함하고 있는데, 폴리페놀(polyphenol), 플라보노이드(flavonoid), 리그난(lignan), 이리도이드(iridoid), 쿠마린(coumarin), 다당류(polysaccharide), 스테롤(sterol) 및 지방산(fatty acid) 등이 대표적이다[8]. 특히 스코폴레틴(scopoletin)과 담나칸탈(damnacanthol) 등의 폴리페놀 물질은 *M. citrifolia* 열매의 주요한 기능성 성분으로 잘 알려져 있다[4]. 스코폴레틴은 쿠마린(coumatin)계열의 물질로 혈액 내 세로토닌 분비를 조절하고 진통완화에 효과적이며, 항염증, 항균, 항바이러스 활성, 항고혈압, 항암 효과 및 산화방지 활성을 가진다[13, 14]. 한편 생체 대사 과정 중에 필연적으로 발생하는 활성산소 종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 노화, 암, 심장질환, 동맥경화, 염증 등 다양한 질병을 일으킨다[10]. 특히 산화적 스트레스는 체내 염증의 진행 과정의 원인으로 알려져 있는데, 이와 관련된 ROS와 pro-inflammatory cytokine은 염증성 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다[5]. 따라서 항산화 효과가 뛰어난 성분은 산화적 스트레스를 감소시켜 만성적인 염증반응을 감소할 수 있다[1, 34].

본 연구는 *M. citrifolia*의 항염증 효과에 주목하여 건조된 *M. citrifolia* 열매를 methanol (MeOH) 추출에 의한 유기용매별 분획물의 항산화 효과를 확인하고, RAW 264.7 세포에서 ROS 수준에 대한 *M. citrifolia* 열매 추출 분획물의 세포보호 효과 및 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포 염증 모델에서 NO 생성 억제와 전염증 매개체와 cytokine 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향, 그리고 염증반응의 주요 신호전달 경로인 JAK/STAT 신호전달 과정과의 관련성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

*M. citrifolia*는 금산고려인삼(Korea)에서 건조 상태의 열매를 구매하여 실험에 사용하였다. 추출 및 분획 용매로 MeOH, *n*-hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)을 Daejung Chemicals & Metals CO. (Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Sigma-Aldrich (USA), Penicillin-streptomycin은 Gibco (USA), 그리고 fetal bovine serum (FBS)은 Wisent (USA)에서 각각 구입하였다. Griess reagent, LPS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), TEMED, ammonium persulfate, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 그리고 hydrogen peroxide (H₂O₂)는 Sigma (USA)에서 구입하였고 2-mercaptoethanol과 marker는 BioFACT (Korea)에서 구입하여 사용하였다. Western blotting에 iNOS와 JAK1, 그리고 phospho-STAT3 1차 antibody는 Santa Cruz (USA)에서 구입하였고, COX-2와 STAT3의 1차 antibody는 Cayman Chemical (USA)와 Cell Signaling (USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. β -actin 1차 antibody는 Sigma (USA)에서 구입하였고, phospho-JAK1 1차 antibody와 2차 antibody (Goat anti-Rabbit IgG, Goat anti-Mouse IgG)는 Invitrogen (USA)에서 구입하였다.

시료의 추출 및 분획

건조된 *M. citrifolia* 열매 500 g에 4 liter의 MeOH을 가하여 상온에서 24시간씩 교반하면서 3회 반복 추출한 후, 여과시켜 80°C 향온수조(Oilbath, Switzerland)에서 회전 감압농축기(Rotavapor, Switzerland)로 감압하여 농축물인 MeOH 추출물 73.6 g을 얻었다. MeOH 추출물, 증류수 그리고 *n*-hexane을 1:9:10의 비율로 혼합하여 물 층과 분획 용매가 두 층으로 나뉘도록 방지하여 3회 분획된 *n*-hexane 가용부를 감압 농축하여 *n*-hexane 분획물 4 g을 얻었다. 계속하여 잔류층인 물 층을 CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH, water 순으로 각각 3회씩 용매의 극성을 이용한 순차적 분획으로 2.26 g, 0.47 g, 9.73 g, 그리고 58.64 g의 분획물 각각을 얻었다(Fig. 1).

DPPH 자유라디칼 소거능 측정

*M. citrifolia*의 MeOH 추출에 의한 유기용매별 분획물의 항산화 활성은 DPPH의 자유라디칼 소거효과(free radical scavenging effect)를 측정하는 Blois [2]의 방법에 따라 측정하였다. MeOH에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 180 μ l에 MeOH에 용해시킨 농도 별 시료 20 μ l를 혼합하여 실온에서 30 분 동안 암실 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조물로 butylated hydroxyl toluene (BHT)를 사용하였고, 시료의 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{EDA (\%)} = (1-A/B) \times 100$$

