

편백(*Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl.) 잎 분획물의 항염증 효과

권용진[†]

경성대학교 화장품학과

(2023년 10월 8일 접수: 2023년 12월 12일 수정: 2023년 12월 20일 채택)

Anti-inflammatory effects of *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. Leaf Fractions

Yong-Jin Kwon[†]

Department of Cosmetic Science, Kyungsung University, Busan, 48434, South Korea

(Received October 8, 2023; Revised December 12, 2023; Accepted December 20, 2023)

요 약 : 본 연구는 편백나무 잎 분획물의 항염증 기능성 소재로서의 활용 가능성을 평가하기 위해 99% 에탄올로 추출한 편백잎 추출물 (CO99EL)을 헥산 (CO99EL-H), 클로로포름 (CO99EL-C), 에틸 아세테이트 (CO99EL-E), 부탄올 (CO99EL-B)과 증류수 (CO99EL-W) 순서대로 분획하였다. 각각의 분획물의 항염증 효과는 LPS로 유도된 RAW264.7 마우스 대식세포를 이용하여 수행하였다. 세포독성은 CO99EL-H와 CO99EL-C에서 가장 높았으며 CO99EL-W에서 가장 낮음을 확인하였다. 흥미롭게도, LPS로 유도된 iNOS의 발현과 NO의 생산은 CO99EL-H와 CO99EL-E에 의해 현저하게 감소하였고, COX-2의 발현은 CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 현저하게 감소하였다. 또한, LPS에 의해 증가된 염증성 사이토카인인 interleukin(IL)-1 β 는 CO99EL-C, CO99EL-E, CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 현저하게 감소하였고, IL-6는 CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 현저하게 감소하였다. 그뿐만 아니라, LPS에 의해 활성화된 janus kinase (JAK)/signaling transducer and activator of transcription (STAT) 신호 전달 경로는 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 상당히 감소하였고, mitogen-activated protein kinase (MAPK)은 CO99EL-C에 의해 약간 감소하였다. 하지만, nuclear factor (NF)- κ B의 활성은 어떤 분획물도 감소시키지 못했다. 본 연구의 결과를 통해, CO99EL의 분획물들은 분획에 사용되는 용매에 따라 항염증 작용기전이 다를 수 있음을 확인하였다.

주제어 : *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. Leaf, 분획, 항염증 효과, 전염증성 매개체, 대식세포

[†]Corresponding author
(E-mail: yongjin@ks.ac.kr)

Abstract : In this study, to evaluate the possibility of utilizing *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. (*C. obtusa*) leaf fractions as anti-inflammatory functional materials, *C. obtusa* extract extracted with 99% ethanol (CO99EL) was fractionated with hexane (CO99EL-H), chloroform (CO99EL-C), ethyl acetate (CO99EL-E), butanol (CO99EL-B) and distilled water (CO99EL-W). The anti-inflammatory effects of each fraction was performed using lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 mouse macrophages. Cytotoxicity was highest in CO99EL-H and CO99EL-C and lowest in CO99EL-W. Interestingly, LPS-induced iNOS expression and NO production were significantly reduced by CO99EL-H and CO99EL-E, and COX-2 expression was significantly reduced by CO99EL-B and CO99EL-W. In addition, interleukin (IL)-1 β , an inflammatory cytokine increased by LPS, was significantly reduced by CO99EL-C, CO99EL-E, CO99EL-B and CO99EL-W, and IL-6 was significantly reduced by CO99EL-B and CO99EL-W. Therefore, the janus kinase (JAK)/signaling transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway activated by LPS was significantly reduced by CO99EL-H and CO99EL-C, and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway was slightly reduced by CO99EL-H and CO99EL-C. However, nuclear factor (NF)- κ B activity was not reduced by any fractions. Based on the results of this study, it was confirmed that CO99EL fractions have different anti-inflammatory mechanisms depending on the solvent used for fractionation.

Keywords : *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. Leaf, fraction, anti-inflammatory effects, pro-inflammatory mediator, macrophage

1. 서론

염증은 외부 병원균 및 자극으로부터 인체를 보호하는 면역학적 방어기전이다 [1]. 침입한 외래 병원균은 다양한 전염증성 매개체를 분비하는 급성 염증 세포를 활성화시키고 이러한 매개체에 의해 시작되는 통제된 염증 반응은 병원체로부터 인체를 보호하고 손상된 조직 복구하는데 중요한 역할을 한다 [2, 3]. 그러나 염증 반응이 비정상적으로 지속되면 면역 세포가 과도하게 활성화되어 많은 전염증성 사이토카인이 생성되고, 이러한 과잉 생산으로 인해 관절염, 천식, 아토피성 피부염, 알러지 및 자가면역질환을 비롯한 다양한 염증성 질병을 유발할 수 있다 [4-6]. 따라서 만성 염증을 억제하는 것은 염증성 질환을 치료하기 위해 필수적이다.

