



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서
개민들레 (*Hypochoeris radicata* L.)
꽃 에틸아세테이트 분획물의
염증 억제 효과

제주대학교 대학원

생물학과

김민진

2012년 2월

LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서
개민들레 (*Hypochoeris radicata* L.)
꽃 에틸아세테이트 분획물의
염증 억제 효과

지도교수 김 세 재

김 민 진

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2012년 2월

김민진의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ ①

위 원 _____ ①

위 원 _____ ①

제주대학교 대학원

2012년 2월

Anti-inflammatory Activity of ethylacetate
(EtOAc) fraction of *Hypochoeris radicata* L.
flower on LPS-stimulated RAW 264.7 Cells

Min-Jin Kim

(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Master of Science

February, 2012

This dissertation has been examined and approved by

.....
Chairperson of the Committee
.....
.....

.....
Date

Department of Biology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

In this study, in order to evaluate the usefulness of *Hypochoeris radicata* L. as anti-inflammatory resource, the anti-inflammatory effects of its extracts was investigated in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. We first examined the inhibitory effect of 80% EtOH extracts from different parts (flower, leaf, root, aerial part and whole plant) of *H. radicata* L. on nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The flowers extract of *H. radicata* L. showed strong inhibitory effect against the production of NO, and solvent fractions (ethylacetate, H₂O) were obtained from *H. radicata* L. flowers. Among them, ethylacetate fraction of *H. radicata* L. flower (HRF-EA) inhibited production of pro-inflammatory mediators such as NO, inducible NO synthase (iNOS), prostaglandin E₂ (PGE₂), and cyclooxygenase-2 (COX-2) and cytokines such as tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. To further examine the mechanism responsible for the inhibition of iNOS and COX-2 expression by HRF-EA, we examined the effect of HRF-EA on LPS-induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). HRF-EA inhibited LPS-induced NF- κ B activation by inhibition of I κ B- α degradation and p50 phosphorylation. Further, the phosphorylation of MAPKs such as p38, ERK and JNK was suppressed by HRF-EA in a concentration-dependent manner. These results suggest that HRF-EA may inhibit LPS-induced production of inflammatory markers by blocking NF- κ B activation and MAPKs phosphorylation. Also, The chemical constituents of the HRF-EA were further analysed by HPLC and found to include luteolin (70 mg/g). Thus, HRF-EA have the potential for use in anti-inflammatory resource.

Key words: Inflammation, *Hypochoeris radicata* L. flower, NF- κ B, MAPKs

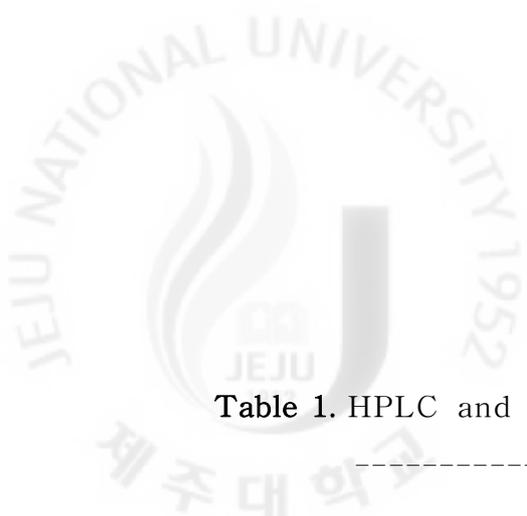


목 차

A B S T R A C T	-----	1
목 차	-----	2
L I S T O F T A B L E	-----	4
L I S T O F F I G U R E S	-----	5
I. 서 론	-----	7
II. 재 료 및 방 법	-----	10
1. 시료의 추출 및 분획	-----	10
2. 세포 배양	-----	10
3. 세포 증식률 및 독성 측정	-----	10
1) MTT 분석	-----	11
2) LDH 분석	-----	11
4. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	-----	11
5. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 생성 억제 활성 측정	-----	12
6. 전염증성 cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 생성 억제 활성 측정	---	12
7. Western blot analysis	-----	13
8. HPLC 및 UPLC / MS 분석	-----	13
9. 통계처리	-----	14
III. 결 과	-----	16



1.	개민들레 부위별 추출물의 항염증 활성	16
1)	개민들레 부위별 추출물의 세포 독성 측정	16
2)	개민들레 부위별 추출물의 NO 생성 억제 활성	16
3)	개민들레와 민들레 꽃 추출물의 항염증 활성	18
(1)	NO, PGE ₂ 생성 억제 활성	18
(2)	iNOS, COX-2 발현 억제 활성	18
2.	개민들레 꽃 EtOAc 분획물의 항염증 활성	21
1)	NO, PGE ₂ 생성 억제 활성	21
2)	iNOS, COX-2 발현 억제 활성	21
3)	전염증성 cytokines 생성 억제 활성	24
4)	IκB-α degradation 억제 활성	26
5)	NF-κB 인산화 억제 활성	26
6)	MAPKs 인산화 억제 활성	29
7)	활성성분 (luteolin) 함량 분석	32
IV.	고찰	35
V.	참고문헌	38
VI.	요약	46



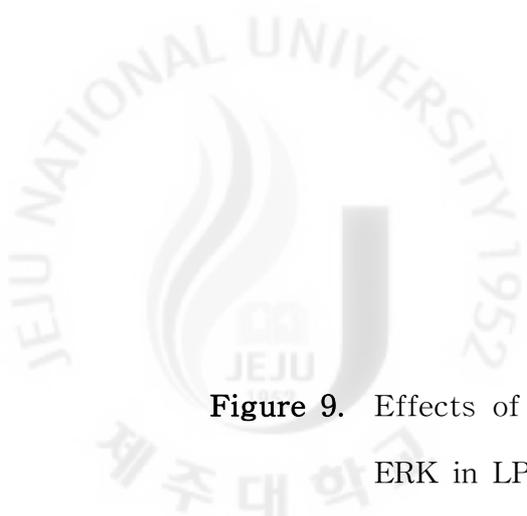
LIST OF TABLE

Table 1. HPLC and UPLC/MS conditions for luteolin analysis

----- 15

LIST OF FIGURES

- Figure 1.** Effects of 80% EtOH extract of *H. radicata* L. on cytotoxicity and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 17
- Figure 2.** Effects of 80% EtOH extract of HRF and TPF on NO, PGE₂ production and cytotoxicity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 19
- Figure 3.** Effects of 80% EtOH extract of HRF and TPF on the protein level of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 20
- Figure 4.** Effects of 80% EtOH extract and solvent fractions of HRF on NO, PGE₂ production and cytotoxicity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 22
- Figure 5.** Effects of HRF-EA on the protein level of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 23
- Figure 6.** Effect of HRF-EA on production of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 25
- Figure 7.** Effect of HRF-EA on the protein level of I κ B- α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 27
- Figure 8.** Effect of HRF-EA on the protein level of p50 NF- κ B in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 28



LIST OF FIGURES

- Figure 9.** Effects of inhibitors on the protein level of p38, JNK and ERK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 30
- Figure 10.** Effects of HRF-EA on the protein level of p38, JNK and ERK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ----- 31
- Figure 11.** HPLC chromatogram of luteolin and HRF-EA, 80% EtOH extract of HRF and TPF ----- 33
- Figure 12.** UPLC/MS of luteolin and HRF-EA ----- 34

I. 서 론

염증은 손상에 대한 살아 있는 생체 반응으로, 생체 조직이 물리적, 기계적, 화학적, 생물학적 자극에 의하여 손상을 받았을 때 이 손상을 국소화 시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 방어기전이다. 즉, 생체에 유해한 자극이 가해지고 난 후의 방어기전으로부터 회복 과정까지의 모든 과정을 의미한다 (Rabson *et al.*, 2005). 그러나 지속적인 염증반응은 오히려 점막 손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 유도하기도 한다 (Willoughby *et al.*, 1975). 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면 활성화되어 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발 시킨다 (Lee *et al.*, 2004).

내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7 cell과 같은 대식세포 (macrophage) 또는 단핵구 (monocyte)에서 염증매개인자들의 발현을 활성화 시킨다 (Park *et al.*, 2008).

염증반응 인자인 nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성 분자로 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성 된다 (Alderton *et al.*, 2001; Nathan *et al.*, 1994). NOS는 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)의 세 가지 종류가 존재한다. eNOS는 혈관내피 세포에 존재하고, nNOS는 신경계, 췌장의 β -islet 세포 및 기관지, 위장의 내피 세포에 존재한다. 이 두 이성효소는 체내에서 일정 수준으로 발현되어 혈관 확장, 조직 혈류 분포 조절 및 신경세포 신호 전달 등 체내 항상성 유지에 중요한 역할을 한다 (Moncada *et al.*, 1995). 반면 iNOS는 interferon- γ (IFN- γ) 또는 LPS에 의해 자극 받을 때 발현되어 많은 양의 NO를 생성하여 염증반응의 매개물질로 작용토록 한다 (Guzik *et al.*, 2003; Miyasaka *et al.*, 1995).

NO와 함께 대표적 염증 매개 물질로 알려진 prostaglandins (PGs)는 cyclooxygenase (COX)에 의해 arachidonic acid로부터 생성된다. 염증부위에서 단핵구와 대식세포는 LPS 또는 interleukin-1 (IL-1)에 의해 자극을 받아 COX-2를 발현하게 되고, 이로 인해 생성된 PGs에 의해 염증반응이 지속 된다

(Xue *et al.*, 2011). COX는 생체 내에 두 종류의 이성효소 COX-1과 COX-2로 존재하며 서로 다른 유전자로부터 생성되며, COX-1은 여러 가지 생체 장기의 항상성 유지 및 보호 작용에 관여하고 거의 모든 조직에 존재한다. 반면 COX-2는 체내의 염증 반응에 관여하며 (Dubois *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1996), 세균류에 의해 분비되는 내독소인 LPS와 inflammatory cytokines 등에 의해 발현이 유도 되고 growth factor, oncogenes, carcinogens, 및 tumor promoters에 의해서도 발현이 증가 된다 (Vane *et al.*, 1998).