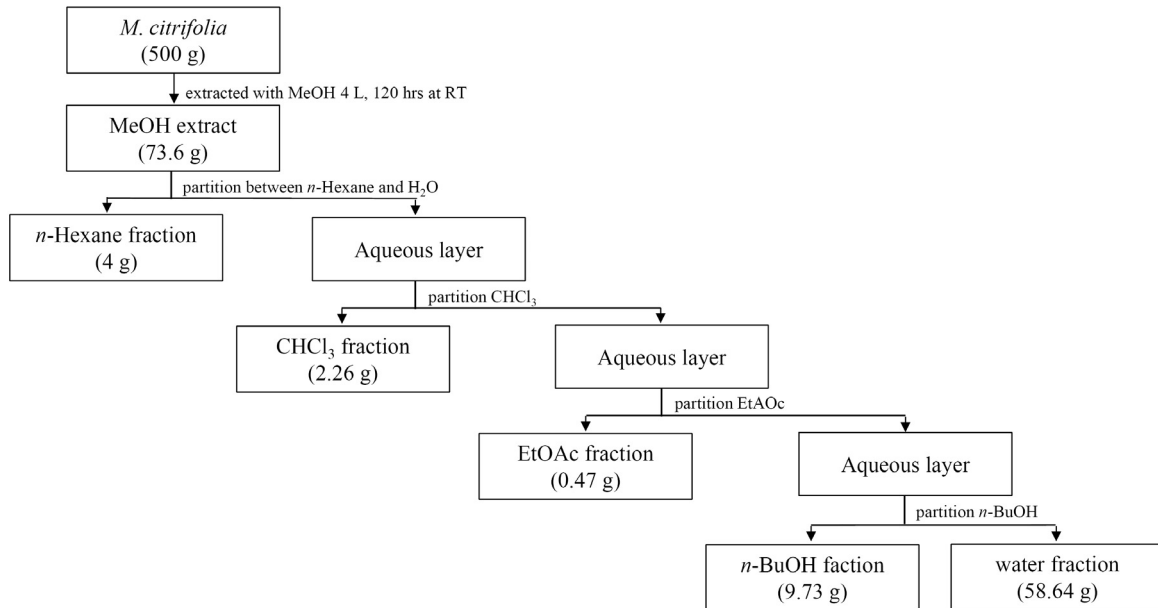


Fig. 1. Schematic diagram of extraction and fractionation of *M. citrifolia*.

A: 517 nm에서의 시료첨가군의 흡광도

B: 517 nm에서의 무첨가군의 흡광도

각 분획물의 EDA 값을 바탕으로 흡광도를 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 양 ED₅₀ (mg/ml)을 구하여 항산화 활성을 검정하였다.

Mc-EtOAc의 LC-MS/MS 분석

항산화 활성이 높게 나타난 *M. citrifolia*의 EtOAc 분획물 (Mc-EtOAc)의 성분 분석을 초 고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC, Ultra-performance liquid chromatography) 시스템 (Waters, Milford, USA)을 이용하여 수행하였다. 분석 컬럼은 ACQUITY UPLC HSS T3 (100×2.1 mm, 1.8 μm, Waters), 이동상 용매는 0.1% formic acid를 포함한 증류수(용매 A)와 0.1% formic acid를 포함한 acetonitrile (용매 B)를 사용하였다. 이동상 조건은 A=97 (5 min), A:B=3:100 (16 min), B=100 (17 min), B:A=97:3 (19min), A=97 (25min), 유속 0.5 ml/min, 컬럼 온도는 40°C로 유지하였고, 5 μl의 시료를 주입하였다. 컬럼에서 용출된 Mc-EtOAc은 고분해능 직렬 질량 분석기 SYNAPT G2 Si HDMS QTOF (Waters)로 음이온 모드로 검출하였고, 데이터 수집 및 분석은 UNIFI v1.71 (Waters) software로 제어되었으며, MS 및 MS/MS 모드의 스캔 범위는 50-1,200m/z 범위 이상이었다.

세포 배양

한국세포주은행(Korea cell line bank, Korea)에서 분양 받은 생쥐 대식 세포주(RAW 264.7)를 10% FBS와 1% 항생제 (penicillin/streptomycin)가 포함된 DMEM 배지를 사용하여

37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 실험 시 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 37°C, CO₂ 배양기에서 5분 동안 반응 후에 DMEM 배지를 넣어 효소를 불활성시키고 15 ml conical tube로 옮긴 후 800 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 이어서 새로운 DMEM 배지로 재 부유하여 tryphan blue로 염색하여 세포수를 1×10⁶ cells/ml로 조절하여 사용하였다.

세포 생존율 측정

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 200 μl씩 분주하여 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후, Mc-EtOAc을 농도 별(60, 120, 240, 480 μg/ml)로 처리하여 24 시간 동안 배양하여 세포 생존율을 측정하였다. 산화적 스트레스 요인에 의한 세포 생존율은 농도별 시료를 처리하여 2시간 동안 배양한 후, IC₅₀ 농도의 H₂O₂ (50 μM)를 4시간 동안 처리하여 측정하였다. LPS 존재 하에서 세포 생존율의 경우, 농도 별 시료를 처리하여 2시간 동안 배양한 후, 1 μg/ml의 LPS를 24시간 동안 처리하여 측정하였다. 세포 생존율 측정을 위한 MTT assay는 시료 처리된 세포 각각의 well에 MTT 용액 (5 mg/ml)을 10 μl씩 처리한 후 37°C에서 4시간 동안 배양하여 상등액을 제거한 다음 형성된 MTT formazan 결정체를 200 μl의 DMSO에 용해시켜 ELISA reader (Molecular devices, USA)로 formazan의 흡광도가 최대가 되는 540 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포에 농도 별 시료를 처리하고 2시간 동안

배양한 다음, LPS (0.1 ug/ml)를 24시간 동안 처리하여 배양된 세포로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양을 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 동량의 세포 배양 상등액과 Griess reagent (1% sulfanilamide+0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)를 혼합하여 넣고 암실에서 15분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Immunoblot 분석

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 1 ml씩 분주하여 농도 별 시료를 처리하고 2시간 후 염증반응을 유도하기 위하여 LPS를 처리하여 16시간(COX-2/iNOS), 45분(JAK), 그리고 3시간(STAT) 동안 각각 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후 원심분리하여 pellet에 RIPA buffer (Thermo Fisher, USA)를 첨가한 다음, 4℃, 14,000× g에서 15분간 원심분리하고 상등액을 Bradford 방법[3]으로 단백질을 정량하였다. 각각의 시료를 7.5% SDS-PAGE [17]로 분리시킨 후, Towbin 등[31]의 방법에 따라 PVDF membrane으로 100 V에서 1시간 동안 전이시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer (5% skim milk in 0.05% PBS-T)에서 1시간 동안 blocking 한 후 1차 antibody를 1:200~1:1,000으로 희석하여 넣고 하룻밤 동안 반응시키고, 다시 2차 antibody를 1:5,000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL solution (Jubiotech, Korea) 용액을 적용시켜 X-ray 필름에 노출시켜 단백질 발현 양상을 분석하였다.