대식세포는 외부 병원균을 식균하는 면역세포이며 대식세포에서 발현되는 toll-like receptor 4 (TLR4)는 그람 음성균의 외막 구성 요소인 LPS에 의해 활성화된다 [7, 8]. 이는 myeloid differentiation primary response 88 (MYD88)-의존 신호 전달을 통해 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 활성화 시킨다 [9, 10]. 이러한 신호

가 활성화되면 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 를 포함한 다양한 전염증성 사이토카인이 과도하게 발현되어 세포밖으로 분비된다 [11, 12]. 이로 인해, inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증성 효소의 발현이 증가하여 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)을 과도하게 생산한다 [13, 14]. 과도하게 증가된 염증유전자와 매개체를 억제하는 것은 면역질환 치료에 중요하므로, 전반적인 염증성 신호전달 기전을 이해하고 약리학적 효능이 있는 물질을 발견하도록 노력해야 한다.

히노끼(Hinoki)라고 알려져 있는 편백(*Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl., *C. obtusa*)은 북반구 온대 지역에서 널리 재배되는 종으로 주로 일본, 한국과 중국에서 재배되고 있다 [15]. 동의보감(東醫寶鑑)이나 본초강목(本草綱目)과 같이 많은 한의학 고서들에서 편백을 다양한 질병을 치료하기 위한 약용재료로 사용하였다고 기록되어있으며, 편백 추출물의 잎과 수피는 다양한 플라보노이드류, 테르펜류와 피톤치드 등이 함유되어 있어 항염증, 항알레르기, 항산화와 항암 효과가 있는 것으로 보고되었다

[16-18]. 이전 연구에서, 편백나무 잎, 수피와 뿌리를 열수, 70% 에탄올과 99% 에탄올로 추출하여 가장 수율이 높고 독성이 낮은 편백 잎 추출물을 이용하여 항염증 효능을 분석하였고, 그중에 CO99EL 추출물이 가장 항염증 효능이 우수함을 보고하였다 [19]. 그러나, CO99EL 추출물에는 수많은 유효성분을 포함하고 있으므로 유효성분을 세밀하게 분리하여 전반적인 염증성 신호 전달 기전에 효과적인 부분을 발견하는 것은 흥미로운 연구주제이다.

이전 연구를 바탕으로, CO99EL 추출물의 항염증 효과가 있는 유효성분을 세분화시키기 위해 용매의 극성에 따른 분획을 진행하였으며, 어떤 CO99EL 분획물이 CO99EL 추출물의 항염증 효과와 유사한지 평가하였다. 따라서, 본 연구는 CO99EL의 hexan층, chloroform층, ethylacetate층, butanol층과 물층을 각각 분리하여 전반적인 항염증 작용기전을 LPS-유도 RAW264.7 대식세포 모델을 이용하여 분석하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

LPS와 Griess reagent는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent는 Duchefa Biochemie (Haarlem, Netherlands)에서 구매하였다.

2.2. 항체

Anti-phospho(p)-STAT1, anti-STAT1, anti-p-STAT3, anti-STAT3, anti-p-STAT5, anti-STAT5, anti-p-JAK1, anti-JAK1, p-JAK2, anti-JAK2, anti-p-NF- κ B, anti-NF- κ B, anti-p-I κ B α , anti-p-p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-p-p38, anti-p-SAPK/JNK와 anti-SAPK/JNK항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서, anti-I κ B α , anti-iNOS와 anti-p38항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, anti- α -Tubulin항체는 Abbkine (Wuhan, China)에서, anti-COX-2항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구매하였다. HRP-tagged secondary antibody는 Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA)에서 구매하였다.

2.3. 편백나무 추출 및 분획

본 연구에 사용된 편백나무 잎은 2020년 3월 대한민국 전라남도 광양시 광양읍에서 채취하였다. 에탄올 추출물은 99% 에탄올을 10배(무게/부피)를 첨가한 후 상온에서 24시간 동안 2회 추출하였다. 추출물을 종이필터 (Whatman, Tokyo, Japan)에 통과시킨 후 감압농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 동결건조기 (ilShinbiobase, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 건조시켰다. 분획은 CO99EL을 hexan, chloroform, ethylacetate, butanol과 증류수 순서대로 분획을 실시하고 농축한 후 동결 건조시켰다.

2.4. 세포배양

마우스 대식세포 세포주 RAW264.7은 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)과 및 1% penicillin/streptomycin (Capricorn Scientific GmbH)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Capricorn Scientific GmbH)에서 배양시켰다. 세포는 37°C에서 5% CO₂를 포함하는 가습된 세포 배양기 (Vision science, Seoul, Korea)에서 유지되었다.