LPS에 의한 전염증성 cytokines 및 염증매개 단백질의 발현은 nuclear transcription factor-kappa-B (NF- κ B) 경로와 아울러 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성화 경로에 의해 조절된다고 알려져 있다. NF- κ B는 세포 분화, 염증반응, 세포 부착 등에 관련된 여러 유전자들의 발현에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이다 (Park *et al.*, 2008). NF- κ B는 모든 세포에 존재하며 정상 세포에서는 불활성 상태로 세포질에 존재하고 있다. 그러나 외부의 자극을 받아 활성화 되는 경우 핵으로 이동하여 다양한 유전자의 전사를 촉진한다 (Kierner *et al.*, 2003; Tak *et al.*, 2001). 지금까지 밝혀진 NF- κ B 단백질들은 Rel-domain를 함유하는 계열로 RelA, p6-50, RelB, c-Rel, p50 그리고 p52 등이 알려져 있다 (Chang *et al.*, 2001; Papa *et al.*, 2004). 이들 단백질은 서로 homo 혹은 hetero 형태로 결합하여 작용을 하게 된다. LPS나 TNF- α 등의 자극으로 tyrosine이나 serine/threonine kinases가 인산화 되고, 세포질에 존재하는 NF- κ B 복합체의 억제 구성요소인 inhibitor-kappa B (I- κ B)는 I- κ B kinase에 의하여 인산화 되어 단백질이 degradation 됨으로써 NF- κ B가 활성화 된다 (D'Acquisto *et al.*, 2002).

MAPK는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK kinase (p38) 그리고 stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinases (SAPK/JNK)로 구분 된다 (Kim *et al.*, 2006). ERK는 주로 세포의 증식, 분화 및 생존 등의 반응을 촉발시키는 성장인자에 의해 활성화 된다고 알려져 있으며, ERK의 지속적인 활성화는 종양형성에 관련된 세포 내 신호 전달계에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Kimura *et al.*, 1999). p38과 JNK는 여러 가지 스트레스에 의해 활성화되어 세포자연사에 관여하며 다양한 병리적 과정에

관련하는 것으로 알려져 있어 이들을 stress-activated protein kinase (SAPKs)라고도 한다 (Luo *et al.*, 2009).

개민들레 (*Hypochoeri radicata* L.)는 식물분류학상 국화과 (Compositae)에 속하며 잎은 로제트 형이고 줄기는 30~50 cm, 꽃은 5월~6월에 핀다 (Aarssen, 1981). 제주도에는 80년대 초 목초 종자와 혼합 유입되었으며 번식력이 왕성하여 제주도 전역으로 확산되어 자연생태계 교란이 우려되고 있다 (김, 1985). 세계적으로 개민들레는 해발 2,000 m까지 분포하고 있고 제주에서는 해발 1,700 m까지 분포하고 있다 (양, 2002; Harrington, 1954). 개민들레 추출물은 항산화 활성 (Fiasson *et al.*, 1991), 항암 활성 (Ferdinand, 1980), 미백 활성 (이 등., 2005), 항균 활성 (Maruta *et al.*, 1995) 등이 있다고 알려져 있지만, 항염증 활성에 대한 연구는 보도된 바 없다. 반면에 민들레 (*Taraxacum platycarpum* Dahlst.)의 경우 예로부터 민간에서 약재로 쓰이고 있을 뿐더러 약리작용에 대한 연구도 활발하게 이루어져 항 위염활성 (Kim *et al.*, 1991), 항산화 활성 (Kim *et al.*, 1994), 항 알레르기 활성 (Lee *et al.*, 2007), 항균활성 (Willoughby *et al.*, 1975), 함암 활성 (Lee *et al.*, 2004; Nathan *et al.*, 1994), 체내 지질대사 개선효과 (Alderton *et al.*, 2001) 등에 관한 연구가 보고되고 있다. 본 연구는 개민들레 추출물의 항염증 활성 기전을 분자 생물학적으로 조사함으로써 개민들레 추출물의 식의약 및 화장품 원료로서의 활용가능성을 탐색하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 추출 및 분획

본 연구에 사용된 시료는 서귀포시 남원읍 일대에서 2009년 5~6월에 채집한 개민들레와 서귀포시 대정읍 해안가에서 4~5월에 채집한 민들레 (꽃 부위만)를 사용하였다. 개민들레를 부위별 (잎, 줄기, 뿌리, 지상부, 전초)로 나누어 충분히 건조시키고 분쇄하여 각 부위별 분말 시료를 얻었다. 개민들레 부위별 추출물을 얻기 위해 분말 시료 4 g에 80% EtOH 70 mL를 첨가하여 실온에서 3일간 2회 추출하였다. 이렇게 얻은 추출물을 여과지를 이용해 여과 후 회전농축기로 농축하고 동결 건조하여 사용하였다.

개민들레의 꽃 부위는 시료 2 kg에 80% EtOH 30 L를 첨가하여 실온에서 3일간 2회 추출하였고 이를 여과, 감압농축, 동결 건조하여 사용하였다. 개민들레 꽃 부위의 80% EtOH 추출물 (5 g)을 물 (H₂O)에 현탁 시킨 후 에틸아세테이트 (Ethyl acetate), 물 순으로 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매분획을 각각 3회씩 반복 수행하여 분획층 (fraction)을 수득하였고 각 분획층을 감압농축, 동결건조 하여 에틸아세테이트 분획 0.80 g, 물 분획 3.32 g을 얻어 실험시료로 사용하였다. 또 민들레의 꽃은 분말 시료 2.7 g에 80% EtOH 300 mL를 첨가하여 실온에서 3일간 2회 추출하여 0.88 g을 얻었다. 시료는 실험에 사용하기 전 밀봉하여 냉동보관 (-20℃) 하였다.

2. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell을 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였으며, 1% antibiotic (Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2일에 한번씩 계대 배양을 실시하였다.

3. 세포 증식률 및 독성 측정

1) MTT 분석

시료가 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT 분석을 수행하였다. 대사가 왕성한 살아있는 세포는, 세포 내 mitochondria의 탈 수소효소작용에 의하여 수용성의 노란색인 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma, MO, USA)를 환원시켜 자주색을 띠는 비수용성 formazan을 형성 한다 (Gerlier *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1999).

RAW 264.7 cell를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 96 well plate에 넣고 18시간 배양 후 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시에 처리하고 24시간 배양하였다. 이후 MTT 용액 50 μ L를 첨가하여 4시간 동안 반응 시켰다. 배양배지를 완전히 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)를 200 μ L를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후, microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포생장률을 평가하였다.

2) LDH 분석

RAW 264.7 cell를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 24 well plate에 넣고 18시간 배양 후 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. lactate dehydrogenase (LDH) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심분리하여 얻은 배양 배지 50 μ L와 reconstituted substrate mix 50 μ L를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μ L의 stop solution을 넣고 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

4. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5

cells/mL로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 이후 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess 시약 100 μL 를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였고 sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 사용하였다.

5. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 24 well plate에 접종하고, 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/mL)로 조제된 시료 50 μL 와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유한 450 μL 의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min) 하여 얻어진 상층액의 PGE₂ 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 (-20°C) 하였다. PGE₂는 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

6. 전염증성 cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 24 well plate에 접종하고, 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/mL)로 조제된 시료 50 μL 와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유한 450 μL 의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min) 하여 얻어진 상층액의 전염증성 cytokine 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 (-20°C) 하였다. 전염증성 cytokines은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

7. Western blot analysis

RAW 264.7 cell를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 6 well plate에 18시간 배양 후 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포를 PBS를 이용해 2회 세척하고 lysis buffer [1 \times RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, Lake Placid, NY, USA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL pepstatin, and 1 μ g/mL leupeptin]를 이용해 1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 15 min) 하여 단백질 상등액 만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bio-Rad protein assay reagent를 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 8~12%의 polyacrylamid gel에 전기영동하고 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 200 mA, 2시간 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween 20/Tris-buffered saline (0.05% T/TBS)에 넣고 상온에서 1시간 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:5000, Calbiochem, USA), COX-2 antibody (1:1000, BD Biosciences Pharmingen, USA), phospho-ERK1/2 antibody, ERK1/2 antibody, phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody, SAPK/JNK antibody, phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182) antibody, p38 MAP kinase antibody, I κ B- α antibody, phospho-p105/p50 (1:1,000, Cell Signaling Tech, USA), β -actin antibody clone AC-74 (1:10,000, Sigma, USA)를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루 밤 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 0.05% T/TBS 용액으로 3회 세척 후 peroxidase-conjugated된 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:5,000 또는 1:10,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응한 뒤 0.05% T/TBS 용액으로 3회 세척하였다. 단백질은 Enhanced chemiluminescence (ECL) 방법을 이용해 X-ray 필름으로 결과를 확인하였다.

8. HPLC 및 UPLC / MS 분석

개민들레 EtOAc 분획물을 MeOH에 녹여 1 mg/mL의 농도가 되게 만들어 준 후 syringe filter로 여과하고 luteoiln (sigma) 성분을 high performance liquid chromatography (HPLC)로 측정하였다. HPLC 분석조건과 용매구배 조건은 Table 1A에 나타내었다. 표준품 luteoiln은 MeOH에 녹여 각각 10, 25, 50, 및 100 mg/mL의 농도로 제조하여 peak 면적을 구하고 회귀 방정식을 이용한 검량 선을 작성하여 정량하였다.

Ultra Performance Liquid Chromatography / Mass Spectrometry (UPLC / MS)은 Hypersil Gold (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm, C18) 컬럼을 사용하였고 이동 상으로는 (A) acetonitrile와 (B) 0.1% formic acid in H₂O를 사용하였으며 (A)를 5~100%로 8분간 기울기를 주며 200 μL/min 유속으로 흘려주었다. 결과는 LCQ-Fleet / Thermo 장비를 이용하여 분석하였다. ESI-Ion Trap MS 분석조건을 요약하면 Table 1B와 같다.

9. 통계처리

실험결과는 mean ± S.D.으로 나타냈으며 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

Table 1. HPLC and UPLC/MS conditions for luteolin analysis

A. HPLC conditions

Condition of HPLC				
Company	Waters 2695			
Column	Waters, Xterra® RP83.5 µm, 4.6 × 100 mm			
Mobile phase	(A) acetonitrile (B) H ₂ O			
UV detection	254 nm			
	Time	A	B	Flow
	(min)	(%)	(%)	(µL/mL)
	0	10	90	800
Gradient	30	50	50	800
	35	100	0	800
	40	10	90	800
	50	10	90	800

B. UPLC/MS conditions

Condition of UPLC				
Company	LCQ-Fleet			
Column	Hypersil Gold (2.1 mm × 50 mm, 1.8 µm, C18)			
Mobile phase	(A) acetonitrile (B) 0.1% formic acid in H ₂ O			
	Time	A	B	Flow
	(min)	(%)	(%)	(µL/mL)
	0	5	95	200
Gradient	1	5	95	200
	6	100	0	200
	8	100	0	200
	8.5	5	95	200
	12	5	95	200
Condition of Mass Spectrometer				
Company	Thermo			
Ion source	ESI			
Polarity	negative			
Spray voltage	5 KV			
Capillary temperature	275°C			
Capillary voltage	42 V			
Collision energy	35 eV			

III. 결 과

1. 개민들레 부위별 추출물의 항염증 활성

1) 개민들레 부위별 추출물의 세포 독성 측정

RAW 264.7 cell에 개민들레 각 부위별 (꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 지상부, 전초) 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 MTT와 LDH 분석을 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. 개민들레 부위별 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 90~100%의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (Figure 1A).