Realtime PCR 분석

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 분주하여 농도 별 시료를 처리하고 2시간 후 LPS를 처리하여 4시간 동안 각각 배양하였다. 원심분리(12,000× g, 3 min)하여 얻은 cell pellet에 200 ul TransZol Up (TransGen Biotech Co., China)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA 합성은 2-step으로 진행하였다. AccuPower® RT PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하여 total RNA 2 µg을 주형으로 Oligo dT (Bioneer) 100 pmole을 primer로 사용하였으며 MyGenie96 Thermal block (Bioneer)를 이용하여 RT-1 (Primer annealing)은 70℃에서 5분 조건으로 RT-2 (cDNA synthesis and RTase inactivation)는 42℃ 60분 85℃ 5분 조건으로 수행하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 RNase free water (Sigma-aldrich)로 희석한 후 PCR template로 사용하였다. Pro-inflammatory cytokine, IL-1β,

IL-6, 그리고 TNF-α 유전자 발현 분석은 AriaMX system (Agilent Technologies, USA)을 이용하여 유전자 특이적 primer (Table 1) 1 pmole, cDNA 5 ng, AccuPower® 2X Greenstar qPCR Master Mix (Bioneer) 10 ul, Rnase Free water (Sigma-aldrich) 4 ul로 각 well 당 20 ul로 혼합하는 조건으로 quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 수행하였다. PCR 조건은 enzyme activation 95℃ 3분, denature 95℃ 15초, annealing/extension 20초 조건으로 40 cycle을 수행하였다. 유전자 상대정량 분석은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현양을 기준으로 normalize를 수행하였으며 상대정량은 2^{-ΔΔCt} 방법을 사용하여 사용하여 분석하였다[21].

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균 ± 표준편차(mean ± SD)로 표시하였다. 대조군과 실험군사이의 차이를 SPSS 프로그램의 one-way ANOVA로 분석한 후 통계적 유의성이 있는 경우, 군 사이의 차이를 Post-Hoc (Tukey) multiple range tests로 검증하여 p<0.05을 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

분획물 제조

건조된 *M. citrifolia*의 열매 500 g에서 얻어진 73.60 g의 MeOH 추출로부터 *n*-hexane (4 g), CHCl₃ (2.26 g), EtOAc (0.47 g), *n*-BuOH (9.73 g), 그리고 water (58.64 g) 순으로 유기 용매의 극성이 낮은 것부터 높은 순서로 순차 분획물을 얻었다. 각 분획물의 용매 별 수율은 water 분획물에서 11.73%로 가장 높았고, 다음으로 *n*-BuOH (1.95%), *n*-hexane (0.80%), CHCl₃ (0.45%), EtOAc (0.09%) 순으로 EtOAc 분획물에서 비교적 수율이 낮게 나타났다(Table 2).

항산화 활성

M. citrifolia 추출의 각 분획물과 DPPH의 반응 후 감소하는 흡광도를 측정하여 얻은 자유라디칼 소거 활성법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다(Table 3). 항산화제의 대표적 물질로 알려진 BHT와 *M. citrifolia*의 용매 별 분획물을 60~480 µg/ml 농도로 각각 처리하였을 때, 농도가 증가할수록 자유라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보이므로 농도의존적인 항

Table 1. Realtime PCR primer sequences

Gene	Forward primers	Backward primers
IL-1β	5'-CCTCGTGCTGTCGGACCCAT-3'	5'-CAGGCTTGCTCTGCTTGTGA-3'
IL-6	5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'	5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'
TNF-α	5'-GTGGAAGTGGCAGAAGAGGC-3'	5'-AGACAGAAGAGCGTGGTGGC-3'
GAPDH	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

Table 2. Yields of each organic solvent fraction obtained from the total MeOH extract¹ of *M. citrifolia*

Solvent fractions	Dried weight (g)	Yield (%) ²
<i>n</i> -hexane	4.00	0.80
CHCl ₃	2.26	0.45
EtOAc	0.47	0.09
<i>n</i> -BuOH	9.73	1.95
H ₂ O	58.64	11.73

¹MeOH extract (73.60 g) obtained from 500 g of *M. citrifolia*.

$$^2\text{yield (\%)} = \frac{\text{Dried weight of solvent fractions (g)}}{\text{Dried weight of } M. \text{ citrifolia (g)}} \times 100$$

산화 활성을 나타내었다. 480 µg/ml 농도의 BHT와 동량의 EtOAc 분획물의 비교에서 0.116과 0.877의 흡광도를 나타내어 EtOAc 분획물은 BHT 보다는 낮은 소거활성을 나타냈지만 다른 분획물 보다 상대적으로 높은 항산화 활성물질을 포함하고 있음을 알 수 있다. 전자공여능(EDA)에 의해 얻은 ED₅₀은 BHT의 0.26 mg/ml 보다는 낮으나 EtOAc 분획물에서 1.18 mg/ml로 가장 높았으며, 다음으로 *n*-BuOH, CHCl₃, *n*-hexane 분획물 순으로 각각 2.76 mg/ml, 2.97 mg/ml, 5.02 mg/ml의 ED₅₀ 값을 보였다(Fig. 2).

Mc-EtOAc의 LC-MS/MS 정량

Mc-EtOAc에 대한 LC-MS/MS 분석으로 Base peak ion chromatogram을 나타내었으며(Fig. 3), Asperulosidic acid, Pyrenocine P Quercetin-3-O-rutinoside, Tricholomenyn B, Macrospheptide H, Vulnibactin 3, Trichocyclodipeptide A, Streptovirudin B2, Fumonisin FP2, 등의 성분들이 확인되었다.