2.5. 세포독성 분석

RAW264.7 세포를 다양한 농도의 CO99EL 분획물이 포함된 96-well plate에서 24시간 동안 성장시키고 MTT 시약과 함께 2시간 동안 배양했다. 자주색 포르마잔 결정을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 가용화하고, 가용화된 포르마잔 결정 수준을 플레이트 판독기 (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 570 nm에서 측정했다.

2.6. NO 생산 측정

RAW264.7 세포를 24-well plate에 시딩한 후 밤새 성장시켰다. 다양한 농도의 CO99EL 분획물을 처리한 후 LPS를 16시간 동안 처리했다. NO 생성을 측정하기 위해 상층액을 Griess reagent로 처리한 후 암실에서 10분 동안 배양하고, 플레이트 판독기 (Tecan)를 사용하여 540 nm에서 측정했다.

2.7. Western blotting

RAW264.7 세포를 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 다음, protease 및 phosphatase 억제제가 포함된 Triton-X lysis buffer에 용해시켰습니다. 얼음 위에서 30분 동안 용해시킨 후, 용해물을 4°C에서 20분 동안 13,000 rpm으로 원심분리하고 상층액을 수집하여 Bradford reagent (Bio-Rad, California, Hercules, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 7-10% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하고 nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA)으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane을 실온에서 1시간 동안 5% skim-milk에서 배양한 후 1차 항체 (1:1,000 희석)와 함께 밤새 4°C에서 배양했다. 다음날 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체 (1:10,000 희석)와 함께 2시간 동안 배양한 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Biomax, Seoul, Korea)를 사용하여 시각화하였다.

2.7. 실시간 중합효소연쇄반응 (qPCR)

RAW264.7 세포를 차가운 PBS로 세척한 다음, RNAiso Plus 시약(Takara, Shiga, Japan)을 사용하여 총 RNA를 분리하고 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성했다. qPCR MasterMix

(Applied Biological Materials, Richmond, Canada)를 사용하여 Quantitative real-time PCR을 수행하였고, CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)으로 형광 신호를 검출하였다. 본 연구에 사용된 mouse qPCR primer 서열 Table. 1에 요약하였다.

2.8. 통계분석

모든 데이터의 통계 분석은 Microsoft Excel software 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA)를 사용하여 수행되었다. 결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 \pm 표준 편차 (standard deviation, SD)로 표기하였다. 모든 유의성은 unpaired student's *t*-test에 의해 결정되었으며 p -value < 0.05 값일 때 통계학적으로 유의미하다고 표기하였다. $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$ 와 $p < 0.001 = ***$.

3. 결과 및 고찰

3.1. 편백 분획물 분획과정 및 세포독성 평가

편백 분획물의 항염증 기능성 소재로서의 가능성을 평가하기 위해 먼저 CO99EL을 용매의 극성에 따라 핵산 (CO99EL-H), 클로로포름 (CO99EL-C), 에틸아세테이트 (CO99EL-E), 부탄올 (CO99EL-B), 증류수 (CO99EL-W) 순서

Table 1. Oligonucleotide sequences for qPCR

Gene name		Sequence (5' → 3')
<i>iNOS</i> (mouse)	Forward	CAGCACAGGAAATGTTTCAGC
	Reverse	TAGCCAGCGTACCGGATGA
<i>COX-2</i> (mouse)	Forward	TTTGGTCTGGTGCCTGGTC
	Reverse	CTGCTGGTTTGAATAGTTGCTC
<i>TNF-α</i> (mouse)	Forward	TATGGCTCAGGGTCCAACCTC
	Reverse	CTCCCTTTCAGAACTCAGG
<i>IL-1β</i> (mouse)	Forward	TTGACGGACCCCAAAGATG
	Reverse	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA
<i>IL-6</i> (mouse)	Forward	GGTGACAACCACGGCCTTCCC
	Reverse	AAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
<i>GAPDH</i> (mouse)	Forward	GCAAATTCAACGGCACAG
	Reverse	CACCAGTAGACTCCACGAC

대로 분획하였다 (Fig 1a). 추출한 분획물은 농축 후 동결 건조하여 RAW264.7 마우스 대식세포를 이용하여 세포독성을 분석하였다. CO99EL 분획물을 각각 25, 50, 100과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, CO99EL-H와 CO99EL-C에서 세포독성이 높았고, CO99EL-E, CO99EL-B와 CO99EL-W는 상대적으로 세포독성이 낮았다 (Fig 1b). 이러한 결과를 바탕으로, CO99EL의 무극성 용매에 함유된 유효물질이 더 강한 세포독성을 나타내고, 상대적으로 극성 용매에 함유된 유효물질은 약한 세포독성을 나타낸다는 것을 확인하였다.

