

## 한국산 겨우살이의 항염증 효과

홍창의<sup>\*,†</sup> · 임완택<sup>\*</sup> · 유수연<sup>\*\*,††</sup>

\*순천대학교 약학과, 연구원

\*\*순천대학교 약학과 및 생명약학연구소, 교수

(2022년 9월 7일 접수, 2022년 9월 22일 수정, 2022년 9월 25일 채택)

### Anti-inflammatory Activity of *Viscum album* var. *coloratum* In Vitro

Chang-Eui Hong<sup>1,†</sup>, Wantaek Lim<sup>1</sup>, and Su-Yun Lyu<sup>2,††</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Suncheon National University, 255, Jungang-ro, Suncheon-si, Jellanam-do 57922, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Life and Pharmaceutical Sciences, Suncheon National University

(Received September 7, 2022; Revised September 22, 2022; Accepted September 25, 2022)

**요약:** 본 연구에서는 한국산 겨우살이 (*Viscum album* L. var. *coloratum*)이 아토피 피부염과 관련된 염증성 사이토카인에 영향을 미치는지 여부를 알아보았다. 실험에는 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 총 4 가지 분획물을 사용하였으며, RAW264.7 마우스 대식세포와 RBL-2H3 랫트 호중구를 이용하여 염증성 마커를 연구하였다. 실험 결과 에틸아세테이트 분획이 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, IL-4의 mRNA 발현 및 단백질 분비량을 감소시켰으나, 헥산 분획은 뚜렷한 효능이 없었다. 또한 부탄올 분획은 IL-4, IL-6의 mRNA 발현을 감소시켰고, 메틸렌클로라이드 분획은 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현을 감소시켰다. 결과적으로 한국산 겨우살이(*V. album* var. *coloratum*)가 아토피 피부염과 관련된 사이토카인 분비를 억제시켜 항염증 효과를 나타낼 수 있으므로, 이와 관련된 기능성 화장품 개발이 가능할 것으로 사료된다.

**Abstract:** In this study, we investigated whether Korean mistletoe (*Viscum album* L. var. *coloratum*) has anti-inflammatory effects that play key roles in the regulation of pathological mechanism of atopic dermatitis (AD). Four kinds of fractions, hexane (HX), ethyl acetate (EA), butanol (BU), and methylene chloride (MC), were used and RAW264.7 mouse macrophages and RBL-2H3 rat basophils were used to measure various inflammatory markers. EA significantly decreased mRNA expression and protein secretion levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, and IL-4 but HX did not affect these markers. In addition, BU decreased mRNA expressions of IL-4 and IL-6 whereas MC decreased IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expressions. As a result, Korean mistletoe can show anti-inflammatory effects by inhibiting the secretion of cytokines related to AD, so it is thought that it will be possible to develop functional cosmetics related to this.

**Keywords:** Korean mistletoe, *Viscum album* L. *coloratum*, anti-inflammation, atopic dermatitis

† 주 저자 (e-mail: gruni80@naver.com)  
call: 061-750-3759

†† 교신저자 (e-mail: suyun@scnu.ac.kr)  
call: 061-750-3759

## 1. 서론

염증은 해로운 자극으로부터 신체를 보호하기 위해 대 식세포를 포함한 다양한 면역 세포에서 나타나는 선천적 면역 반응이다. 그러나 염증 매개체들은 만성 염증을 유발할 수 있으며, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 건선(psoriasis), 패혈성 쇼크(septic shock), 관절염, 죽상동맥경화증을 비롯한 수많은 인간 질병의 원인이 된다[1,2]. 현대에 들어서 많은 연구를 통해 항염증 항상성이 제대로 수행되지 않을 때 아토피 피부염이 발생할 수 있음을 증명하고 있다[3-5]. 따라서 아토피 피부염 치료를 위해 항염증은 적정 상태를 유지해야만 한다.

아토피 피부염에서 자극(긁음, 감염)이 가해지면 다양한 종류의 염증 사이토카인이나 매개체가 방출된다. 예를 들어 인터루킨(interleukin, IL)은 면역 세포의 증식, 성숙, 이동 및 부착과 관련이 있다[6]. 특히 IL-4, IL-5 및 IL-6는 B 세포에서 면역글로불린(immunoglobulin, Ig) E의 class 전환을 유도한다[7-9]. 아토피 피부염의 주요 증상 중 하나가 IgE의 상승이기 때문에, 최근 연구들은 아토피 피부염 환자에서의 IL-4, IL-5 및 IL-6의 역할을 보고하였다[10-12]. 이에 더해, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 프로스타글란딘(prostaglandin, PGE) 2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)는 아토피 피부염에서 면역 매개체 및 다양한 면역 반응 등에 관여한다[13,14]. T helper 2 type (Th2)와 T helper 1 type (Th1) 사이토카인은 아토피 피부염에서 피부 염증의 진행과 관련이 있는데, 급성 아토피 피부염에서는 Th2가 주로 피부 염증에 관여하고, 만성 아토피 피부염에서는 피부 병변에서 TNF- $\alpha$ 와 인터페론 감마(interferon- $\gamma$ ) 발현 세포가 주로 증가한다[15].

겨우살이는 사과와 참나무 같은 다양한 낙엽수에서 자라는 다년생 반기생식물이다. 옛날부터 유럽을 비롯한 많은 국가에서 전통 의학으로 사용되어 왔다[16]. 전통적으로 유럽산 겨우살이(*Viscum album* L., Loranthaceae)는 진정제, 진통제, 마취제, 심장 강화제 및 항암제로 사용되었다[17]. 최근 들어 유럽산의 변종인 한국산 겨우살이(*Viscum album* L. var. *coloratum*)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항암, 면역 조절, 항산화 등의 기능이 있는 것으로 알려져 있다[18-20].