2) 개민들레 부위별 추출물의 NO 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell에 개민들레 각 부위별 (꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 지상부, 전초) 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 개민들레 부위별 추출물의 NO 생성 억제 활성을 측정한 결과, LPS 단독 처리군은 NO의 생성을 유도하였고, iNOS inhibitor인 2-amino-4-methylpyridine은 NO의 생성을 88% 억제함을 확인할 수 있었다. 개민들레 부위별 추출물 중에서는 개민들레 꽃 추출물이 LPS 단독 처리군과 비교해 볼 때 NO의 생성을 47% 억제하는 것으로 나타나 높은 NO 생성 억제 활성을 보였으며, 그 외 다른 부위 (잎, 줄기, 뿌리, 지상부, 전초)의 추출물에서는 NO 생성 억제 활성을 나타내지 않았다 (Figure 1B).

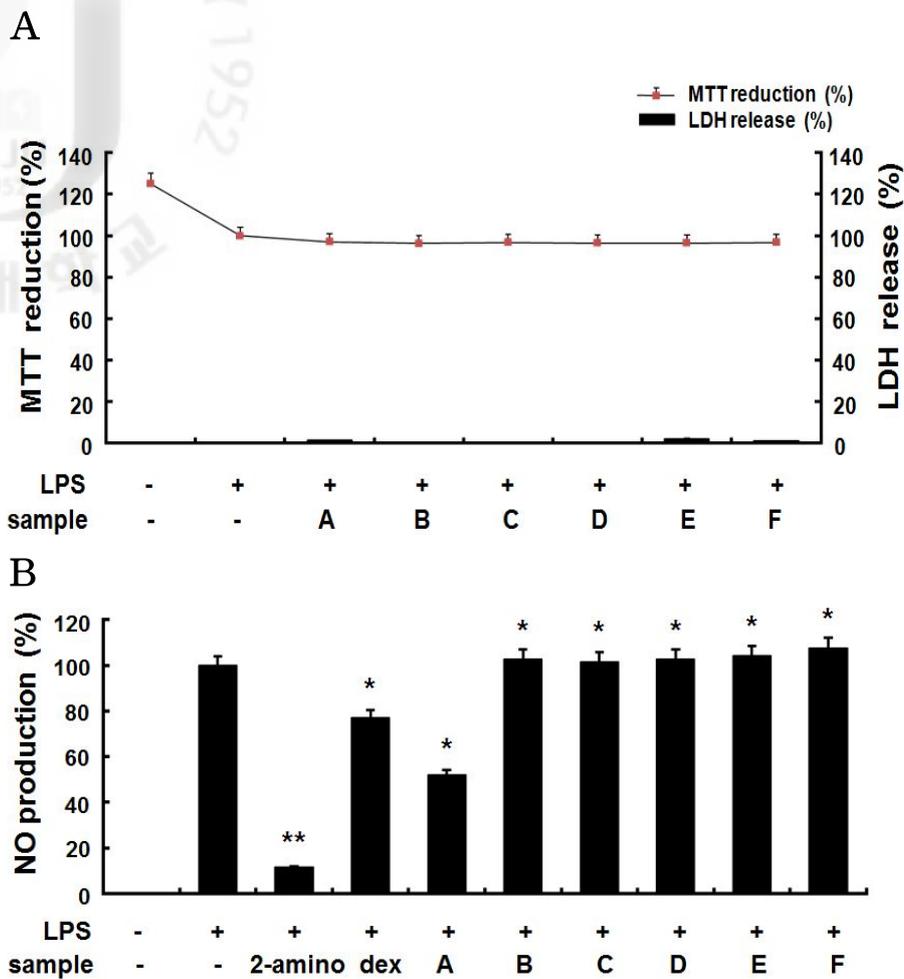


Figure 1. Effects of 80% EtOH extract of *H. radicata* L. on cytotoxicity and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and then cells were stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence of 80% EtOH extract of each part of *H. radicata* L. (100 μ g/mL A: flower; B: leaf; C: stem; D: root; E: aerial part; F: whole plant), 2-amino (10 μ M 2-amino-4-methylpyridine) and dex (20 μ M dexamethasone). (A) Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. (B) NO production levels. The data were expressed as means \pm S.D. of three determinations. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to positive control.

3) 개민들레와 민들레 꽃 추출물의 항염증 활성

(1) NO, PGE₂ 생성 억제 활성

먼저 LDH 분석을 통해 개민들레 꽃 (HRF)과 민들레 꽃(TPF) 추출물을 모두 400 µg/mL 농도 범위에서 세포독성을 갖지 않음을 확인하였다. 이를 바탕으로 RAW 264.7 cell에 LPS (1 µg/mL), HRF와 TPF 추출물을 100, 200, 및 400 µg/mL 농도로 처리하여 NO 생성 억제 활성을 알아보았다. 그 결과 LPS 단독 처리군에 비교했을 때 HRF와 TPF 추출물은 200 µg/mL 농도에서 각각 51%, 17%로 NO의 생성을 억제하였으며 400 µg/mL 농도에서는 82%, 48%로 억제하는 것으로 나타나 HRF 추출물이 TPF 추출물보다 강한 NO 생성 억제 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2A).

동일한 조건으로 PGE₂ ELISA kit를 이용하여 PGE₂ 생성 억제 활성을 확인한 결과, HRF 추출물은 LPS 단독 처리군과 비교했을 때 각각의 처리 농도에서 30%, 43%, 및 76%로 PGE₂의 생성을 억제하여 농도 의존적인 억제 효과를 확인할 수 있었다. 또한 TPF 추출물은 각각의 처리 농도에서 18%, 20%, 및 37%로 PGE₂의 생성을 억제하여 HRF 추출물이 TPF 추출물보다 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다 (Figure 2B).

(2) iNOS, COX-2 발현 억제 활성

HRF와 TPF 추출물에 의한 NO, PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2 발현 억제로 인한 것 인지 확인하기 위하여 이들 단백질 수준을 Western blot analysis로 확인하였다. RAW 264.7 cell에 LPS (1 µg/mL), HRF와 TPF 추출물을 100, 200, 및 400 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 배양한 후 HRF와 TPF 추출물에 의한 iNOS, COX-2 발현 억제 활성을 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서는 iNOS, COX-2의 발현이 현저히 증가하였고 HRF 추출물은 농도 의존적으로 iNOS, COX-2의 발현을 억제함을 알 수 있었다 (Figure 3A). 반면 TPF 추출물은 이들 단백질의 발현에 크게 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다 (Figure 3B).

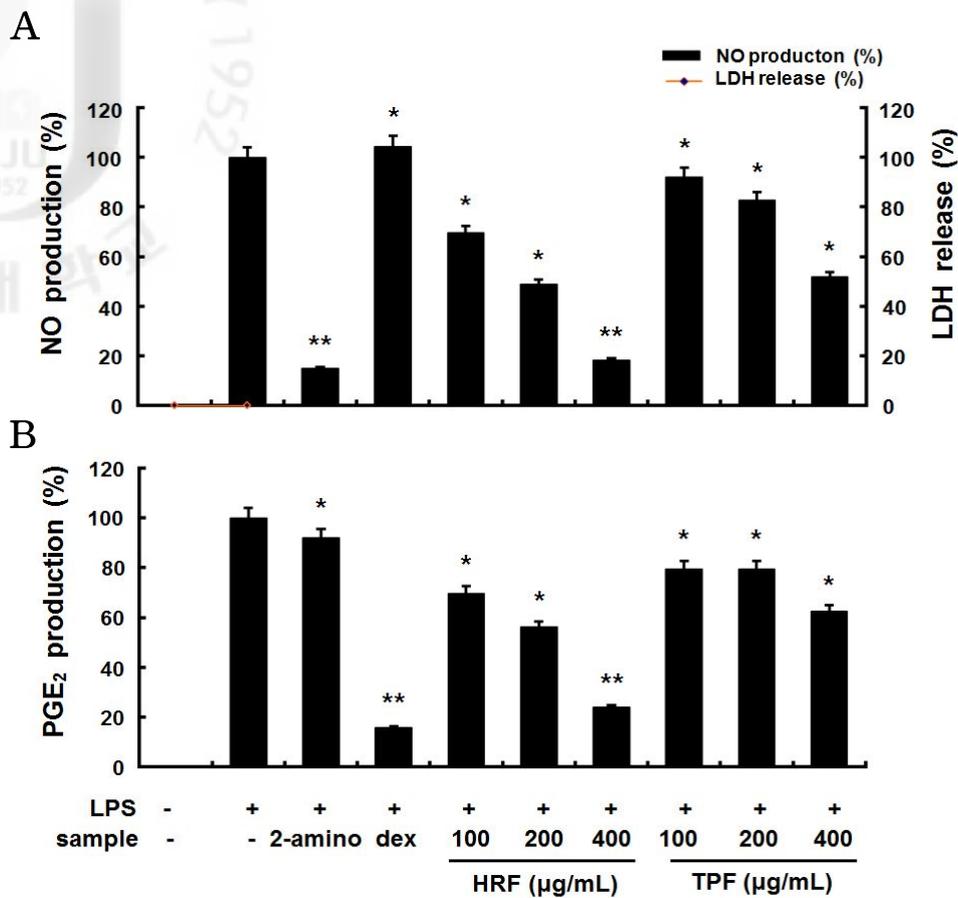
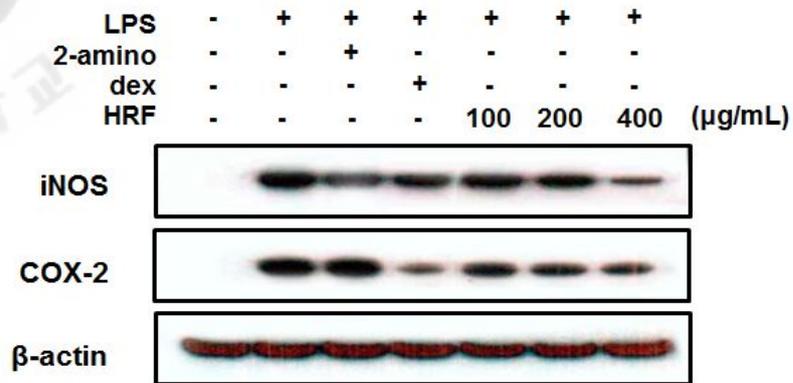


Figure 2. Effects of 80% EtOH extract of HRF and TPF on NO, PGE₂ production and cytotoxicity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and then cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of each 80% EtOH extracts (100, 200, and 400 µg/mL), 2-amino (10 µM 2-amino-4-methylpyridine), and dex (20 µM dexamethasone). (A) NO and (B) PGE₂ production levels. The data were expressed as means \pm S.D. of three determinations. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to positive control.