세포 생존율에 미치는 영향

항산화 활성이 높게 나타난 Mc-EtOAc의 RAW 264.7 세포 생존율에 대한 영향을 MTT assay로 확인하였다. 대조군과 비교하여 60~240 µg/ml의 Mc-EtOAc 처리군은 RAW 264.7 세포에서 유의한 세포독성을 나타내지 않았으므로 이들의 농도

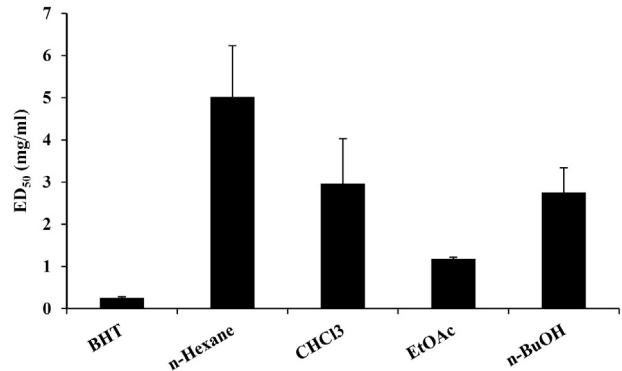


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity in various solvents fraction from *M. citrifolia*. ED₅₀ values were defined as the sample concentrations required for 50% the radical to be scavenged.

를 실험에 사용하였다(Fig. 4). H₂O₂로 처리된 RAW 264.7 세포의 산화적 스트레스에 대한 Mc-EtOAc의 세포보호 효과는 처리 농도의존적으로 H₂O₂에 의한 세포독성을 차단하는 것으로 나타났으며, 60, 120, 240 µg/ml의 Mc-EtOAc에서 각각 59.03(±3.53), 82.66(±1.26), 그리고 84.52(±1.02)의 세포보호 효과를 나타내었다(Fig. 5). 또한 LPS 존재 하에서 세포 생존율의 경우, LPS 단독 처리군은 무처리 대조군에 비교하여 71.6%의 세포 생존율을 나타내었으나 LPS와 Mc-EtOAc을 처리한 군에서는 LPS 단독 처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, 오히려 240 µg/ml의 농도에서 84.5%의 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 6).

NO 생성에 미치는 영향

Mc-EtOAc이 RAW 264.7 세포에서 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 농도별 Mc-EtOAc을 세포에 처리하여 생성되는 NO의 생성량을 측정하였다. LPS 처리군에서는 무처리 대조군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS 처리 후 유의하게 8배 증가하였으며, Mc-EtOAc을 처리한 실험군에서는 전농도에서 유의한 NO 억제를 나타내었고, 240 µg/ml의 농도에서 절반 수준으로 NO의 생성을 감소시켰다(Fig. 7).

Table 3. Absorbance change by DPPH radical scavenging activity of each fraction of *M. citrifolia*

Sample Con. (µg/ml)	Control	Fractions				
	BHT	<i>n</i> -Hexane	CHCl ₃	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	
480	0.116±0.009 ^a	1.035±0.052 ^{ab}	1.046±0.024 ^a	0.877±0.000 ^{ab}	1.022±0.037 ^a	
240	0.485±0.106 ^a	1.067±0.062 ^a	1.013±0.004 ^a	0.991±0.008 ^a	1.073±0.047 ^a	
120	0.923±0.071 ^a	1.071±0.042 ^a	1.120±0.003 ^a	1.040±0.008 ^a	1.088±0.035 ^a	
60	1.017±0.058 ^a	1.095±0.000 ^a	1.123±0.028 ^a	1.065±0.012 ^a	1.112±0.019 ^a	

Blank: 1.134.

Values are mean ± SD (n=3).

^asignificantly different (p<0.01) by ANOVA-test.

^bsignificantly different (p<0.05) between control group by Tukey's test.

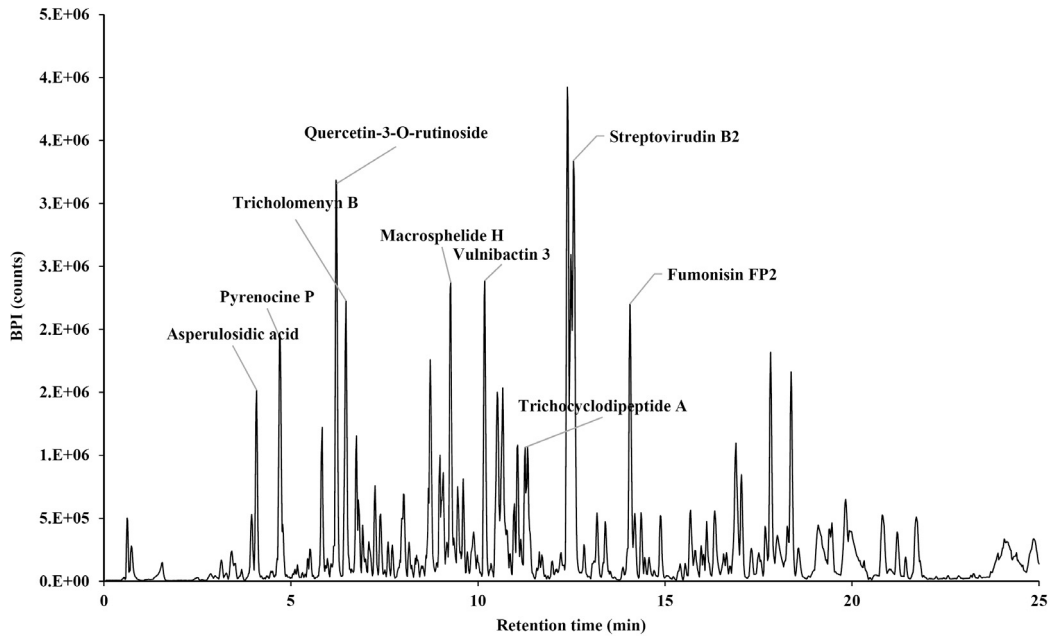


Fig. 3. Quantification of EtOA fraction from *M. citrifolia* extract by UPLC Q-TOF.