3.2. LPS에 의해 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 분획물의 효과

CO99EL 분획물의 항염증 효능에 대한 분자생물학적 작용기전을 확인하기 위해, RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 과도하게 증가한 iNOS

와 COX-2의 단백질 및 mRNA 발현을 CO99EL 분획물이 억제할 수 있는지 평가하였다. 흥미롭게도, LPS에 의해 유도된 iNOS의 단백질 수준은 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 현저하게 감소하였지만, COX-2의 발현은 약간 감소하였다 (Fig. 2a). 하지만, LPS에 의해 유도된 COX-2의 발현은 CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 현저하게 감소하였지만, iNOS의 발현은 전혀 감소하지 않았다 (Fig. 2a). 마찬가지로, LPS에 의해 유도된 iNOS의 mRNA 수준은 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 현저하게 감소하였으며, COX-2의 mRNA 수준은 CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 현저하게 감소하였다 (Fig. 2b, c). 또한, LPS에 의해 생성된 NO는 iNOS의 발현패턴과 유사하게 상대적으로 CO99EL-B와 CO99EL-W보다 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 더 감소되었다 (Fig. 2d). 본 연구결과를 통해, CO99EL의 무극성 용매에 함유된 유효물질

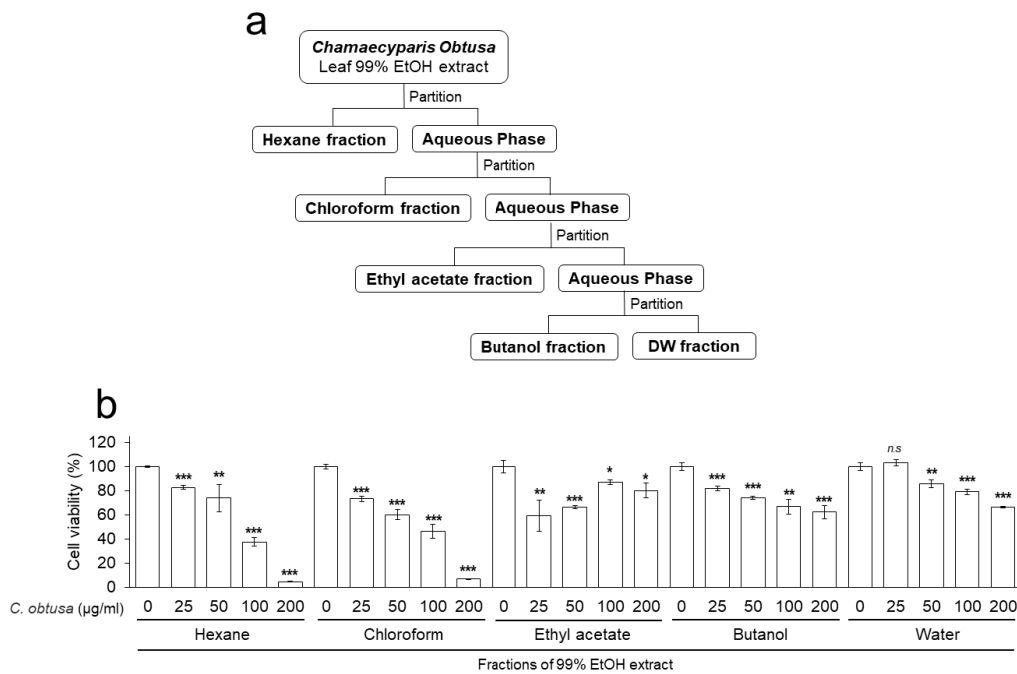


Fig 1. Fraction process and cell cytotoxicity of CO99EL fractions. a. Fraction process of CO99EL. b. RAW264.7 cells were seeded in 96-well plates and treated with CO99EL fractions for 24 h. The cell cytotoxicity of CO99EL fractions was determined by MTT assay. Data represent the mean \pm SD, $n = 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. control group by unpaired student's t -test.