A



B

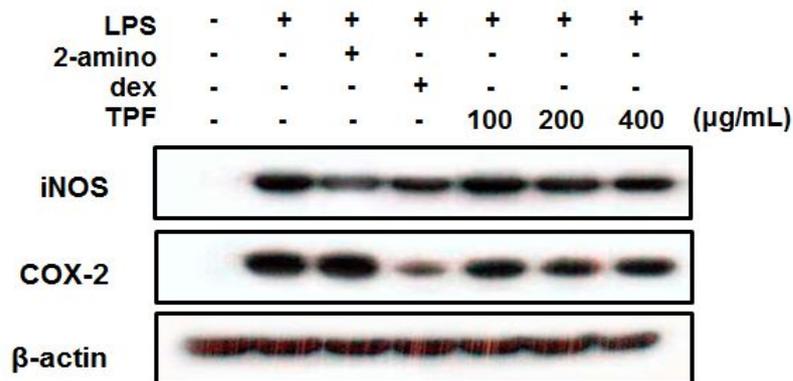


Figure 3. Effects of 80% EtOH extract of HRF and TPF on the protein level of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.0×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and then cells were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of each 80% EtOH extracts (100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$), 2-amino (10 μM 2-amino-4-methylpyridine) and dex (20 μM dexamethasone). The protein levels were determined using Western blot. 80% EtOH extract of (A) HRF and (B) TPF.

2. 개민들레 꽃 EtOAc 분획물의 항염증 활성

1) NO, PGE₂ 생성 억제 활성

항염증 활성이 가장 우수한 HRF 추출물을 다시 에틸아세테이트 (Ethyl acetate), 물 (H₂O)로 순차적으로 용매분획을 한 후 추출물과 분획물의 NO와 PGE₂ 생성 억제 활성을 알아보았다.

먼저 LDH 분석을 통해 HRF 추출물과 분획물 모두 50 µg/mL 농도 범위에서 세포독성을 갖지 않음을 확인하였고 이를 바탕으로 HRF 추출물과 분획물을 12.5, 25, 및 50 µg/mL 농도로 처리하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에 비해 HRF 추출물은 각각의 처리농도에서 3%, 7%, 및 14%의 NO 생성 억제 활성을 보였으며 EtOAc 분획물은 16%, 44%, 및 60%의 NO 생성 억제 활성을 보였다. 물 분획물은 NO 생성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다 (Figure 4A).

동일한 조건에서 PGE₂ 생성 억제 활성을 확인한 결과, EtOAc 분획물은 각각의 처리 농도에서 9%, 25%, 및 47%로 PGE₂의 생성을 억제시키는 것을 확인하였다 (Figure 4B). 따라서 HRF 추출물과 분획물 중에 EtOAc 분획물이 염증 억제 효과가 가장 우수하다고 판단되어 후속실험은 HRF EtOAc 분획물 (HRF-EA)에 대한 항염증 효능 평가를 수행하였다.

2) iNOS, COX-2 발현 억제 활성

HRF-EA에 의해 감소된 NO와 PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2 발현 억제가 그 원인임을 확인하기 위해 Western blot analysis로 세포질 내에서의 iNOS, COX-2 단백질의 발현량을 조사하였다.

RAW 264.7 cell에 LPS (1 µg/mL)와 HRF-EA를 12.5, 25 및 50 µg/mL 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 HRF-EA의 iNOS와 COX-2 발현 억제 활성을 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군은 iNOS, COX-2의 발현이 현저히 증가하였고 HRF-EA는 농도 의존적으로 iNOS, COX-2의 발현을 억제함을 확인하였다 (Figure 5).

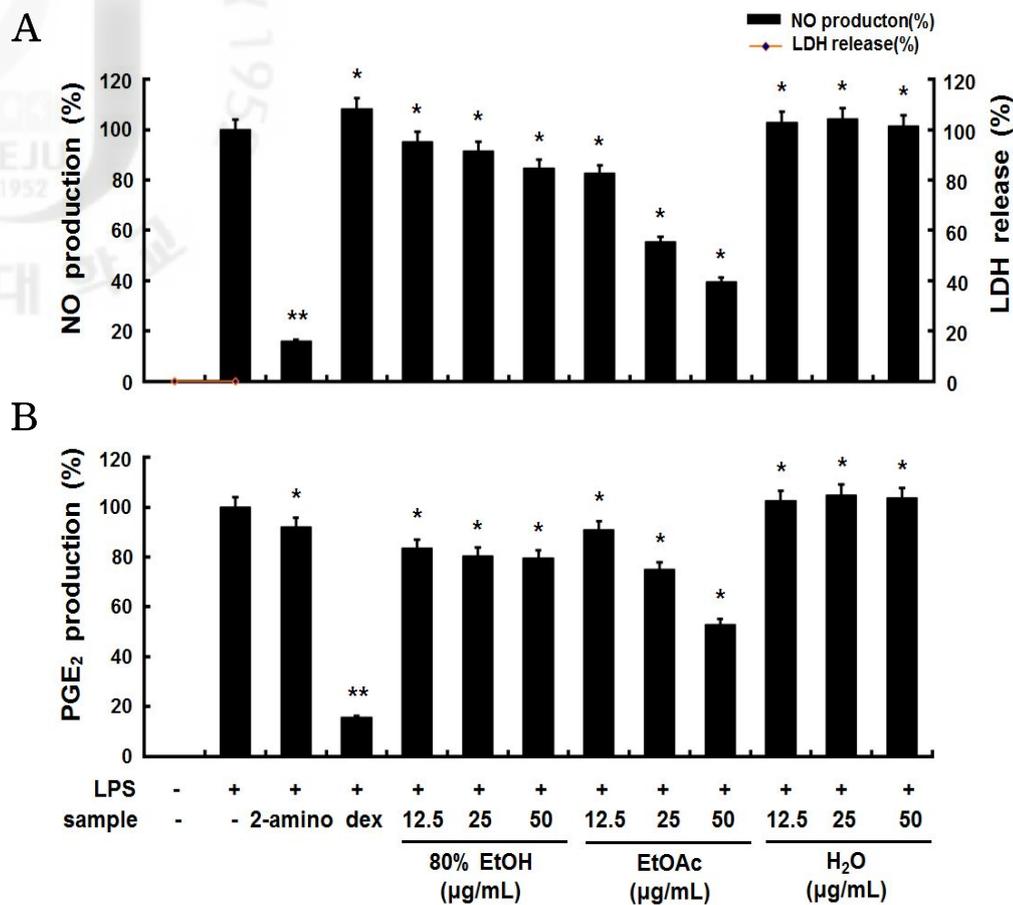


Figure 4. Effects of 80% EtOH extract and solvent fractions of HRF on NO, PGE₂ production and cytotoxicity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and then cells were stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions of *H. radicata* L. (12.5, 25, and 50 μ g/mL), 2-amino (10 μ M 2-amino-4-methylpyridine) and dex (20 μ M dexamethasone). (A) NO and (B) PGE₂ production levels. Cytotoxicity was determined using the LDH method. The data were expressed as means \pm S.D. of three determinations. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to positive control.

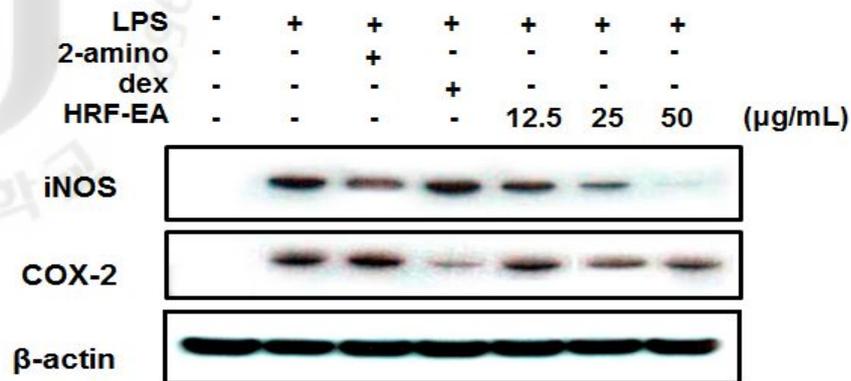


Figure 5. Effects of HRF-EA on the protein level of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.0×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and then cells were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of HRF-EA (12.5, 25, and $50 \mu\text{g/mL}$), 2-amino ($10 \mu\text{M}$ 2-amino-4-methylpyridine) and dex ($20 \mu\text{M}$ dexamethasone). The protein levels were determined using Western blot.

3) 전염증성 cytokines 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell에서 HRF-EA가 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, 및 IL-1 β 의 발현에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. RAW 264.7 cell에 LPS (1 μ g/mL)와 HRF-EA를 12.5, 25, 및 50 μ g/mL 농도로 처리하여 TNF- α , IL-6, 및 IL-1 β 의 생성 억제 활성을 확인한 결과 HRF-EA는 LPS 단독 처리군과 비교했을 때 각각의 처리 농도에서 TNF- α 의 생성을 49%, 58%, 및 61%, IL-6의 생성을 12%, 54%, 및 86% 그리고 IL-1 β 의 생성을 42%, 58%, 및 62%로 농도 의존적으로 유의하게 억제함을 확인하였다 (Figure 6).