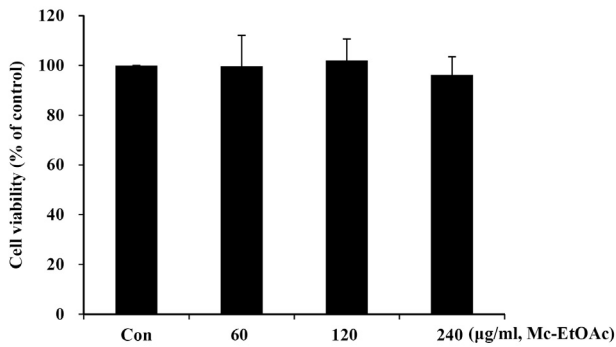


Fig. 4. Effects of Mc-EtOAc on cell viability in RAW 264.7 cells. Cell viability was measured by the MTT assay as described in materials and methods. Data are presented as the mean ± SD (n=3).

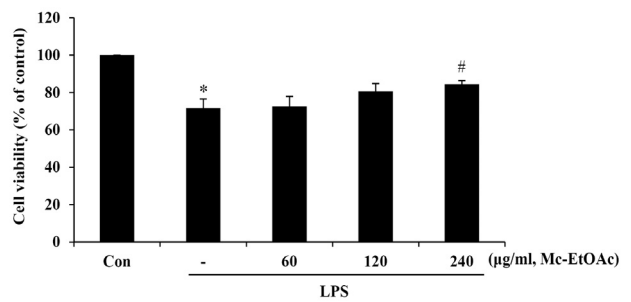


Fig. 6. Effects of Mc-EtOAc on cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were treated with Mc-EtOAc and LPS (1 µg/ml) as described in materials and methods. Cell viability was analyzed using MTT assay. Data are presented as the mean ± SD (n=3). **p*<0.05 compared to control; #*p*<0.05 compared with LPS alone.

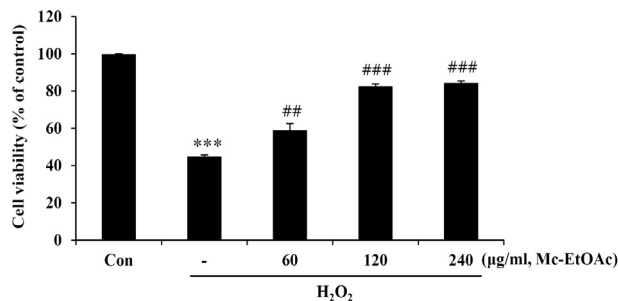


Fig. 5. Effects of Mc-EtOAc against oxidative stress induced by H₂O₂ in RAW 264.7 cells. Cells were treated with various concentration of Mc-EtOAc and 50 µM H₂O₂ as described in materials and methods. Cell viability was analyzed using MTT assay. Data are presented as the mean ± SD (n=3). ****p*<0.001 compared to un-treated control; ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 compared with H₂O₂ alone.

iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 영향

Mc-EtOAc의 항염증 활성을 평가를 위하여 전염증 매개체 iNOS와 COX-2의 발현을 immunoblot 분석으로 조사하였다. LPS 처리시 iNOS 단백질의 발현이 유의하게 증가되었으나, LPS에 농도 별 Mc-EtOAc를 전처리한 실험군에서는 iNOS의 발현양이 농도의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 8A, Fig. 8B). COX-2 역시, LPS 처리시에는 COX-2 단백질의 발현이 3배 정도로 유의하게 증가되었으나, LPS에 Mc-EtOAc 전처리한 실험군에서는 120, 240 µg/ml의 농도에서 COX-2의 발현을 유의하게 감소시켰다(Fig. 8A, Fig. 8C).

Pro-inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향

Mc-EtOAc에 대한 RAW 264.7 세포의 pro-inflammatory

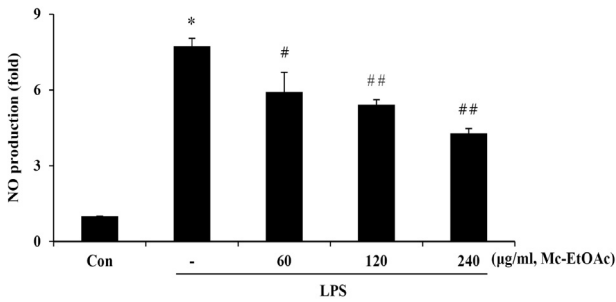


Fig. 7. Effects of Mc-EtOAc on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were treated with Mc-EtOAc and LPS as described in materials and methods. NO production was measured using the Griess reagent in culture media. Data are presented as the mean \pm SD (n=3). * p <0.05 compared to control; # p <0.05, ## p <0.01 compared to LPS alone.

cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성 저해능을 관찰하기 위하여 qRT-PCR을 이용하여 mRNA 발현 수준을 확인하였다. LPS 처리군과 비교하였을 때 IL-6는 120 μ g/ml 이상의 Mc-EtOAc 농도에서 유의적으로 증가하였으며, IL-1 β 와 TNF- α 는 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 9).

JAK/STAT 신호전달 경로에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 Mc-EtOAc의 항염증 효과를 확인하였는데, 이러한 염증 억제 기작이 JAK/STAT 신호전달 경로를 경유하는지 알아보았다. JAK1과 STAT3의 인산화를 Western blotting으로 확인한 결과, LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 Mc-EtOAc를 처리한 경우, pJAK1과 pSTAT3의 인산화는 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 10).