본 연구에서는 아토피 피부염과 관련되어 있는 염증성 사이토카인 및 염증매개물질을 조절함으로써 한국산 겨우살이가 항염증 효과를 나타낼 수 있는지 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약

Bovine serum albumin (BSA)는 VWR Life Sciences (USA)에서 구입하였다. PGE<sub>2</sub> enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 키트는 R&D Systems (USA)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 마우스 ELISA 세트는 BD Pharmingen (UK)에서 구매하였고, radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, protease inhibitor cocktail, bicinchoninic acid protein assay (BCA) 정량 키트는 Thermo Scientific (USA)에서 구입하였다. Western blotting assay를 위한 1 차 및 2 차 항체는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하였고, Enhanced chemiluminescence (ECL) 키트는 Advansta (USA)에서 구입하였다.

### 2.2. 겨우살이 분획물

자연 건조된 겨우살이(*V. album coloratum*, 100 g, 강원도 정선 채취, 기주목; 참나무, Korea)의 전초(잎, 줄기, 열매)에 메탄올(methanol)을 500 mL 가하고, 80 °C, 12 h 동안 3 회 환류 추출하였다. 이렇게 얻은 에탄올(ethanol) 추출액을 모아 여과한 후, 감압 농축하였고, 에탄올 추출물 18 g을 얻었다. 이렇게 얻은 메탄올 추출물(18 g)을 메탄올/물 9 : 1 비율의 용액(200 mL)에 현탁한 후, 헥산(200 mL)을 가하여 3 회 용매분획을 실시하였다. 헥산 분획 용액을 감압 농축하여 짙은 회색의 고체(한국산 겨우살이 헥산 분획물)를 얻었다. 이후 메탄올/물 용액에서 메탄올을 감압 농축하여 메탄올을 제거한 후, 물(200 mL)에 현탁시켰다. 현탁한 용액에 메틸렌클로라이드(methyl chloride, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 200 mL × 3), 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc, 200 mL × 3), *n*-부탄올(butanol, *n*-BuOH, 200 mL × 3)의 순으로 용매 분획을 실시하였다. 이렇게 얻은 추출액들을 감압 농축하여 메틸렌클로라이드 분획물, 에틸아세테이트 분획물, *n*-부탄올 분획물을 얻었다.

### 2.3. 세포 배양 및 독성 측정

본 실험에서는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 마우스 RAW264.7 대식세포(한국세포주은행, Korea) 및 렛트 RBL-2H3 호중구(한국세포주은행)에 대한 한국산 겨우살이 분획물의 독성을 알아보았다. 다양한 농도의 한국산 겨우살이 분획물을 RAW264.7 및 RBL-2H3에 처리하고 37 °C에서 48 h 5%

CO<sub>2</sub> 세포 배양기(Sanyo, Japan)에 배양하였다. 이후 세포들에 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 MTT 염색 시약을 50  $\mu$ L씩 넣고 4 h 더 배양하였다. 배양 후 MTT를 포함하는 배지를 모두 제거하고 formazan 침전물을 well당 dimethylsulfoxide (DMSO) 200  $\mu$ L와 Sorensen's buffer 25  $\mu$ L를 넣어 용해하였다. 이후 배양접시를 570 nm microplate reader기(Sunrise, Tecan, Austria)로 측정하였다.

#### 2.4. Nitric Oxide (NO)와 PGE 생산

NO 생산 정도는 Griess reagent system을 이용하여 배양된 배지에서 nitrite 농도를 측정함으로써 알 수 있다. 48 well plate에 RAW264.7 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 아래에서 18 h 배양 후 배지를 제거했다. 100 ng/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환한 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 추가로 배양하였다. 이후 상등액 100  $\mu$ L를 100  $\mu$ L의 Griess reagent (0.1% *N*-(1-naphthyl) ethylene-diamine, 1% sulfanilamide, 5% phosphoric acid)와 혼합한 후 10 min 상온에 방치하였다. 이후 570 nm에서 microplate reader (Sunrise)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. PGE<sub>2</sub> 생산량은 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다. 12 well plate에 RAW264.7 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well이 되게 분주하고 24 h 배양하였다. 이후 새로운 배양액으로 교체하고 농도 별 샘플 및 LPS ( $\mu$ g/mL)을 처리하고 다시 24 h 배양하였다. 이후 1,200 rpm에서 5 min 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 상등액 150  $\mu$ L를 1차 항체 용액과 2 h 상온에 방치한다. 3회 세척한 후 200  $\mu$ L의 기질 용액을 가하고 30 min 방치하였다. Stop solution을 100  $\mu$ L 가한 후 570 nm에서 microplate reader (Sunrise)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

#### 2.5. 사이토카인 분비 변화 측정

96-well plate에 capture antibody를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate, pH 9.5)에 희석하여 100  $\mu$ L씩 분주한 후 4 °C에서 24 h 방치하였다. Washing buffer (PBS/tween-20)으로 3번 세척한 후 blocking buffer (1% BSA)를 200  $\mu$ L씩 분주한 후 1 h 동안 상온에 방치하였다. 다시 washing buffer로 3 회 세척한 후 standard와 sample을 각각 100  $\mu$ L씩 분주하고 2 h 동안 상온에 방치하였다. Washing buffer로 5회 세척 후 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase 혼합액을 100  $\mu$ L씩 분주한 후 1 h 동안 상온에 방치하였다. Washing buffer로 7 회 세척 후 TMB substrate

reagent (BD Pharmingen)를 100  $\mu$ L씩 분주한 후 상온에 30 min 방치하였다. Stop solution (1 M phosphoric acid)으로 반응을 정지시키고 microplate reader (Sunrise)를 이용하여 450 nm에서 흡광치를 측정하였다.