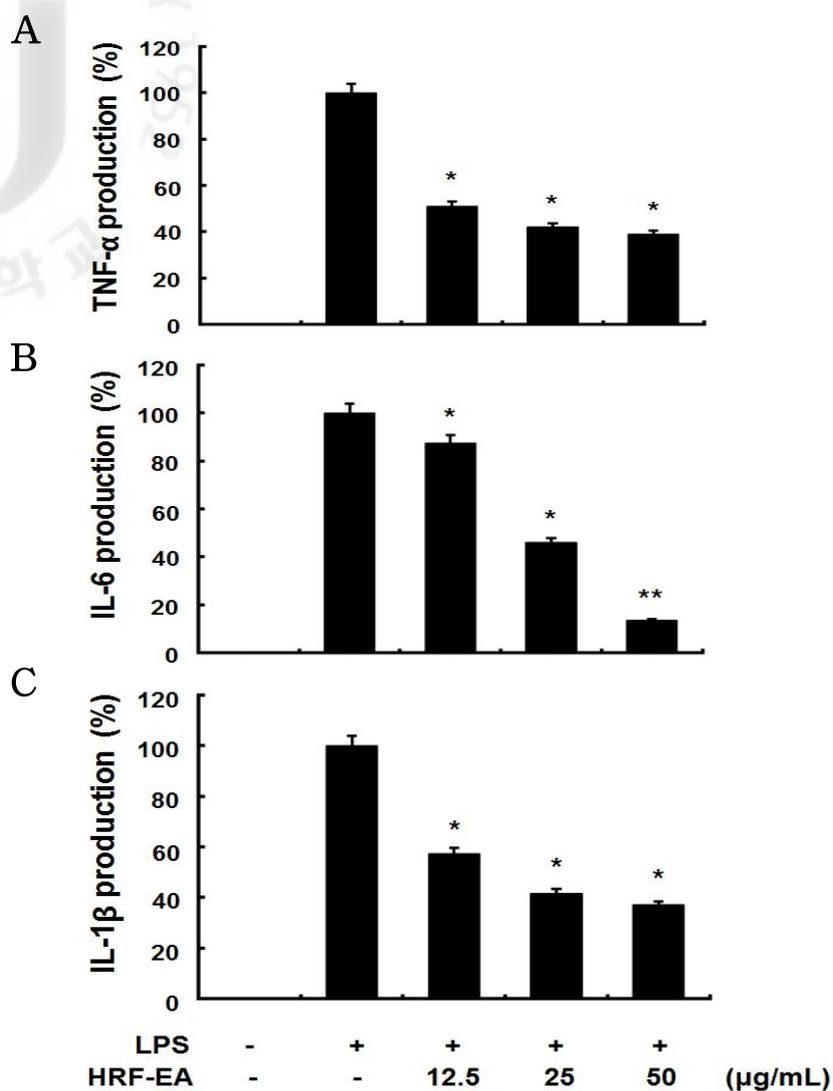


Figure 6. Effect of HRF-EA on production of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and then cells were stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence of HRF-EA (12.5, 25, and 50 μ g/mL). (A) TNF- α , (B) IL-6, and (C) IL-1 β production were analyzed by ELISA kit. The data were expressed as means \pm S.D. of three determinations. * P <0.05; ** P <0.01 compared to positive control.

4) I κ B- α degradation 억제 활성

HRF-EA가 I κ B- α 에 미치는 영향을 확인하기 위해 NF- κ B inhibitor인 PDTC를 10 μ M 농도로 RAW 264.7 cell에 처리하고 2시간 후에 LPS (1 μ g/mL)로 자극하였다. LPS 처리 10분, 20분, 30분 후 단백질을 분리하여 Western blot analysis로 I κ B- α 의 변화를 확인하였다. 그 결과 LPS 처리 후 10분에서 I κ B- α 가 가장 degradation 되었음을 확인할 수 있었으며, NF- κ B inhibitor인 PDTC는 LPS 단독 처리군에 비해 I κ B- α 의 degradation을 억제 시켰다 (Figure 7A). 이를 바탕으로 HRF-EA를 농도별 (12.5, 25 및 50 μ g/mL)로 처리하고 LPS 처리 후 10분에서 I κ B- α 에 미치는 영향을 확인한 결과, HRF-EA가 LPS 단독 처리군에 비해 I κ B- α 의 degradation를 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7B).

5) NF- κ B 인산화 억제 활성

NF- κ B의 활성을 억제하는 것은 염증반응을 억제하는 중요한 작용이 된다. HRF-EA가 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B 신호전달경로에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 NF- κ B inhibitor인 PDTC를 10 μ M 농도로 처리하고 2시간 후에 LPS (1 μ g/mL)로 자극하였다. LPS 처리 10분, 20분, 30분 후 단백질을 분리하여 Western blot으로 NF- κ B의 변화를 확인하였다. 그 결과 LPS 처리 후 10분에서 가장 높게 NF- κ B의 인산화가 일어나는 것을 확인할 수 있었으며 NF- κ B inhibitor인 PDTC는 LPS 단독 처리군에 비해 NF- κ B의 인산화를 억제 시켰다 (Figure 8A). 이를 바탕으로 HRF-EA를 농도별 (12.5, 25 및 50 μ g/mL)로 처리하고 LPS 처리 후 10분에서 NF- κ B에 미치는 영향을 확인한 결과, HRF-EA가 LPS 단독 처리군에 비해 NF- κ B 인산화를 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 8B).

A



B

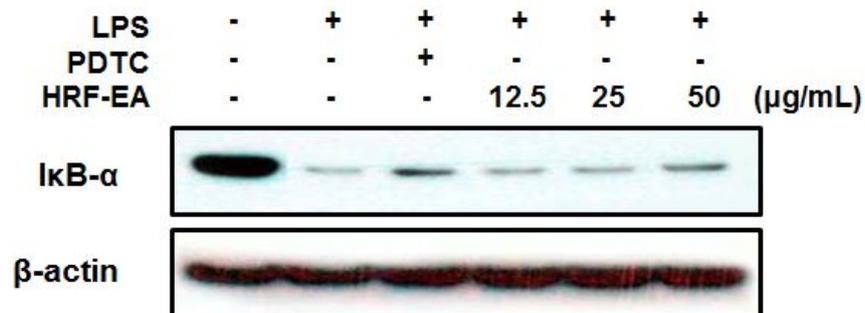
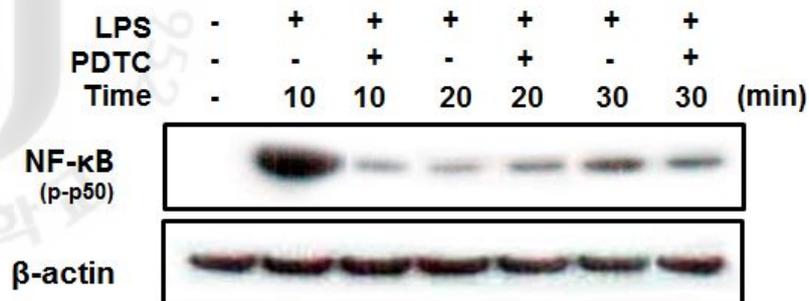


Figure 7. Effect of HRF-EA on the protein level of IκB-α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) Cells (1.5×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were incubated with PDTC (10 μM) for 2 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for indicated times. (B) Cells (1.5×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were treated with HRF-EA (12.5, 25, and 50 μg/mL) for 2 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 10 min. The protein levels were determined using Western blot.

A



B

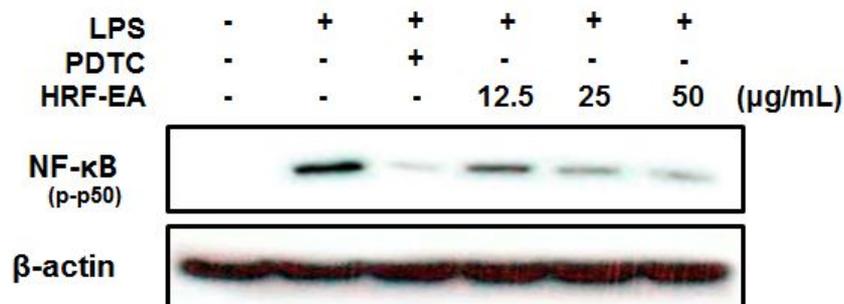


Figure 8. Effect of HRF-EA on the protein level of p50 NF-κB in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) Cells (1.5×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were incubated with PDTC (10 μM) for 2 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for indicated times. (B) Cells (1.5×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were treated with HRF-EA (12.5, 25, and 50 μg/mL) for 2 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 10 min. The protein levels were determined using Western blot.

6) MAPKs 인산화 억제 활성

HRF-EA가 LPS에 의해 유도되는 MAPKs 신호전달경로에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 p38 inhibitor인 SB203580를 10 μ M, JNK inhibitor인 SP600125을 20 μ M, 및 ERK inhibitor인 PD98059을 20 μ M의 농도로 처리하고 2시간 후에 LPS (1 μ g/mL)로 자극하였다. LPS 처리 10분, 20분, 30분 후 단백질을 분리하여 Western blot analysis로 phospho-p38, p38, phospho-ERK, ERK, phospho-JNK, 및 JNK을 확인하였다. 그 결과 LPS 처리 후 30분에서 p38, JNK, 및 ERK의 인산화가 최대로 되는 것을 확인할 수 있었으며 각각의 inhibitor는 LPS에 의해 유도되는 인산화를 효과적으로 억제시켰다 (Figure 9). 이를 바탕으로 HRF-EA를 농도별 (12.5, 25 및 50 μ g/mL)로 처리하고 LPS 처리 후 30분에서 MAPKs에 미치는 영향을 확인한 결과, HRF-EA는 농도 의존적으로 p38, JNK, 및 ERK의 인산화를 억제시켰다 (Figure 10).

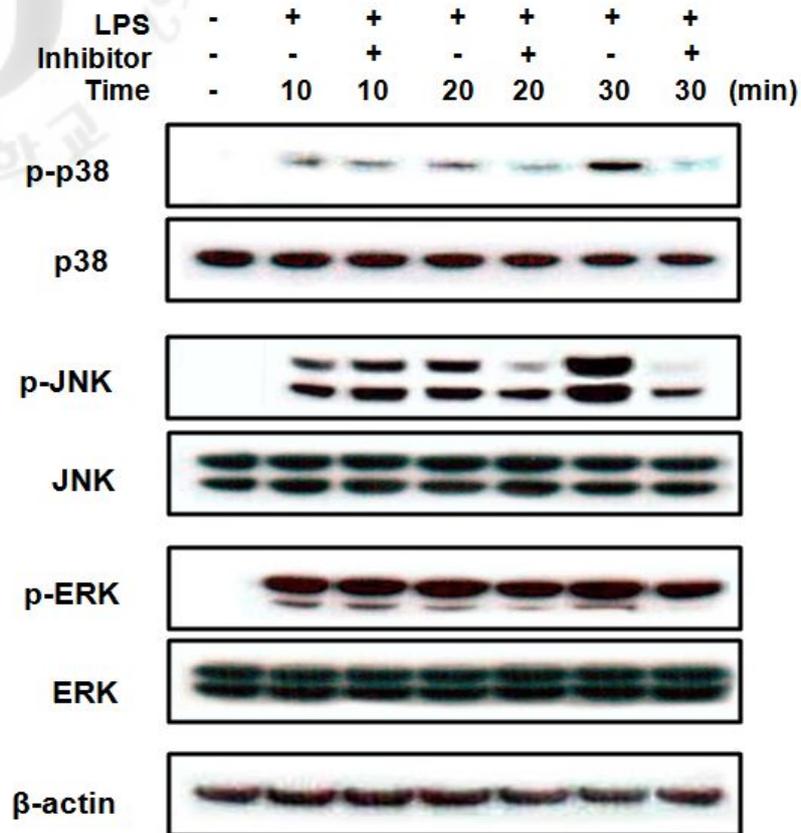


Figure 9. Effects of inhibitors on the protein level of p38, JNK and ERK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.5×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were incubated with each inhibitors of SB (10 μ M SB203580), SP (20 μ M SP600125) and PD (20 μ M PD98059) for 2 h and then stimulated with LPS (1 μ g/mL) for indicated times. The protein levels were determined using Western blot.