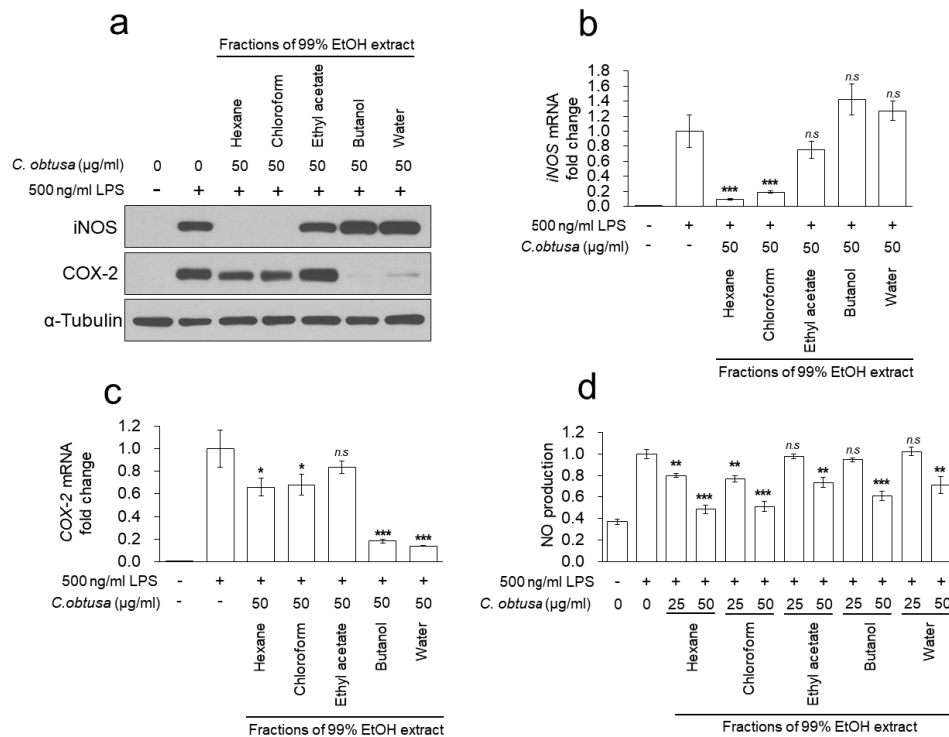


Fig 2. Effect of CO99EL fractions on LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 macrophage cells.

a-d RAW264.7 cells were seeded in 6-well plates and treated with CO99EL fractions for 2 h followed by treated with LPS for 16 h. The protein expression of iNOS and COX-2 was analyzed by western blotting (a), mRNA expression of iNOS (b) and COX-2 (c) was analyzed by qPCR, and NO production was analyzed using griess reagent (d). Data represent the mean \pm SD, $n = 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. LPS-treated group by unpaired student's t -test.

은 iNOS의 발현을 억제하고, 극성 용매에 함유된 유효물질은 COX-2의 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.

3.3. LPS에 의해 유도된 JAK/STAT 활성화와 IL 발현에 대한 분획물의 효과

이전 연구에서, CO99EL은 LPS에 의해 유도된 IL/JAK/STAT 축을 억제하여 염증 반응을 억제한다고 보고했다 [19]. LPS에 의해 증가한 IL의 발현과 JAK/STAT의 활성화를 억제하는 CO99EL 분획물이 무엇인지 궁금했기 때문에, 각 분획물을 처리하여 비교 분석하였다. STAT1과 STAT3의 활성화와 JAK1과 JAK2의 활성화는 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 상당히 감소

하는 것을 확인하였으며 CO99EL-B와 CO99EL-W는 다른 분획물에 비해 상대적으로 적게 억제하거나 효과가 없었다 (Fig. 3a, b). 추가적으로, *IL-1 β* 의 발현은 거의 모든 분획물에 의해 상당히 억제하였지만, *IL-6*의 발현은 CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 상당히 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3c, d). 이러한 결과를 바탕으로, CO99EL의 JAK/STAT 축의 억제는 주로 CO99EL-H와 CO99EL-C와 같은 무극성 용매에 함유된 유효물질이 주된 역할을 하였고, *IL-1 β* 와 *IL-6*의 발현은 CO99EL-B와 CO99EL-W와 같은 극성 용매에 함유된 유효물질이 주된 역할을 하였을 것으로 제안한다.