고찰

*M. citrifolia*에는 다양한 phytochemical 성분들이 함유되어 항산화, 항염증을 비롯하여 소염진통, 혈당상승 억제, 변비 해소 등 다방면에 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다[38]. 본 연구는 건조된 *M. citrifolia* 열매를 MeOH 추출에 의한 유기용매의 순차 분획으로, 함유된 주요 생리활성물질을 분획화하였고, 이들 분획물에 대하여 DPPH 자유라디칼 소거 활성법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. Mc-EtOAc에서 비교적 높은 활성을 보였으며, 이는 기존의 *M. citrifolia*에 대한 항산화 효과 연구와 유사하게 나타났다[30, 39]. 항산화 작용은 생체 대사 과정 중에 발생하는 ROS을 억제하여 다양한 질병의 원인을 제거할 수 있다[37]. ROS는 염증 진행과정의 원인으로 알려져 있어[5], 항산화 효소의 활성 회복과 ROS에 의한 산화적 스트레스 감소는 염증 반응의 감소로 이어질 수 있다[15]. Mc-EtOAc는 H₂O₂로 유도된 RAW 264.7 세포의 산화적 스트레스에 대하여 세포독성을 차단하였으며, 이는 ROS로 인하여

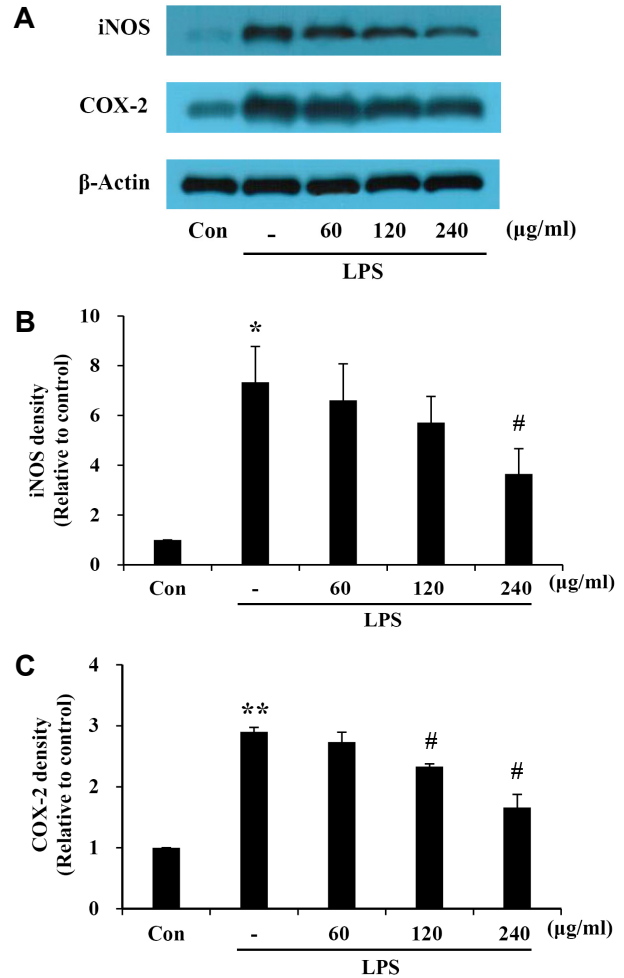


Fig. 8. Effects of Mc-EtOAc on LPS-induced iNOS and COX-2 production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with Mc-EtOAc plus LPS or LPS alone for indicated time. Total cellular proteins were prepared and subjected to Western blotting to determine protein expression levels of iNOS and COX-2 (A). Levels of iNOS and COX-2 were normalized against actin expression. The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B, C). Data are presented as the mean \pm SD (n=3). * p <0.05, ** p <0.01 compared to control; # p <0.05 compared to LPS alone.

활성화될 수 있는 염증인자들의 활성화 억제에 영향을 미쳐 염증에 효과가 있음을 암시한다. 따라서 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 Mc-EtOAc의 항염증 활성 및 기전을 평가하였다. Mc-EtOAc의 세포독성을 파악하고자 MTT assay를 진행하였고 설정된 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. Mc-EtOAc의 설정된 농도에서 실험을 진행하여 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성을 억제하였으며, Western blotting으로 iNOS 및 COX-2의 발현 정도를 유의하게 감소시켰다. 또한 염증반응이 유발된 RAW 264.7 세포에서 IL, TNF- α 등의 주요 pro-inflammatory cytokine이 분비되며[7]. 본 연구에서도 IL-1 β , IL-6,