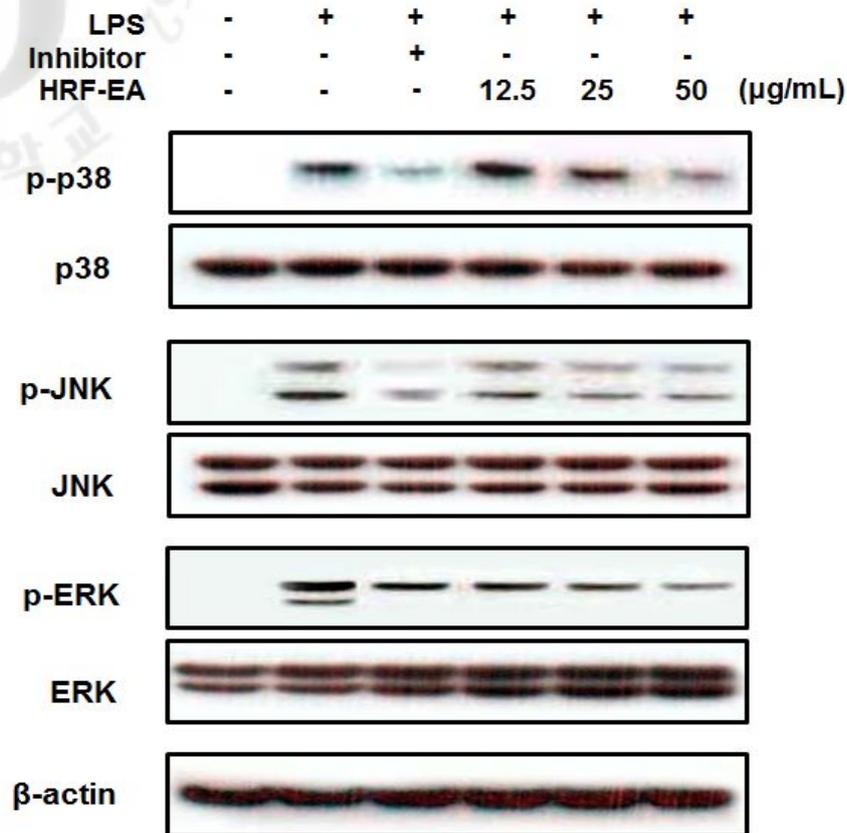


Figure 10. Effects of HRF-EA on the protein level of p38, JNK and ERK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells (1.5×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were incubated with HRF-EA (12.5, 25, and 50 µg/mL) and each inhibitors of SB (10 µM SB203580), SP (20 µM SP600125) and PD (20 µM PD98059) for 2 h and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 30 min. The protein levels were determined using Western blot.

7) 활성성분 [luteolin (3,4,5,7-tetrahydroxyflavone)] 함량 분석

현재 개민들레에 관한 성분 분석 연구는 보고된 바 없어 본 연구에서는 국화과 식물의 꽃에 많이 함유되어 있다고 보고된 quercetin, naringenin, luteolin, catechin 등의 플라보노이드 물질의 함량을 HPLC로 분석한 결과, 그중 luteolin이 HRF-EA에 함유되어 있음을 알 수 있었다. Figure 11A~D는 각각 luteolin과 HRF-EA, HRF 추출물 및 TPF 추출물의 크로마토그램을 나타낸 것이다. 그 결과 retention time과 스펙트럼을 비교해 볼 때, HRF-EA, HRF 추출물 및 TPF 추출물에 luteolin이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 또한 HRF-EA에 luteolin의 함유를 좀 더 정확히 알기 위해 UPLC/MS으로 분석하였다. 이는 표준용액을 바탕으로 ESI/Ion Trap MS를 negative mode에서 분석하여 $[M-H]^-$ 값과 이온화되었을 때의 fragment MS/MS의 값을 확인하였다.

Figure 12에서 보는 바와 같이 luteolin은 RT 5.31-6.06 (평균이온분포)에서 m/z 284.9 peak (Figure 12A, B)를 나타내었고, LC MS/MS로 m/z 284.9의 물질을 쪼갠 결과 Figure 12C에서 보는 바와 같이 m/z 150.9, 174.9, 198.9, 216.9, 256.9, 및 284.9에서 peak를 나타내었다. HRF-EA는 RT 5.35-5.65 (평균이온분포)에서 m/z 284.8 peak를 나타내었고 (Figure 12D, E), LC MS/MS로 m/z 284.8의 물질을 쪼갠 결과 Figure 12F에서 보는 바와 같이 m/z 150.9, 175, 198.9, 216.9, 240.9, 242.9, 257, 및 284.9에서 peak를 나타내었다. 따라서 HRF-EA와 luteolin의 retention time과 분자량이 일치하는 결과로 보아 HRF-EA에 luteolin이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 HRF-EA, HRF 추출물 및 TPF 추출물의 luteolin 함량을 확인하기 위해 HPLC로 정량을 하였다. luteolin을 10, 25, 50, 및 100 mg/mL이 되게 희석하고 HPLC의 크로마토그램에서 얻은 peak 면적을 이용해 회귀방정식을 구한 결과 HRF-EA는 약 70 mg/g, HRF 추출물은 약 29 mg/g, 및 TPF 추출물은 약 16 mg/g의 luteolin이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

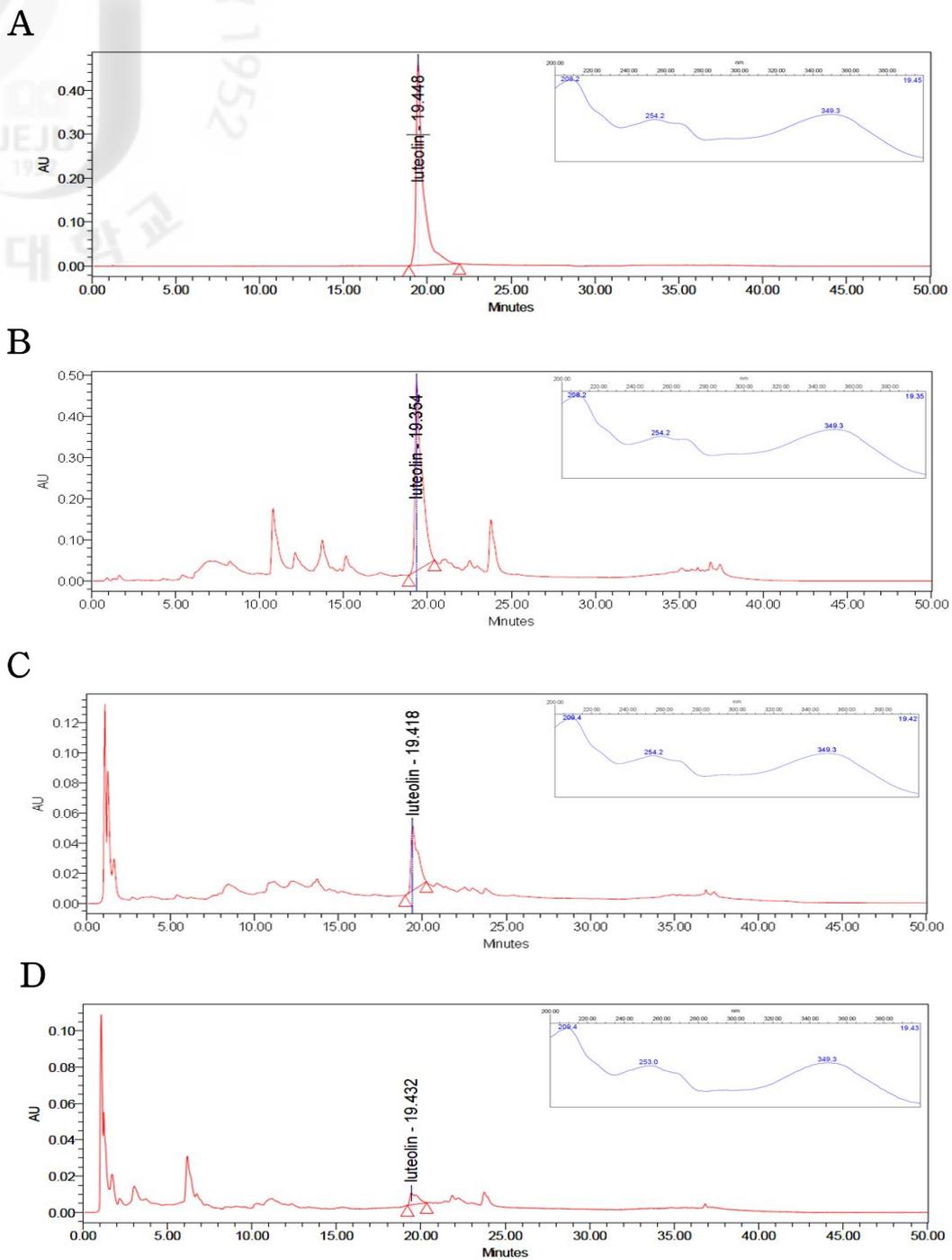


Figure 11. HPLC chromatogram of luteolin, HRF-EA, 80% EtOH extract of HRF and TPF. (A) luteolin, (B) HRF-EA, and 80% EtOH extract of (C) HRF and (D) TPF.