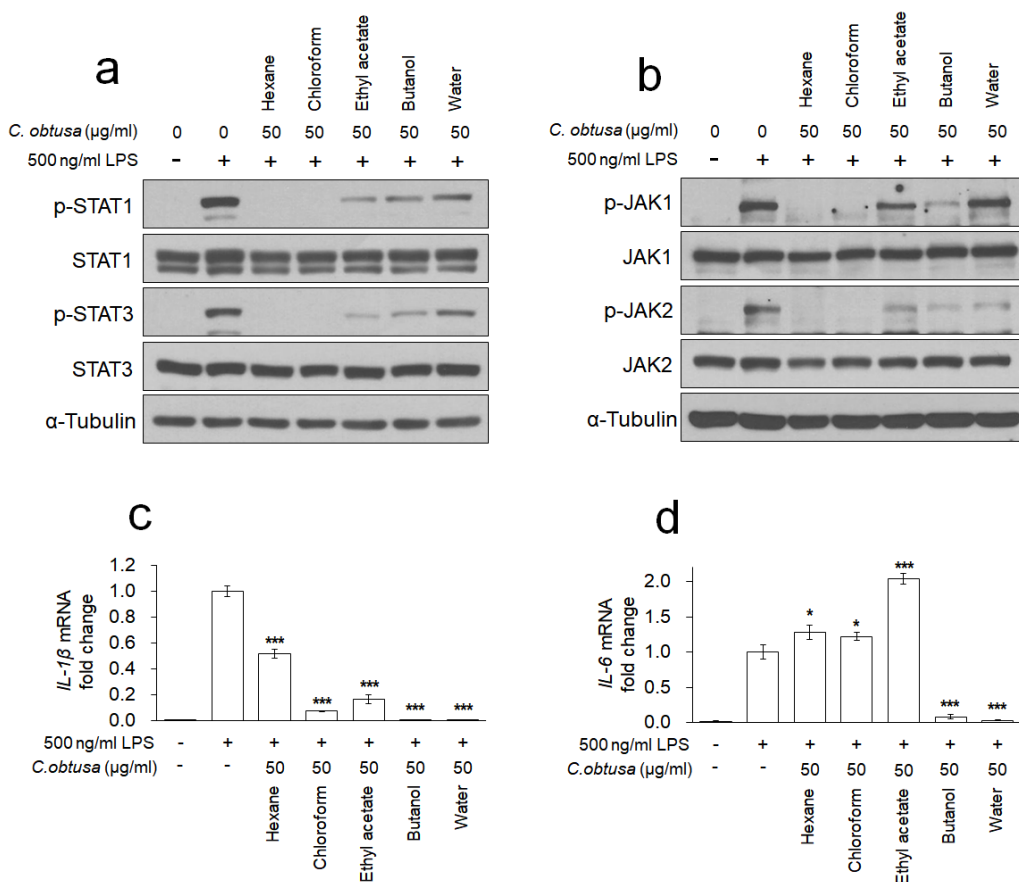


Fig 3. Effect of CO99EL fractions on LPS-induced JAK/STAT activation and ILs expression in RAW264.7 macrophage cells.

a-d RAW264.7 cells were seeded in 6-well plates and treated with CO99EL fractions for 2 h followed by treated with LPS for 4 h. The protein expression of STATs (a) and JAKs (b) was analyzed by western blotting, and mRNA expression of IL-1β and IL-6 was analyzed by qPCR (c, d). Data represent the mean ± SD, n = 3. *p < 0.05, and ***p < 0.001 vs. LPS-treated group by unpaired student's t-test.

3.4. LPS에 의해 유도된 JAK/STAT 활성화와 IL 발현에 대한 분획물의 효과

JAK/STAT 축과 같이 LPS에 의해 활성화된 MAPK와 NF-κB 신호 기전은 염증성 유전자를 발현시키거나 다량의 전염증성 매개체를 분비하여 염증 반응을 일으킨다 [12, 20]. 비록 이전 연구에서 CO99EL 추출물은 LPS에 의해 활성화된 MAPK와 NF-κB 신호 기전을 억제하지 못했지만, CO99EL 분획물을 이용하여 항염증 효과를 확인하였다 [19]. ERK의 활성화는 CO99EL-H

와 CO99EL-C에 의해 억제되었고, p38의 활성화는 CO99EL-C에 의해 억제되었으나 JNK의 활성화는 전혀 감소되지 않음을 확인하였다 (Fig. 4a). 추가적으로, NF-κB와 IκBα의 활성화는 어떤 분획물도 억제하지 못했다 (Fig. 4b). 본 연구결과를 통해, MAPK 신호 기전의 활성화는 무극성 용매에 함유된 유효물질 (특히, 클로로포름에 다량 함유된 유효물질)에 의해 조금 억제하였으나, NF-κB 신호 기전의 활성화는 모든 분획물에서 효과가 없음을 확인하였다.