#### 2.6. Western Blotting

세포를 PBS에 세척한 후 protease inhibitor cocktail을 1 : 1000으로 첨가한 RIPA buffer에 용해시켰다. 세포를 4 °C에서 14,000  $\times$  g에 15 min 원심분리 한 후 상등액을 모았다. 단백질 정량은 BCA 키트를 이용하여 측정하였다. Western blot analysis를 위하여 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하였고, G2 Fast Blotter (Thermo Scientific) 기기를 이용하여 25 V, 2.5 A에서 14 min 동안 polyvinylidene fluoride (PVDF) 멤브레인에 transfer 시켰다. 이후 PVDF 멤브레인을 5 min tris-buffered saline (TBS)로 3 회 세척하고, 1 h 동안 blocking buffer에 방치하였다. 다시 TBS-tween(TBS-T)로 5 min 3 회 세척한 후 1차 항체를 가하고 4 °C에서 overnight시켰다. 다시 TBS-T로 3 회 세척 후 2차 항체를 가하고 1 h 동안 상온에 방치하였다. 이후 다시 멤브레인을 3 회 세척한 후 ECL 키트와 Omega Lum G imaging system (Aplegen, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 발현 정도를 측정하였다.

#### 2.7. RNA 추출 및 실시간 정량 PCR (Quantitative

Real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR)

총 RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였으며, RNA 농도는 NanoDrop 1000TM (Thermo Scientific)으로 측정하였다. cDNA 합성을 위한 역전사는 cDNA synthesis kit (PhileKorea, Korea)를 이용하여 시행했으며, GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)에서 42 °C에서 30 min, 70 °C에서 10 min 반응시켰다. 이후 cDNA 100 ng을 Quanti Nova SYBR green PCR kit (Qiagen)을 이용하여 ECO real-time PCR system (Illumina Inc., CA, USA)으로 증폭시켰다. qPCR을 위한 프로그램 설정은 다음과 같았다; Hot start를 위해 95 °C에서 2 min, denaturation을 위해 95 °C에서 10 s, primer annealing extension을 위해 60 °C에서 20 s, 증폭 cycle은 45 cycle을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 Table 1에 기재하였다.

**Table 1.** Primers for Quantitative Real-time PCR

	Sense	Antisense
IL-4	5'-CCTCCAAGGTGCTTCGCATA-3'	5'-CTTATCGATGAATCCAGGCAT-3'
IL-6	5'-CCAGAGTCCTTCAGAGAGATACA-3'	5'-CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC-3'
TNF- $\alpha$	5'-TTGTCTACTCCCAGTTCTCT-3'	5'-GAGGTTGACTTTCTCCTGGTATG-3'
$\beta$ -actin	5'-GAGGTATCCTGACCCTGAAGTA-3'	5'-CACACGCAGCTCATTGTAGA-3'

## 2.8. 통계처리

결과 통계 처리는 GraphPad Prism (version 7.04, Dotmatics, USA)을 사용하였으며, 유의차 검증은 One-way analysis of variance (ANOVA) test와 Tukey multiple test에 따라 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

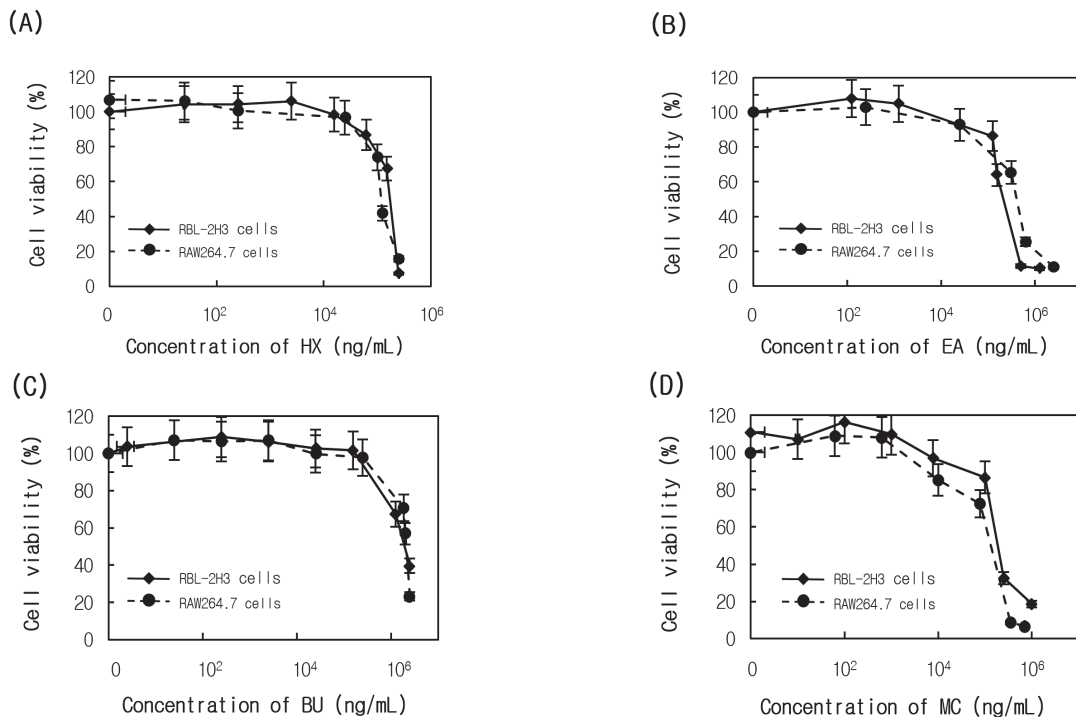
### 3.1. RAW264.7 및 RBL-2H3의 세포 생존율

RAW264.7과 RBL-2H3에 다양한 농도의 한국산 겨우살이 분획물을 처리한 후 48 h 동안 배양하여 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 부탄올, 에