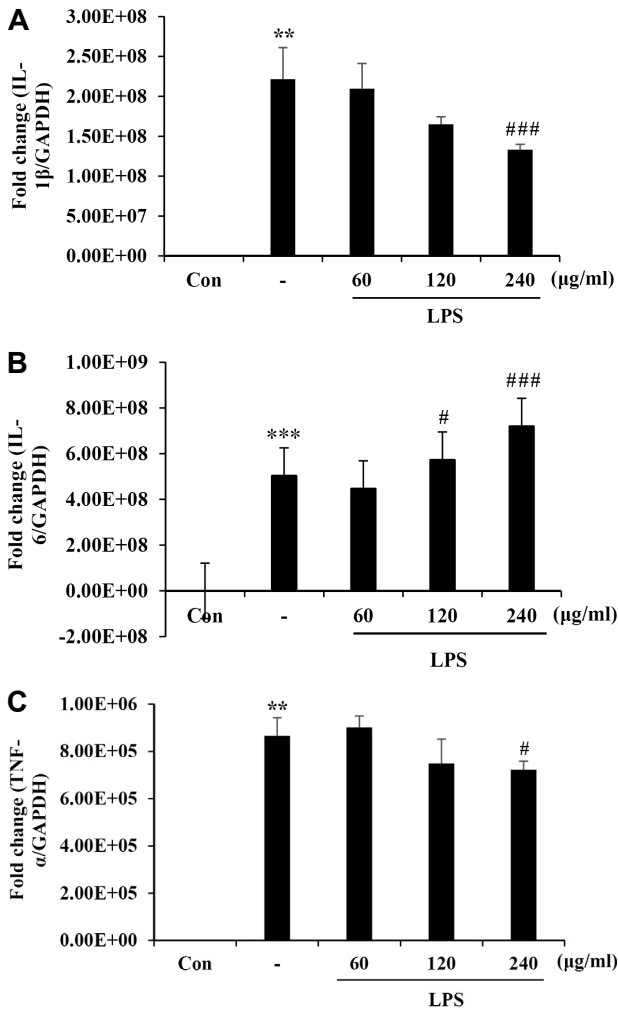


Fig. 9. Effects of Mc-EtOAc on LPS-induced pro-inflammatory cytokine in RAW 264.7 cells. Cells were treated with Mc-EtOAc plus LPS or LPS alone for indicated time. Total cellular RNA was prepared and subjected to qRT-PCR to determined mRNA expression levels of IL-1β (A), IL-6 (B), and TNF-α (C). Levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α were normalized against GAPDH expression. Data are presented as the mean ± SD (n=3). **p<0.01, ***p<0.001 compared to control; #p<0.05, ###p<0.001 compared to LPS alone.

그리고 TNF-α의 mRNA 발현을 유의성 있게 촉진시켰고, Mc-EtOAc는 IL-1β, TNF-α의 생성을 농도의존적으로 감소시켰다. 한편 대식세포에서 염증반응의 진행에 필수적인 전염증 매개체, NO, PGE₂ 및 IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 cytokine의 형성은 주로 NF-κB, MAPKs, 그리고 JAK/STAT 신호전달 경로의 활성을 통해 생성됨으로써 염증반응을 자극한다[16, 20, 27]. 이러한 염증반응에 대한 Mc-EtOAc의 항염증 효과가 상위 신호전달 경로인 JAK/STAT 신호전달 경로 통해 일어나지를 조사하였다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 pJAK1과 pSTAT3의 인산화 정도를 확인하였으며, Mc-EtOAc의 처리로 인산화

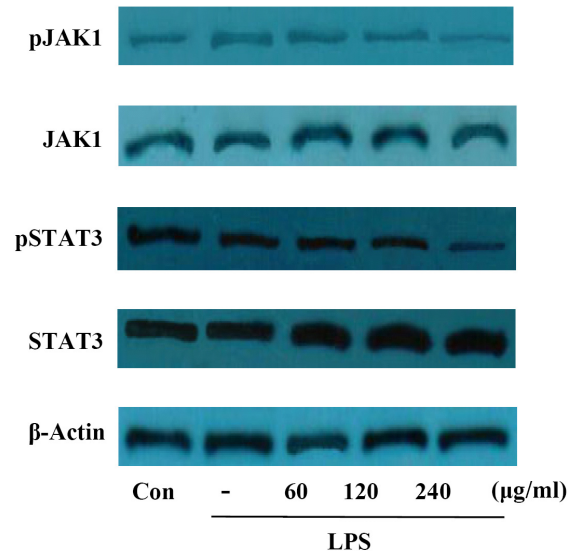


Fig. 10. Effects of Mc-EtOAc on LPS-induced JAK/STAT signaling pathways. The levels of protein expression were determined by Western blotting by treatment with LPS and Mc-EtOAc combined with LPS in time-and dose-dependent manner. The data presented are representative of three independent experiments.

정도가 유의성 있게 감소하였다. 따라서 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 Mc-EtOAc의 항염증 효과는 JAK1/STAT3 신호전달 경로를 통해 염증반응을 억제하는 것으로 사료된다. 하지만 NF-κB, MAPKs 신호전달 경로에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임(20200821).

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Ammar, R. B., Bhourri, W., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A. M., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M. G. and Ghedira, K. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae): a structure-activity relationship. *Food Chem.* **116**, 258-264.
2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.