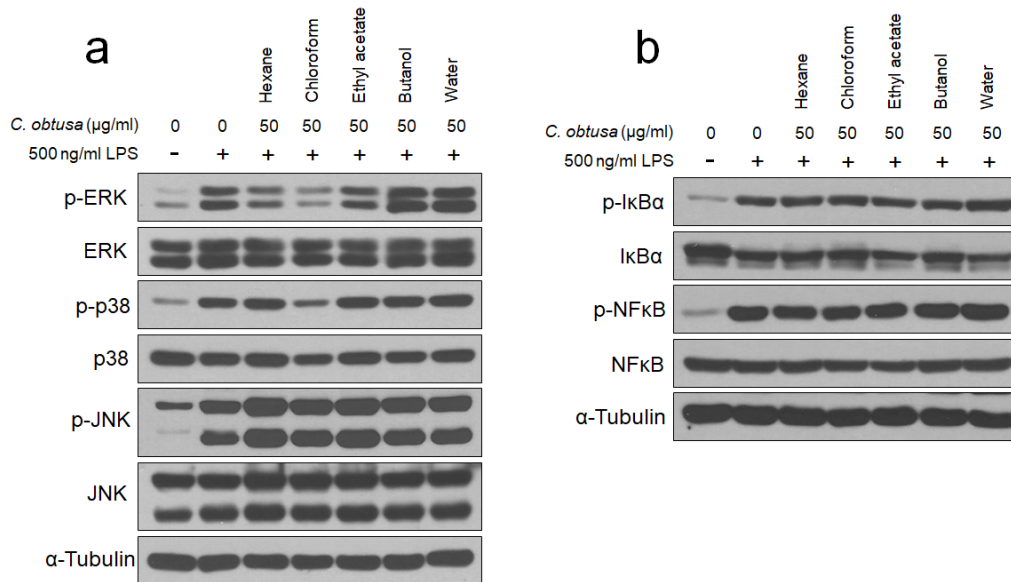


Fig. 4. Effect of CO99EL fractions on LPS-induced MAPK and NF- κ B activation in RAW264.7 macrophage cells.

a, b RAW264.7 cells were seeded in 6-well plates and treated with CO99EL fractions for 2 h followed by treated with LPS for 4 h. The protein expression of ERK, p38, JNK (a), NF- κ B and I κ B α (b) was analyzed by western blotting.

4. 결론

본 연구는 목적은 편백나무 잎 분획물의 항염증 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하고 전반적인 항염증 작용기전을 분석하기 위함이며, LPS로 유도된 마우스 대식세포인 RAW264.7에서의 항염증 효능을 평가하였다. CO99EL을 용매의 극성에 따라 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올과 증류수를 이용하여 분획을 진행하였다. 분획물의 세포독성은 CO99EL-E, CO99EL-B와 CO99EL-W보다 CO99EL-H와 CO99EL-C가 독성이 더 높았다. 따라서, CO99EL 분획물의 세포독성은 무극성 용매에 함유된 물질이 상대적으로 극성 물질에 함유된 물질보다 독성이 더 높음을 증명하였다 (Fig. 1). CO99EL 분획물에 이의한 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 발현의 억제를 확인하였을 때, iNOS의 단백질과 mRNA 수준, 그리고 NO의 생산은 주로 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 상당히

억제되었고 COX-2의 단백질과 mRNA 수준은 CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 상당히 억제되는 것을 확인하였다. 본 결과를 통해, CO99EL 분획물의 무극성 용매에 함유된 물질은 iNOS를 유의미하게 억제하고 극성 물질에 함유된 물질은 COX-2를 유의미하게 억제함을 증명하였다 (Fig. 2). 추가로, CO99EL 분획물을 이용하여 대표적인 염증성 작용기전인 IL/JAK/STAT 축과 MAPK 그리고 NF- κ B 신호 전달 기전의 변화를 확인하였다. LPS로 활성화된 JAK/STAT 신호 기전은 주로 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 상당히 억제되었고, IL- β 와 IL-6의 발현은 주로 CO99EL-B와 CO99EL-W에 의해 상당히 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 3). MAPK 신호 전달 기전의 경우 활성화된 ERK는 CO99EL-H와 CO99EL-C에 의해 p38은 CO99EL-C에 의해 감소되었고, NF- κ B 신호 전달 기전에 활성화는 어떤 분획물도 억제하지 못했다 (Fig. 4). 결론적으로, CO99EL 분획물은 분획 용매에 따라 항염

중 작용기전이 다양하다는 것을 확인하였으며 각각의 분획물을 항염증 소재로써 사용하는 것보다 CO99EL 추출물을 사용하는 것이 복합적으로 항염증 효과가 있을 것으로 예측한다 (Fig. 5).

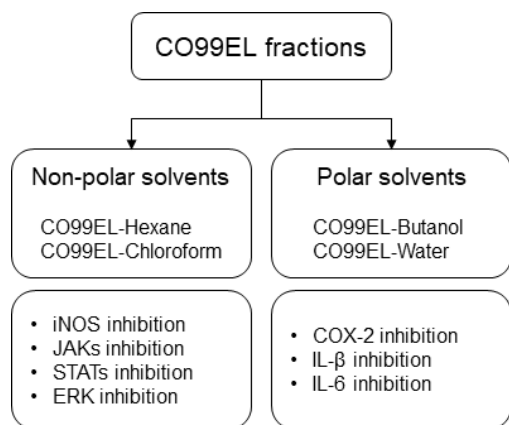


Fig. 5. Summary of anti-inflammatory mechanisms of CO99EL fractions according to fractionation solvents.