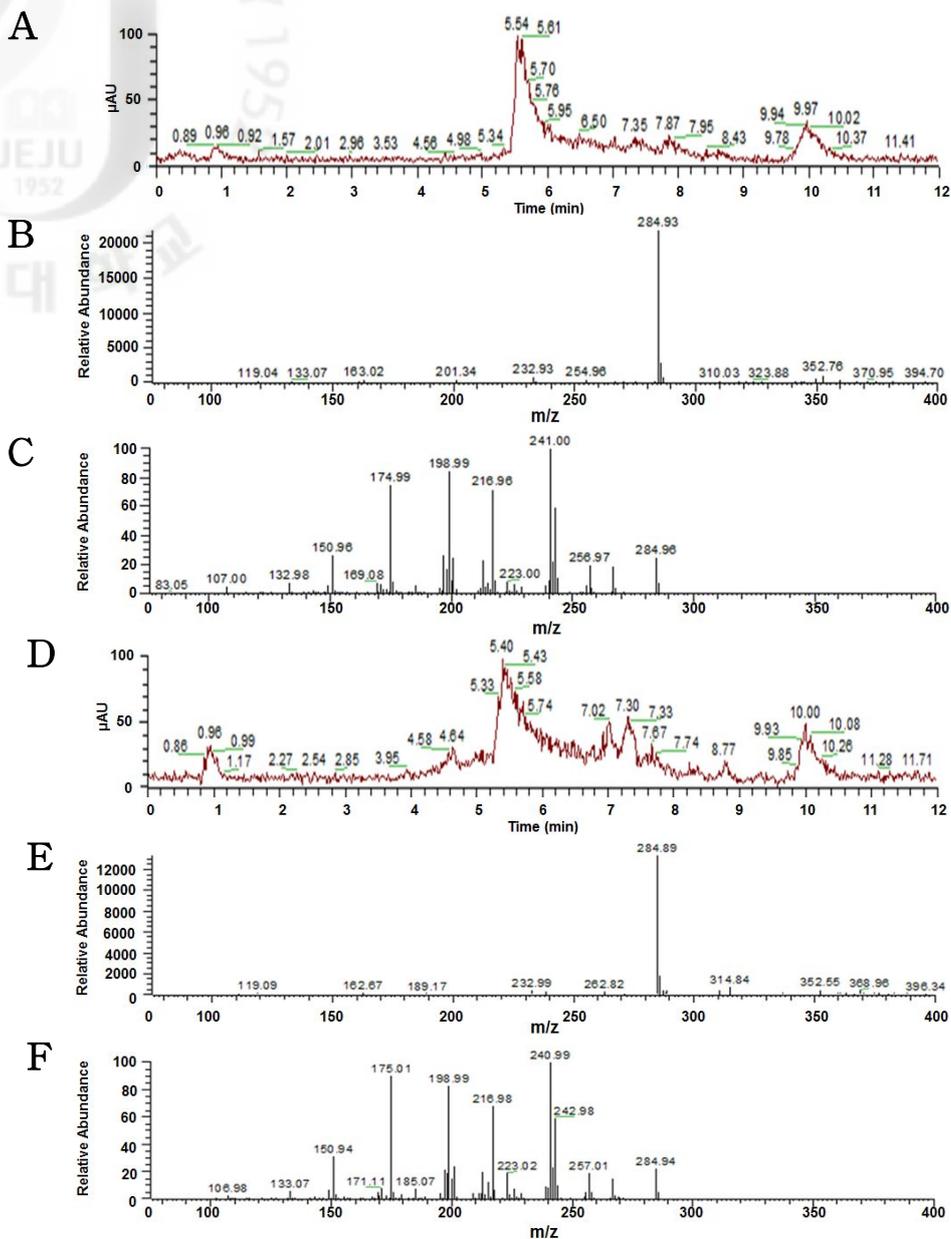


Figure 12. UPLC/MS of luteolin and HRF-EA. HPLC chromatogram of luteolin (A), precursor ions (B) and their corresponding fragments (C) obtained by UPLC/MS (negative mode) analyses chromatogram of the luteolin. HPLC chromatogram of the HRF-EA (D), precursor ions (E) and their corresponding fragments (F) obtained by UPLC/MS (negative mode) analyses chromatogram of the HRF-EA.

IV. 고 찰

개민들레는 식물분류학상 국화과 (Compositae)에 속하는 두해살이풀로 80년대 초 목초종자와 혼합되어 제주도에 유입되었고 번식력이 강하여 자연생태계 교란의 원인이 되고 있다. 개민들레 추출물은 항산화 활성 (Fiasson *et al.*, 1991), 항암 활성(Ferdinand, 1980), 미백 활성 (이 등., 2005), 그리고 항균 활성 (Maruta *et al.*, 1995)이 있다고 알려져 있으나 현재 항염증 활성에 대한 연구는 보고된 바 없다. 에 본 연구에서는 개민들레의 식 의약 및 화장품 원료로서의 활용가능성이 있는지를 평가하기 위하여 개민들레 추출물 및 분획물의 항염 활성을 분자생물학적으로 연구하였다.

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서의 염증매개인자의 연구는 염증반응을 연구하는 경우 빈용하는 실험모델로 (국 등., 2002) 확립되어 있으며, 대식세포를 LPS와 같은 TLR 리간드로 자극시키면 하위신호전달경로인 NF- κ B와 MAPKs가 활성화되어 NO 또는 PGE₂와 같은 염증성 인자들을 분비하고, 염증반응이 일어나게 된다 (Yeh *et al.*, 2011). 따라서 RAW 264.7 cell에서 개민들레 부위별 (꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 지상부) 추출물이 NO의 생성을 억제하는지 확인해 보았다. 그 결과 개민들레 꽃 추출물이 LPS 단독 처리군과 비교해 볼 때 NO의 생성을 47% 억제하는 것으로 나타나 높은 NO 생성 억제 활성을 보였으며, 그 외 다른 부위 (잎, 줄기, 뿌리, 지상부, 전초)의 추출물에서는 NO 생성 억제 활성을 나타내지 않았다. 다음으로 NO 생성 억제 활성이 가장 우수한 개민들레 꽃 (HRF) 추출물과 민들레 꽃 (TPF) 추출물과의 항염증 활성을 비교해 보았다. 먼저 NO와 PGE₂ 생성 억제 효과를 비교해 본 결과 HRF 추출물이 TPF 추출물보다 효과적으로 농도 의존적으로 유의하게 NO와 PGE₂ 생성을 억제함을 확인하였다. 염증성 인자인 NO와 PGE₂ 생성은 대식세포가 IFN- γ 또는 LPS 자극에 의해 발현된 iNOS와 COX-2에 의해 생성되기 때문에(Guzik *et al.*, 2003; Miyasaka *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 2011) HRF 추출물과 TPF 추출물의 iNOS, COX-2 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인한 결과 HRF 추출물이 TPF 추출물보다 iNOS와 COX-2의 유도 발현을 농도 의존적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 위의 결과

를 종합해보면 HRF 추출물이 TPF 추출물보다 iNOS와 COX-2의 유도 발현을 더욱 효과적으로 억제함으로써 NO와 PGE₂의 생성을 강력히 억제하였다는 것을 의미한다고 사료된다.

항염증 활성이 가장 우수한 HRF 추출물을 다시 에틸아세테이트 (Ethyl acetate), 물 (H₂O)로 순차적으로 용매분획을 한 후 각 분획물의 NO와 PGE₂ 생성 억제 활성을 알아보았다. 그 결과, LPS 단독 처리군에 비해 개민들레 꽃 에틸아세테이트 분획물(HRF-EA)이 가장 농도 의존적으로 유의하게 NO와 PGE₂의 생성을 억제하였으며 이를 뒷받침해주는 근거로 HRF-EA는 iNOS와 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다.

LPS 자극에 의해 증가되는 염증매개단백질의 발현조절에 핵심적인 역할을 하는 NF-κB는 일반적인 경우에 세포질에서 IκB와 결합하여 비 활성형으로 존재하지만, 특정 자극에 의해 NF-κB 신호전달체계가 활성화되면 IKK (inhibitor κB kinase)를 통해 IκB가 degradation 되면서 NF-κB가 핵으로 이동하여 COX-2, iNOS, Bcl XL, cIAPs 등의 전사를 유도하게 된다 (Ahn *et al.*, 2005; Grossman *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2005). 이와 관련해서 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell에서 생성되는 iNOS, COX-2 단백질 발현에 대한 HRF-EA의 발현 억제효과가 NF-κB 경로의 활성 억제에 대한 결과인지를 Western blot analysis로 확인해 보았다. 그 결과 HRF-EA는 농도 의존적으로 세포질내의 IκB-α degradation과 NF-κB (p50)의 인산화를 억제하였다. 따라서 HRF-EA는 IκB-α degradation을 함으로써 NF-κB 경로에 의해 활성화되는 염증 매개 인자들의 생성을 저해했음을 시사해 주고 있다.

또한 대식세포는 LPS 자극을 받게 되면 NF-κB 경로와 아울러 MAPK를 활성화하여 세포질이나 핵 내의 단백질을 조절한다. JNK inhibitor, p38 inhibitor를 처리하였을 때 LPS에 의해 유도되는 NO, TNF-α, 및 IL-1β의 생성이 억제되고 (Kwak *et al.*, 2005), ERK의 경우 특이적으로 IL-6 생성 억제에 관여한다고 보고되었다 (Ghazizadeh *et al.*, 2007). 이러한 보고를 바탕으로 HRF-EA가 MAPKs 인산화에 미치는 영향을 확인한 결과, LPS로 자극한 RAW 264.7 cell에서 HRF-EA는 p38, JNK, 및 ERK의 인산화를 농도 의존적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히 HRF-EA는 ERK와 JNK의 인산화를 강력히 억제하

였다. 이는 NO 그리고 TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6 생성을 강력히 억제했음을 시사해 주고 있다. 이는 HRF-EA가 JNK와 ERK의 인산화를 억제하여 NO, TNF- α , 및 IL-1 β , IL-6 생성을 강력히 억제했음을 시사해 주고 있다.

현재 개민들레에 관한 성분 분석 연구는 보고된 바 없으며 국화과 식물의 꽃에 많이 함유되어 있다고 보고된 quercetin, naringenin, luteolin, catechin 등의 플라보노이드 물질의 함량을 HPLC로 분석한 결과, HRF와 TPF 추출물 그리고 HRF-EA에 luteolin이 함유되어 있음을 확인하였고, UPLC/MS 분석을 통해 luteolin과 HRF-EA는 분자량과 retention time 모두 일치함을 확인할 수 있었다. 따라서 HRF-EA에 luteolin이 함유되어 있음을 알 수 있었고 HRF와 TPF 추출물 그리고 HRF-EA에 luteolin의 함량을 확인하기 위해 HPLC로 정량을 하였다. luteolin을 10, 25, 50, 및 100 mg/mL이 되게 희석하고 HPLC의 크로마토그램에서 얻은 피크면적을 이용해 회귀방정식을 구한 결과 HRF-EA는 약 70 mg/g, HRF 추출물은 약 29 mg/g, TPF 추출물은 약 16 mg/g의 luteolin이 함유되어 있음을 알 수 있었다. luteolin은 특히 셀러리, 카모밀 등에 많이 함유되어 있으며 (Kim *et al.*, 2003), 생리활성 연구로는 항염 활성 (Kimata *et al.*, 2000), 항암 활성 (Chowdhury *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2000), 항산화 활성 (Terashima *et al.*, 2011), 항알레르기 활성 (Kimata *et al.*, 2000) 등의 연구가 보고되어 있다. 따라서 앞의 결과에서의 HRF-EA에서 보인 항염증 효과 중 일부는 luteolin에 의한 것이며 HRF 추출물과 TPF 추출물의 염증 억제 활성은 luteolin 함량 차이에 의한 염증 억제 효과라 사료된다.