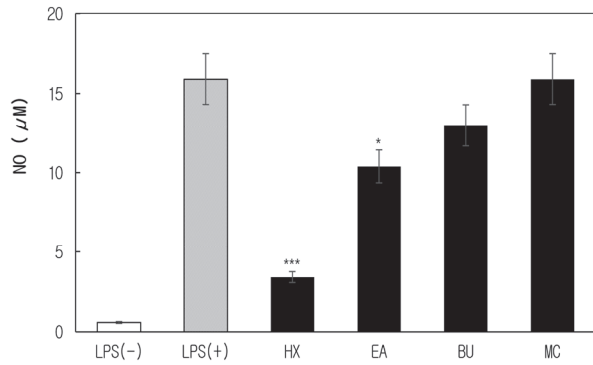
틸아세테이트, 메틸클로라이드, hexan 분획물 100  $\mu$ g/mL에서 80% 이상의 세포가 생존하였다(Figure 1). 그래서 이후 세포를 이용하는 모든 실험(NO, PGE<sub>2</sub>, ELISA, Western blotting)에는 100  $\mu$ g/mL 이하의 농도를 사용하였다.

### 3.2. NO와 PGE<sub>2</sub> 생산

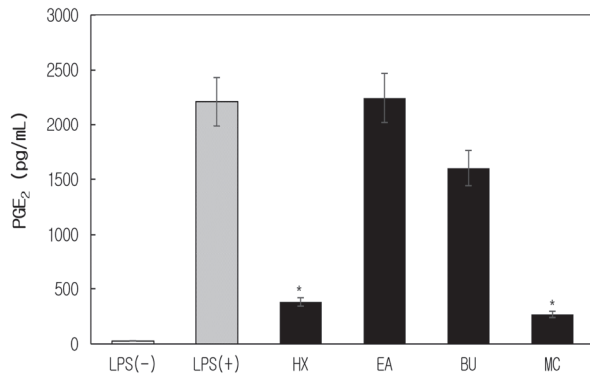
NO와 PGE<sub>2</sub>는 대표적인 염증 매개물질이기 때문에, NO 및 PGE<sub>2</sub>가 증가하는 것은 염증이 일어나고 있다는 증거가 된다[21]. 한국산 겨우살이 분획물의 항염증 효과를 확인하기 위해 lipopolysaccharide (LPS)로 자극한 RAW264.7 세포에 한국산 겨우살이 분획물을 처리하고 NO와 PGE<sub>2</sub>의



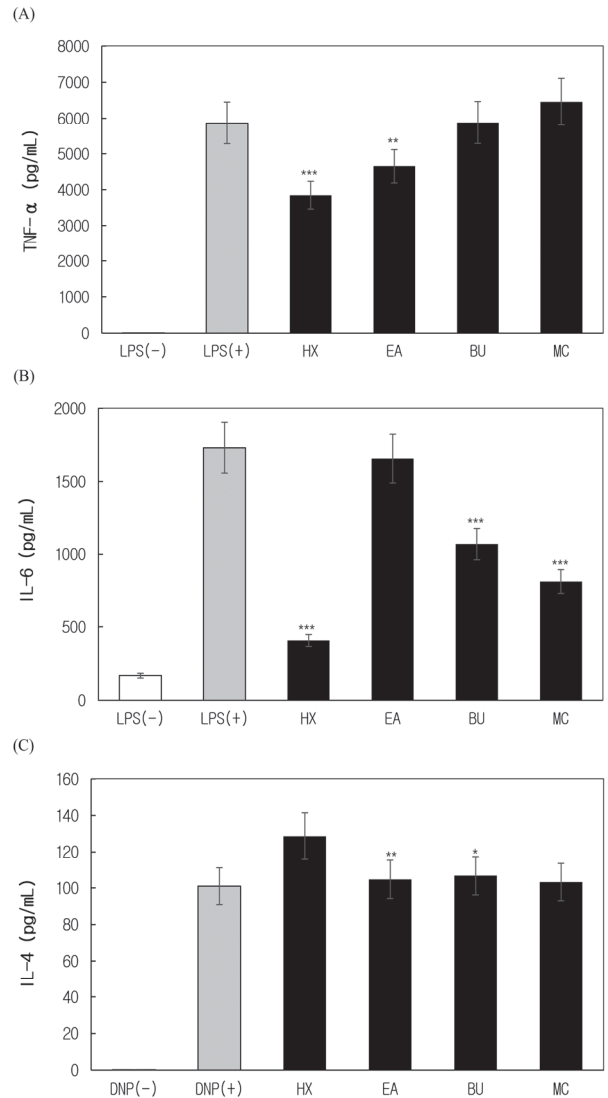
**Figure 1.** Effect of different fractions of Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) on cell viability. RAW 264.7 cells and RBL-2H3 cells were treated with different concentration of *V. album coloratum* fractions for 48 h. Cell viability was measured by MTT assay. Viability of untreated control cells was defined as 100% and the values are expressed as the means  $\pm$  SD (N = 3). (HX; hexane fraction, EA; ethylene acetate fraction, BU; butanol fraction, MC; methylene chloride fraction).