References

1. L. Chen, H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao, "Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs", *Oncotarget*, Vol.9, No.6, pp.7204, (2018).
2. B. Choi, C. Lee, J. W. Yu, "Distinctive role of inflammation in tissue repair and regeneration", *Archives of Pharmacal Research*, Vol.46, No.2, pp.7204, (2023).
3. J. M. Zhang, J. An, "Cytokines, inflammation and pain", *International anesthesiology clinics*, Vol.45, No.2, pp.27, (2007).
4. M. Leńska-Mieciek, N. Madetko-Alster, P. Alster, L. Krolicki, U. Fiszer, D. Kozirowski, "Inflammation in multiple system atrophy", *Frontiers in Immunology*, Vol.14, (2023).
5. A. Gillissen, M. Paparoupa, "Inflammation and infections in asthma", *The clinical respiratory journal*, Vol.9, No.3, pp.257, (2015).
6. L. Duan, X. Rao, K. R. Sigdel, "Regulation of inflammation in autoimmune disease", *Journal of immunology research*, Vol.2019, (2019).
7. S. Gordon, "Phagocytosis: an immunobiologic process", *Immunity*, Vol.44, No.3, pp.463-475, (2016).
8. A. Ciesielska, M. Matyjek, K. Kwiatkowska, "TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling", *Cellular and molecular life sciences*, Vol.78, pp.1233-1261, (2021).
9. K. Takeda, S. Akira, "Toll-like receptors in innate immunity". *International immunology*, Vol.17, No.1, pp.1-14, (2005).
10. J. Zou, N. Shankar, "Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine expression in response to *E. faecalis* infection", *PloS one*, Vol.10, No.8, pp.e0136947, (2015).
11. M. Orecchioni, Y. Ghosheh, A. B. Pramod, K. Ley, "Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages", *Frontiers in immunology*, Vol.10, pp.1084, (2019).
12. X. Liu, S. Yin, Y. Chen, Y. Wu, W. Zheng, H. Dong, Y. Bai, Y. Qin, J. Li, S. Feng, P. Zhao, "LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation", *Molecular medicine reports*, Vol.17, No.4, pp.5484-5491, (2018).
13. J. B. Kim, A. R. Han, E. Y. Park, J. Y. Kim, W. Cho, J. Lee, E. K. Seo, K. T. Lee, "Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.30, No.12, pp.2345-2351, (2007).
14. Y. Fang, L. Yang, J. He, "Plantanone C

- attenuates LPS-stimulated inflammation by inhibiting NF- κ B/iNOS/COX-2/MAPKs/Akt pathways in RAW 264.7 macrophages”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol.143, pp.112104, (2021).
15. Y. A. Jang, S. G. Kim, H. K. Kim, J. T. Lee, “Biological Activity and Component Analyses of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract: Evaluation of Antiwrinkle and Cell Protection Effects in UVA-Irradiated Cells”. *Medicina*, Vol.59 No.4, pp.755, (2023).
 16. Y. Park, S. M. Jung, S. A. Yoo, W. U. Kim, C. S. Cho, B. J. Park, J. M. Woo, C. H. Yoon, “Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* in mice”. *International Immunopharmacology*, Vol.29, No.2, pp.320-325, (2015).
 17. Y. J. Kwon, E. B. Seo, S. K. Kim, H. S. Lee, H. Lee, Y. A. Jang, Y. M. Kim, Y. N. Kim, J. T. Lee, S. K. Ye, “Pharmacological anti-tumor effects of natural *Chamaecyparis obtusa* (siebold & zucc.) endl. Leaf extracts on breast cancer” *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.313, pp.116598, (2023).
 18. B. K. Kim, J. H. Kang, G. H. Oh, J. Y. Hwang, S. O. Jang, M. Kim, “Antibacterial and Antioxidant Activity of *Chamaecyparis obtusa* Extracts”, *Journal of Life Science*, Vol.29, No.7, pp.785-791, (2019).
 19. Y. J. Kwon, E. B. Seo, S. K. Kim, K. H. Noh, H. Lee, Y. W. Joung, H. M. Shin, Y. A. Jang, Y. M. Kim, J. T. Lee, S. K. Ye, “*Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. leaf extracts prevent inflammatory responses via inhibition of the JAK/STAT axis in RAW264. 7 cells”, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.282, pp.114493, (2022).
 20. M. Y. Park, S. E. Ha, H. H. Kim, P. B. Bhosale, A. Abusaliya, S. H. Jeong, J. S. Park, J. D. Heo, G. S. Kim, “Scutellarein inhibits LPS-induced inflammation through NF- κ B/MAPKs signaling pathway in RAW264. 7 cells”, *Molecules*, Vol.27 No.12, pp.3782, (2022).