3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
4. Chan-Blanco, Y., Vaillant, F., Perez, A. M., Reynes, M., Brilouet, J. M. and Brat, P. 2006. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): a review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 645-654.
5. Chung, E. K., Seo, E. H., Park, J. H., Shim, H. R., Kim, K. H. and Lee, B. R. 2011. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Kor. J. Org. Agric.* **19**, 245-253.
6. Damsky, W. and King, B. A. 2017. JAK inhibitors in dermatology: the promise of a new drug class. *J. Am. Acad. Dermatol.* **76**, 736-744.
7. Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* **37**, 355-361.
8. Deng, S., West, B. J. and Jensen, C. J. 2010. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chem.* **122**, 267-270.
9. Fu, Y., Liu, B., Zhang, N., Liu, Z., Liang, D., Li, F., Cao, Y., Feng, X., Zhang, X. and Yang, Z. 2013. Magnolol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by interfering with TLR4 mediated NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *J. Ethnopharmacol.* **145**, 193-199.
10. Fukuzawa, K. and Takaoshi, Y. 1990. Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free. Rad.* **1**, 55-70.
11. Ganster, R. W., Taylor, B. S., Shao, L. and Geller, D. A. 2001. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 8638-8643.
12. Han, Y. H., Chen, D. Q., Jin, M. H., Jin, Y. H., Li, J., Shen, G. N., Li, W. L., Gong, Y. X., Mao, Y. Y., Xie, D. P., Lee, D. S., Yu, L. Y., Kim, S. U., Kim, J. S., Kwon, T. H., Cui, Y. D. and Sun, H. N. 2020. Anti-inflammatory effect of hispidin on LPS induced macrophage inflammation through MAPK and JAK1/STAT3 signaling pathways. *Appl. Biol. Chem.* **63**, 1-21.
13. Ikeda, R., Wada, M., Nishigaki, T. and Nakashima, K. 2009. Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. *Food Chem.* **113**, 1169-1172.
14. Kim, J. M., Jo, Y. J. and Hahn, D. 2017. Physicochemical properties, bioactive composition and antioxidant activities of noni fruit juices from different regions of cultivation. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 1000-1006.
15. Kim, S. O., Jeong, J. S. and Choi, Y. H. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Aster yomena* in RAW 264.7 Macrophages. *J. Life Sci.* **29**, 977-985.
16. Kleinert, H., Wallerath, T., Fritz, G., Ihrig-Biedert, I., Rodriguez-Pascual, F., Geller, D. A. and Forstermann, U. 1998. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF- κ B-signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* **125**, 193-201.
17. Kovarik, P., Mangold, M., Ramsauer, K., Heidari, H., Steinborn, R., Zotter, A., Levy, D. E., Müller, M. and Decker, T. 2001. Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *EMBO J.* **20**, 91-100.
18. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
19. Lawrence, T., Willoughby, D. A. and Gilroy, D. W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 787-795.
20. Lee, S. B., Lee, W. S., Shin, J. S., Jang, D. S. and Lee, K. T. 2017. Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 via AP-1, NF- κ B, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **49**, 21-29.
21. Levy, D. E. and Darnell Jr, J. E. 2002. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 651-662.
22. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)} method. *Methods* **25**, 402-408.
23. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435.
24. Moilanen, E. 2014. Two faces of inflammation: an immunopharmacological view. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **114**, 2-6.
25. Murray, P. J. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* **178**, 2623-2629.
26. Okugawa, S., Ota, Y., Kitazawa, T., Nakayama, K., Yanagimoto, S., Tsukada, K., Kawada, M. and Kimura, S. 2003. Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, 399-408.
27. Pan, X., Cao, X., Li, N., Xu, Y., Wu, Q., Bai, J., Yin, Z., Luo, L. and Lan, L. 2014. Forsythin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing JAK-STAT and p38 MAPK signalings and ROS production. *Inflamm. Res.* **63**, 597-608.
28. Park, E. J., Park, S. Y., Joe, E. H. and Jou, I. 2003. 15d-PGJ₂ and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J. Biol. Chem.* **278**, 14747-14752.
29. Qi, Z., Yin, F., Lu, L., Shen, L., Qi, S., Lan, L., Luo, L. and Yin, Z. 2013. Baicalein reduces lipopolysaccharide induced inflammation via suppressing JAK/STATs activation and ROS production. *Inflamm. Res.* **62**, 845-855.
30. Stocker, R. and Keane Jr, J. F. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**, 1381-1478.
31. Takeuchi, O. and Akira, S. 2001. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 625-635.
32. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic

- transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**, 4350-4354.
33. Tracey, K. J. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853-859.
34. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. and Mahajan, R. T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65-74.
35. Wen, Z., Zhong, Z. and Darnell Jr, J. E. 1995. Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-250.
36. Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. 2004. I κ B kinases: key regulators of the NF-kappa B pathway. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 2-79.
37. Yi, H. S., Heo, S. K., Yun, H. J., Choi, J. W., Jung, J. H. and Park, S. D. 2008. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of draconis resina in mouse macrophage cells. *Kor. J. Herbology* **23**, 179-192.
38. Yoo, J. S., Hwang, J. T., Yoo, E. S. and Cheun, B. S. 2004. Study on herbal extract on the Noni (*Morinda citrifolia*). *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 110-112.
39. Zin, Z. M., Abdul-Hamid, A. and Osman, A. 2002. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chem.* **78**, 227-231.

초록 : JAK/STAT 신호전달 경로를 통한 LPS 유도 RAW 264.7 세포의 염증에 대한 노니의 항염증 효과

조범길 · 방인석*

(호서대학교 기초과학연구소)

본 연구는 노니(*Morinda citrifolia*)에 함유된 주요 생리활성물질이 RAW 264.7 세포에서 JAK/STAT 신호전달 경로를 통하여 항염증 작용에 관여하는 것을 조사하였다. 건조된 *M. citrifolia* 열매의 MeOH 추출에 의한 유기용매의 순차 분획에서 얻은 EtOAc 분획물(Mc-EtOAc)에서 가장 높은 항산화 활성을 확인하였고, H₂O₂로 유도된 RAW 264.7 세포의 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과는 처리 농도의존적으로 세포독성을 차단하였다. LPS 처리로 71.6%의 RAW 264.7 세포 생존율에서 240 μ g/ml의 Mc-EtOAc를 전처리한 군에서 84.5%의 세포 생존율 증가를 보였다. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NO 생성 저해활성은 240 μ g/ml의 Mc-EtOAc에서 양성 대조군의 절반 수준으로 NO의 생성량을 감소시켰다. Mc-EtOAc 처리로 iNOS의 발현량은 농도의존적으로 유의하게 감소하였고, COX-2의 발현은 LPS 유도로 3배 정도로 증가되었으나, 120, 240 μ g/ml의 Mc-EtOAc를 전처리시 농도의존적으로 유의하게 감소시켰다. 또한 pro-inflammatory cytokine IL-1 β 와 TNF- α 의 mRNA 발현도 억제하였다. 이러한 Mc-EtOAc의 항염증 작용이 상위 신호전달 경로인 JAK/STAT 신호전달 경로 통해 일어나지를 조사한 결과, Mc-EtOAc의 전처리로 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 pJAK1과 pSTAT3의 인산화 정도가 유의성 있게 감소하였다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 Mc-EtOAc의 항염증 효과는 JAK1/STAT3 신호전달 경로를 통해 염증반응을 억제하는 것으로 사료된다.