**Figure 2.** Effect of different fractions of *V. album coloratum* on the production of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were co-treated with different fractions of *V. album coloratum* (100 µg/mL) and LPS (100 ng/mL) for 24 h. The treated culture media was collected and assayed for NO production using Griess reagent. Each bar represent mean ± SD (N = 3). (\*\*\*) represents significant differences between LPS and samples treated group  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . (HX; hexane fraction, EA; ethylene acetate fraction, BU; butanol fraction, MC; methylene chloride fraction).



**Figure 3.** Effect of different fractions of *V. album coloratum* on the production of PGE<sub>2</sub> in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with different fractions of *V. album coloratum* (100 µg/mL) for 1 h, followed by stimulation with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The treated culture media was collected and assayed for PGE<sub>2</sub> production using ELISA kit. Each bar represent mean ± SD (N = 3). (\*\*\*) represents significant differences between LPS and samples treated group  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . (HX; hexane fraction, EA; ethylene acetate fraction, BU; butanol fraction, MC; methylene chloride fraction).



**Figure 4.** Effect of different fractions of *V. album coloratum* on the production of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, and (C) IL-4 in DNP-stimulated RBL-2H3 cells. RAW 264.7 cells were co-incubation with different fractions of *V. album coloratum* (100 µg/mL) and LPS (100 ng/mL) for 24 h. RBL-2H3 cells were incubation with DNP-IgE (500 ng/mL) for 24 h, followed by co-incubation with DNP-BSA (100 ng/mL) and different fractions of Korean mistletoe (100 µg/mL) for 4 h. The treated culture media was collected and assayed for TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-4 production using ELISA kit. Each bar represent mean ± SD (N = 3). (\*\*\*) represents significant differences between LPS and samples treated group  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . (HX; hexane fraction, EA; ethylene acetate fraction, BU; butanol fraction, MC; methylene chloride fraction).

생산량을 알아보았다. 그 결과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 핵산 및 에틸아세테이트 분획에서는 현저하게 NO 생산을 감소시켰다 (Figure 2). 그러나 부탄올 및 메틸렌클로라이드 분획에서는 NO 생산에 영향을 미치지 못했다. 한편, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 메틸렌클로라이드 분획과 에틸아세테이트 분획은 PGE<sub>2</sub>의 생산을 현저하게 감소시켰지만, 핵산이나 부탄올 분획을 처리한 세포에서는 큰 변화가 나타나지 않았다 (Figure 3).

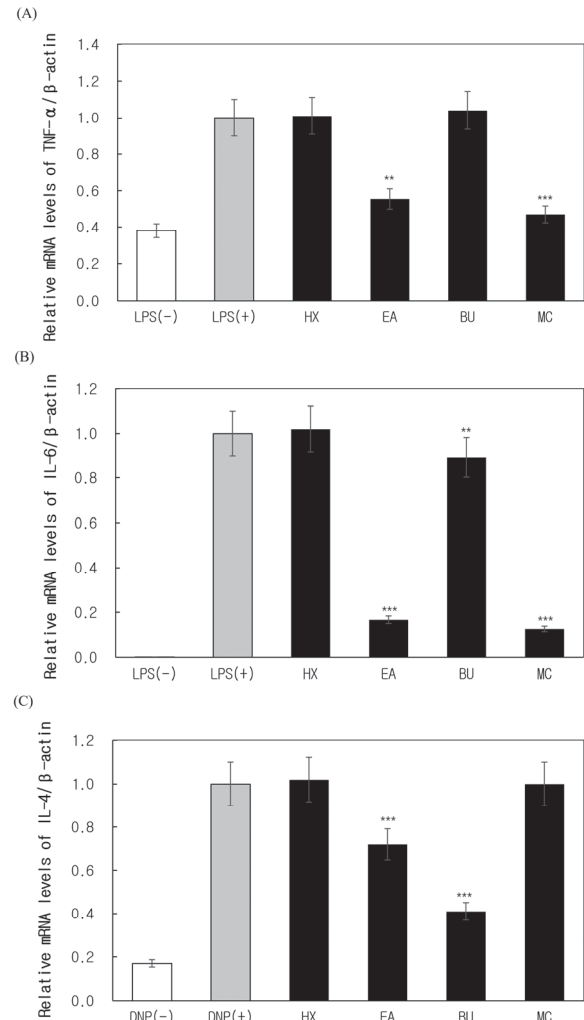
### 3.3. 염증성 사이토카인에 미치는 효과

어떠한 자극이 가해진 염증성 세포에서는 mRNA 발현 및 사이토카인 분비가 변한다. 병원균이나 LPS 같은 염증성 자극은 화학 신호를 활성화시킨 다음, 전사 및 단백질 생산 단계에서 사이토카인 농도를 증가시킨다[22]. 그러므로 연구자들이 사이토카인 생산 변화를 측정하고 싶을 때 qPCR(mRNA 발현 규명)과 ELISA(사이토카인 분비 규명)를 이용할 수 있다[23]. 한국산 겨우살이 분획물이 염증성 사이토카인(IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ )의 생산을 감소시킬 수 있는지 알아보기 위하여 ELISA를 통하여 이 사이토카인들의 생산을 측정하였다. LPS로 자극시킨 RAW264.7 세포와 dinitrophenyl (DNP)로 자극시킨 RBL-2H3 세포 모두 현저하게 염증성 사이토카인이 증가하였다. 여기에 겨우살이 분획물을 처리한 결과, 메틸렌클로라이드와 에틸아세테이트 분획은 IL-6와 TNF- $\alpha$  분비를 현저하게 감소시킨 반면, 부탄올 분획은 TNF- $\alpha$  분비만 감소시켰다. 핵산 분획의 경우 IL-6와 TNF- $\alpha$  분비에 영향을 끼치지 않았다(Figure 4). 겨우살이 분획물의 항염증 효과를 확인하기 위해 qPCR을 통해서도 사이토카인 생산량을 측정하였다. 그 결과, 에틸아세테이트 분획은 IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현을 현저하게 감소시켰으나, 핵산 분획은 아무런 효과를 나타내지 못했다. 또한 부탄올 분획은 IL-4와 IL-6의 mRNA 발현에만 영향을 끼쳤고, 메틸렌 클로라이드 분획은 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현에만 영향을 끼쳤다(Figure 5).

### 3.4. iNOS와 COX-2 단백질 발현

한국산 겨우살이 분획물의 항염증 효과를 규명하기 위하여 대표적인 염증 매개체인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 측정하였다. RAW264.7 세포에 LPS를 처리한 결과 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 현저하게 증가하였다. 그리고 한국산 겨우살이 분획물 중 에틸아세테이트 분획을 처리한 결과 iNOS와 COX-2의 발현량을 현저하게 감소시킬

수 있었다. 한편 핵산 분획은 iNOS의 발현만 감소시킬 수 있었고, 부탄올 및 메틸렌클로라이드 분획은 COX-2의 발현만 억제할 수 있었다(Figure 6). iNOS가 NO 합성 효소라



**Figure 5.** Realtime PCR analysis of mRNA expression of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, and (C) IL-4 in DNP-stimulated RBL-2H3 cells. RAW 264.7 cells were co-incubated with different concentration of *V. album coloratum* fractions and LPS (100 ng/mL). RBL-2H3 cells were incubated with DNP-IgE (500 ng/mL) for 24 h, followed by co-incubation with DNP-BSA (100 ng/mL) and different concentration of *V. album coloratum* fractions for 4 h. Each bar represent mean  $\pm$  SD (N = 3). (\*\* represents significant differences between LPS and samples treated group  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ). (HX; hexane fraction, EA; ethylene acetate fraction, BU; butanol fraction, MC; methylene chloride fraction).

는 것을 고려해보면, 두 결과의 상관관계가 알맞다는 것을 알 수 있다. 또한 핵산과 에틸아세테이트 분획이 iNOS와 NO 생산 과정을 통한 염증 반응에 관여한다는 것도 알 수 있다. COX-2는 PGE<sub>2</sub> 생산에 영향을 미치는 인자이긴 하지만, 직접 PGE<sub>2</sub>를 생산하는 효소는 아니다[24]. COX-2는 PGE<sub>2</sub>의 전구체인 아라키돈산의 변형에 관여하지만, 다른

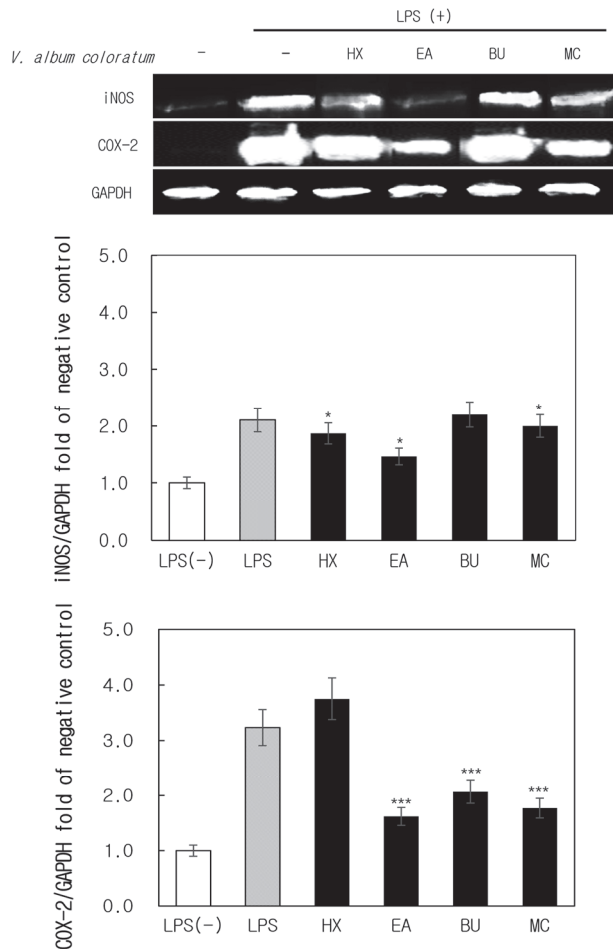
많은 효소들도 후속 과정에 관여하기도 한다. 이러한 사실이 본 실험에서 COX-2 단백질 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성 간의 미약한 상관관계를 설명할 수 있다.

#### 4. 결 론

아토피 피부염은 항산화 및 항염증 조절의 불균형으로 인한 만성 피부 질환이며, 국소 코르티코스테로이드는 아토피 피부염 치료에 가장 일반적으로 사용된다[4,25,26]. 그러나 환자들은 장기간 사용해야 하는 코르티코스테로이드의 잠재적 부작용을 걱정하기 때문에, 최근에는 많은 연구자들이 부작용이 적은 천연 제품을 찾으려고 노력해 왔다[15,27]. 또한 연구자들은 항염증 효과를 확인함으로써 천연 제품들이 잠재적인 항아토피 효과가 있는지 규명하려고 노력해왔다[28,29]. 본 연구에서는 한국산 겨우살이의 항염증 효과를 규명하였다.

염증성 자극이 있으면, iNOS는 염증 반응의 중요한 매개체로 알려진 NO를 생성한다. 그러므로 iNOS 및 NO 생성을 감소시킬 수 있다면 항염증 효과를 확인할 수 있는 좋은 방법이 된다[30]. 본 연구에서는 핵산과 에틸아세테이트 분획이 iNOS 단백질 발현 및 NO 생성을 억제한다는 것을 보여주었다. COX-2는 PGE<sub>2</sub> 생성을 담당하는 중요한 염증성 매개물질이다. COX-2는 아라키돈산을 프로스타글란딘 H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)로 변환시키고, PGH<sub>2</sub>는 다양한 효소에 의해 프로스타글란딘 subtype로 전환된다[24,31]. 프로스타글란딘 subtype 중 PGE<sub>2</sub>는 혈관 확장 및 염증에 중요한 역할을 한다[32]. 본 연구에서는 western blotting을 이용하여 COX-2 단백질 발현을 조사했고, ELISA를 통하여 PGE<sub>2</sub>를 측정하였다. 그 결과, 에틸아세테이트와 메틸렌클로라이드 분획 모두 COX-2 단백질 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성량을 감소시켰다. 부탄올 분획의 경우 COX-2 단백질 발현을 감소시켰으나 PGE<sub>2</sub> 생성량에는 영향을 미치지 않았다.

본 연구에서는 qPCR과 ELISA를 이용하여 RAW264.7 세포에서 IL-6와 TNF- $\alpha$  농도를, RBL-2H3에서 IL-4 농도를 측정하였다. 그 결과, 한국산 겨우살이 분획물 중 에틸아세테이트와 메틸렌클로라이드 분획에 의해 TNF- $\alpha$ 의 단백질 발현 및 사이토카인 생산이 감소하였다. 그러나 핵산과 부탄올 분획은 TNF- $\alpha$ 에 영향을 미치지 않았다. IL-6의 경우, 부탄올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 분획이 mRNA 발현 및 사이토카인 생산을 현저히 감소시켰다. 또한 부탄올과 에틸아세테이트 분획은 IL-4 mRNA 발현을



**Figure 6.** Effect of different fractions of *V. album coloratum* on the expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with different concentration of *V. album coloratum* fractions (1 h), followed by stimulation with LPS (100 ng/mL, 18 h) to determine the expression of iNOS and COX-2. Each bar represent mean  $\pm$  SD (N = 3). (\*\* represents significant differences between LPS and samples treated group  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ). (HX; hexane fraction, EA; ethylene acetate fraction, BU; butanol fraction, MC; methylene chloride fraction).

감소시켰지만, ELISA를 이용하여 측정했을 때는 IL-4 분비량의 변화가 관찰되지 않았다. mRNA와 다양한 전사 후 측정하는 불안정한 단백질인 사이토카인 사이에는 큰 관련이 없으므로 qPCR과 ELISA 결과는 별도로 해석해야 한다는 연구 결과가 있다[33,34]. 이것이 본 연구에서 IL-4의 qPCR과 ELISA 결과가 일정하게 나오지 않은 것을 설명할 수 있다.

한국산 겨우살이 분획물 중 전반적으로 에틸아세테이트 분획이 좋은 항염증 효능을 보여주었는데, 이는 비극성인 헥산 및 메틸렌클로라이드보다 극성인 에틸아세테이트 용매에 항염증 효능이 있는 성분들이 함유되어 있는 것으로 사료되며, 추후 성분 분석 및 총 추출물과의 비교 등 추가 연구가 필요하다.

본 연구에서는 한국산 겨우살이 분획물이 강력한 항염증 효과가 있다는 것을 밝혀냈다. 그러므로 잠재적 아토피 피부염 치료제로서의 한국산 겨우살이의 가능성을 확인할 수 있었다. 아토피 피부염의 작용 기전을 더 명확하게 밝혀내기 위해서는 추후에도 더 많은 연구가 필요할 것이다.

### Acknowledgement

본 연구는 순천대학교 교연비 사업에 의하여 연구되었음.

### References

1. M. Ferenčík, V. Štvrtinová, I. Hulin, and M. Novak, Inflammation — a lifelong companion, *Folia Microbiol.*, **52**(2), 159 (2007).
2. N. Hogg, Free radicals in disease, *Semin. Reprod. Endocrinol.*, **16**(4), 241-8 (1998).
3. S. Toyokuni, The origin and future of oxidative stress pathology: From the recognition of carcinogenesis as an iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy, *Pathol. Int.*, **66**(5), 245-59 (2016).
4. J. N. Sharma, A. Al-Omran, and S. S. Parvathy, Role of nitric oxide in inflammatory diseases, *Inflammopharmacology*, **15**(6), 252 (2007).
5. N. Omata, H. Tsukahara, S. Ito, Y. Ohshima, M. Yasutomi, A. Yamada, M. Jiang, M. Hiraoka, M. Nambu, Y. Deguchi, and M. Mayumi, Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis, *Life Sci.*, **69**(2), 223 (2001).
6. C. Brocker, D. Thompson, A. Matsumoto, D. W. Nebert, and V. Vasiliou, Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family, *Hum. genomics*, **5**(1), 30 (2010).
7. D. Vercelli, H. H. Jabara, K. Arai, and R. S. Geha, Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens, *J. Exp. Med.*, **169**(4), 1295 (1989).
8. G. Del Prete, E. Maggi, P. Parronchi, I. Chrétien, A. Tiri, D. Macchia, M. Ricci, J. Banchereau, J. De Vries, and S. Romagnani, IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced *in vitro* by human T cell clones and their supernatants, *J. Immunol.*, **140**(12), 4193 (1988).
9. T. Hirano, K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, and et al., Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature*, **324**(6092), 73 (1986).
10. M. Tang, A. Kemp, and G. Varigos, IL-4 and interferon-gamma production in children with atopic disease, *Clin. Exp. Immunol.*, **92**(1), 120 (1993).
11. A. Tsianakas and T. A. Luger, The anti-IL-4 receptor alpha antibody dupilumab: facing a new era in treating atopic dermatitis, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **15**(11), 1657 (2015).
12. T. Ilves and I. T. Harvima, Decrease in chymase activity is associated with increase in IL-6 expression in mast cells in atopic dermatitis, *Acta Derm. Venereol.*, **95**(4), 411 (2015).
13. W. Hu, X. Yang, C. Zhe, Q. Zhang, L. Sun, and K. Cao, Puerarin inhibits iNOS, COX-2 and CRP expression via suppression of NF- $\kappa$ B activation in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells, *Pharmacol. Rep.*, **63**(3), 781 (2011).
14. S. Wang, L. Liu, Y. Fan, A. M. El-Toni, M. S. Alhoshan, D. li, and F. Zhang, *In vivo* High-resolution ratiometric fluorescence imaging of inflammation using NIR-II nanoprobes with 1550 nm emission, *Nano Lett.*, **19**(4), 2418 (2019).



15. D. Y. Leung, Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**(5), 860 (2000).
16. T. A. Khwaja, C. B. Dias, and S. Pentecost, Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids, *Oncology*, **43 Suppl 1**, 42 (1986).
17. A. Bussing, K. Suzart, J. Bergmann, U. Pfuller, M. Schietzel, and K. Schweizer, Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins, *Cancer lett.*, **99**(1), 59 (1996).
18. S. Y. Lyu, S. H. Choi, and W. B. Park, Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53, *Arch. Pharm. Res.*, **25**(1), 93 (2002).
19. T. J. Yoon, Y. C. Yoo, T. B. Kang, S. K. Song, K. B. Lee, E. Her, K. S. Song, and J. B. Kim, Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells, *Arch. Pharm. Res.*, **26**(10), 861 (2003).
20. C. H. Lee, J. K. Kim, H. Y. Kim, S. M. Park, and S. M. Lee, Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin *in vitro* and *in vivo*, *Int. immunopharmacol.*, **9**(13-14), 1555 (2009).
21. K. J. Yun, J. Y. Kim, J. B. Kim, K. W. Lee, S. Y. Jeong, H. J. Park, H. J. Jung, Y. W. Cho, K. Yun, and K. T. Lee, Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways, *Int. immunopharmacol.*, **8**(3), 431 (2008).
22. J. J. Zimmerman, Redox/radical repertoire rapport: pathophysiology and therapeutics, *Acta Anaesthesiol. Scand.*, **42**(1), 1 (1998).
23. S. Toyokuni, Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology, *Pathol. Int.*, **49**(2), 91 (1999).
24. M. M. Tollefson and A. L. Bruckner, Atopic dermatitis: skin-directed management, *Pediatrics*, **134**(6), e1735 (2014).
25. N. S. Al-Waili, Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture for atopic dermatitis or psoriasis: partially controlled, single-blinded study, *Complement. Ther. Med.*, **11**(4), 226 (2003).
26. J. Graf, Herbal anti-inflammatory agents for skin disease, *Skin ther. lett.*, **5**(4), 3 (2000).
27. R. Zamora, Y. Vodovotz, and T. R. Billiar, Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases, *Mol. Med.*, **6**(5), 347 (2000).
28. N. G. Baydar, G. Özkan, and O. Sağdıç, Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts, *Food Control*, **15**(5), 335 (2004).
29. M. K. O'Banion, Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology, *Crit. Rev. Neurobiol.*, **13**(1), 45 (1999).
30. A. J. Wiemer, S. Hegde, J. E. Gumperz, and A. Huttenlocher, A live imaging cell motility screen identifies prostaglandin E2 as a T cell stop signal antagonist, *J. Immun.*, **187**(7), 3663 (2011).
31. P. J. Delves and I. M. Roitt, The immune system. First of two parts, *N. Engl. J. Med.*, **343**(1), 37 (2000).
32. N. Favre, G. Bordmann, and W. Rudin, Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR, *J. Immunol. Methods*, **204**(1), 57 (1997).
33. L. E. Pascal, L. D. True, D. S. Campbell, E. W. Deutsch, M. Risk, I. M. Coleman, L. J. Eichner, P. S. Nelson, and A. Y. Liu, Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate, *BMC genom.*, **9**, 246 (2008).
34. Y. Guo, P. Xiao, S. Lei, F. Deng, G. G. Xiao, Y. Liu, X. Chen, L. Li, S. Wu, Y. Chen, H. Jiang, L. Tan, J. Xie, X. Zhu, S. Liang, and H. Deng, How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **40**(5), 426 (2008).