위의 결과들을 종합해본 결과, HRF-EA는 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 MAPKs (p38, JNK, 및 ERK)와 NF- κ B 활성을 차단함으로써 다양한 염증 매개 인자의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 이러한 항염증 효과 중 일부는 HRF-EA의 활성성분 중 하나인 luteolin의 의한 것이며 개민들레를 항염증 소재로 활용하기 위해서는 단일물질 수준의 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 참고 문헌

- Aarssen L.W. (1981) *Hypochoeris radicata* L. *Can, J Sci.* 61:365-381
- Ahn K.S., Aggarwal B.B. (2005) Transcription factor NF-kappa B: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci.* 1056:218-233
- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001) Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615
- Chang L., Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40
- Charles A.J., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2001) *Immunobiology*, 5th ed., Garland Publishing, New York. 70-71
- Chen F., Castranova V., Shi X. (2001) New insights into the role of nuclear factor-kappa B in cell growth regulation. *Am J. Pathol.* 159(2):387-397
- Chowdhury A.R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H.K. (2002) Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem. J.* 366:653-661
- D'Acquisto F., May M.J., Ghosh S. (2002) Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-kB) : An emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol. Interv.* 2:22-35
- Delgado A.V., McManus A.T., Chambers J.P. (2003) Production of tumor necrosisfactor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin-2, and interleukin -6 by

rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 37(6):355-361

Dubois R., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van De Putte L.B.A., Lipsky P.E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12:1063-1073

Ferdinand B., Rolf B. (1980) Three guaianolides from *Hypochoeris radicata* L, *Phytochemistry*. 9(19):2045-2046

Fiasson J.L., Gluchoff F.K., Mugnier C., Barghi N., Siljak Y.S. (1991) Flavonoid analysis of european species of the genus *Hypochoeris* (Asteraceae), *Biochem. Syst. Ecol.* 25:32-38

Gerlier D., Thomasser N. (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol Methods*. 94:57-63

Grossman B.J., Shanley T.P., Odoms K., Dunsmore K.E., Denenberg A.G., Wong H.R. (2002) Temporal and mechanistic effects of heat shock on LPS-mediated degradation of I κ B- α in macrophages. *Inflammation*. 26(3):129-137

Guzik T.J., Korbust R., Adamek-guzik T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol Pharmacol*. 54(4):469-487

Harrington H.D. (1954) *Manual of the plants of Colorado*. Sage Books. Denver. Colo. 666

Huang T.H., Tran V.H., Duke R.K., Tan S., Chrubasik S., Roufogalis B.D.,

Duke C.C. (2006) Harpagoside suppresses lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF-kappa B activation. *J. Ethnopharmacol.* 04:149-155

Jirik F.R., Podor T.J., Hirano T., Kishimoto T., Loskutoff D.J., Carson D.A., Lotz M. (1989) Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.* 142(1):144-147

Kiemer A.K., Hartung T., Huber C. and Vollmar A.M. (2003) Phyllanthus amarushasanti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappa B pathway. *J. Hepatol* 38:289-297

Kimata M., Inagaki N., Nagai H. (2009) Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reaction. *Planta. Med.* 66:25-29

Kimata M., Shichijo M., Miura T., Serizawa I., Inagaki N., Nagai H. (2000) Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin. Exp. Allergy.* 30:501-508

Kim J.H., Kim D.H., Baek S.H., Lee H.J., Kim M.R., Kwon H.J., Lee C.H. (2006) Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF-kappa B and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 71(8):1198-1205

Kim S.H., Shin K.J., Kim D., Kim Y.H., Han M.S., Lee T.G., Kim E., Ryu S.H., Suh P.G. (2003) Luteolin inhibits the nuclear factor-kappa B

transcriptional activity in Rat-1 fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* 15;66(6):955-963

Kimura A., Ohmichi M., Kurachi H., Ikegami H., Hayakawa J., Tasaka K., Kanda Y., Nishio Y., Jikihara H., Matsuura N. and Murata Y. (1999) Role of mitogen-activated protein kinase/ Extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res*, 59:5133-5142

Lai J.P., Lim Y.H., Su J., Shen H.M., Ong C.N. (2007) Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acid in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS. *J. chromatography B.* 848:215-225

Lee E.S., Ju H.K., Moon T.C., Lee E., Jahng Y., Lee S.H., Son J.K., Baek S.H., Chang H.W. (2004) 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.* 27:617-620

Lee H.H., Kim Y.S., Park H.Y. (2007) Plant regeneration via organogenesis from leaf explant culture of *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean J. Med Crop Sci.* 15:62-66

Lee J.L., Mukhtar H., Bickers D.R., Kopelovich L., Athar M. (2003) Cyclooxygenases in the skin : pharmacological and toxicological implications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192:294-306.

Lin J.H., Rogers. (1980) Acupuncture effects on the body's defense systems. *A veterinary Review. Vet. Bulle.* 50:633-640

Liu S.F., Malik A.B. (2005) NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290:L622-L645

Liu Y. (1999) Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. *prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 23:377-395.

Luoa Y., Liua M., Yaoa X., Xiaa Y., Daia Y., Choub G., Wangb Z. (2009) Total alkaloids from Radix Linderae prevent the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by suppressing NF- κ B and MAPKs activation. *Cytokine.* 46:104-110

Maruta Y., Fukushi Y., Ohkawa K., Nakanishi Y., Tahara S., Mizutani J. (1995) Antimicrobial stress compounds from *Hypochoeris radicata* L. *Phytochemistry.* 38(5):1169-1173

Mitra B, Saha A., Chowdhury A.R. , Pal C., Mandal S., Mukhopadhyay S., Bandyopadhyay S., Majumder H.K. (2000) Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.* 6:527-541

Miyasaka N., Hirata Y. (1995) Nitric oxide and arthmatic inflammation. *Immunol.* 16:128-130

Moncada S., Higgs E.A. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 9:1319-1330

Murakami A., Nishizawa T., Egawa K., Kawada T., Nishikawa Y., Uenakai K, Ohigashi H. (2005) New class of linoleic acid metabolites biosynthesized by corn and rice lipoxygenases: suppression of proinflammatory mediator expression via attenuation of MAPK and Akt, but not PPAR gamma, dependent pathways in stimulated macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 1;70(9):1330-1342

Nathan C., Xie Q.W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Bio. Chem.* 269(19):13725-13728

Newsome A.E., Noble I.R. (1986) Ecological and physiological characteristics of invading species. *In:* R.H. Groves and J.J. Burdon (eds.) *Ecology of Biological Invasions*. Cambridge Univ. 1-33

Papa S., Zazzeroni F., Pham C.G., Bubici C., Franzoso G. (2004) Linking JNK signaling to NF-kappa B : a key to survival. *J. Cell. Sci.* 117:5197-5208

Park S.J., Shin J.S., Cho W., Cho Y.W., Ahn E.M., Baek N.I., Lee T.K. (2008) Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by kaempferol-3-o-beta-D-sophoroside through the NF-kB inactivation in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 39(2):95-103

Rabson A., Roitt I.M., Delves P.J. (2005) *Really Essential Medical Immunology*. Blackwell publishing Ltd, Oxford. 1-14

Sik W.K., Yu J.S., Hwang I.G. (2008) Antioxidative Activity of Volatile Compounds in Flower of *Chrysanthemum indicum*, *C. morifolium*, and *C. zawadskii*. *J. Kor. soc. Food sci. Nutr.* 37(6):805-809

Smith W.L., Michael G.R., De-Witt D.L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271(52):33157-33160

Tak P.P., Firestein G.S. (2001) NF-kappa B: a key role in inflammatory diseases. *J. ClinInvest.* 107:7-11

Terashima M., Kakuno Y., Kitano N., Matsuoka C., Murase M, Togo N, Watanabe R, Matsumura S. (2011) Antioxidant activity of flavonoids evaluated with myoglobin method. *Plant Cell Rep.* 188-192

Tracey K.J., Wei K.R., Manogue Y., Fong D.G., Hesse H.T. (1988) Nguyen ;Cachecin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J. Exp. Med.* 167:1211-1227

Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 38:97-120

Willoughby D.A. (1975) Human arthritis applied to animal models- towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 34:471-478

Xue R., Miao Y.F., Yang J.C., Guan Y.F. (2011) Prostaglandin(PG) E₂ in regulation of immunity and inflammatory diseases. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.* 42(3):165-168

Yeh J.L., Hsu J.H., Hong Y.S., Wu J.R., Liang J.C., Wu B.N., Chen I.J., Liou S.F. (2011) Eugenolol and glyceryl-isoeugenol suppress LPS-induced iNOS expression by down-regulating NF-kappa B AND AP-1 through inhibition of MAPKs and AKT/I kappa B alpha signaling pathways in macrophages. *Int. J. Immunopathol Pharmacol.* 24(2):345-356

김문홍. (1985) 제주식물도감. 제주도청. p.438

손갑호, 김성훈. (1995) 시호, 인진의 간암세포에 대한 항암 활성 및 항암제와의 상승 작용. *대한한의학회지*. 16(2):414-432

양영환. (2003) 제주도귀화식물의 분포와 식생에 관한 연구. 제주대학교 박사학위논문. p108

양영환, 김문홍. (2002) 제주도 개민들레 군락지의 분포와 식생에 관한 연구. 제주도민속자연사박물관, 제주대학교 생명과학과. *Korean J. Plant. Res.* 15 (3) 228-230

이선주, 부희정, 이정아, 정덕상. (2005) 제주산 식물을 이용한 미백 기능성 화장품 원료에 대한 검색, *J. Soc. cosmet. Scientists korea*

VI. 요약

본 연구에서는 항염증 개선소재로서의 개민들레의 활용 가능성을 탐색하기 위하여 RAW 264.7 cell에서 개민들레 추출물의 항염증 활성을 연구하였다. 우선 개민들레 각 부위별 (꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 지상부, 전초) 80% 에탄올 추출물의 NO 생성 억제 활성을 분석하였다. 이 중 항염증 활성이 가장 우수한 꽃 추출물을 에틸아세테이트로 분획하여 개민들레 꽃의 에틸아세테이트 분획물 (HRF-EA)을 얻고 HRF-EA의 항염 작용을 분석하였다. HRF-EA는 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 염증성 매개체인 nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin E₂ (PGE₂), 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 cytokines (tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , 및 IL-6)의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 그리고 HRF-EA에 의한 iNOS와 COX-2 발현 억제 기전을 연구하기 위해 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 경로와 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 미치는 HRF-EA의 영향을 분석하였다. HRF-EA는 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 cell에서 I κ B- α degradation 억제와 p50의 인산화를 억제시킴으로 NF- κ B의 활성화를 억제시키는 것을 확인하였다. 또한 HRF-EA는 p38 MAPK kinase (p38), extracellular signal-regulated kinase (ERK), 그리고 c-Jun N-terminal kinases (JNK)의 인산화를 농도 의존적으로 감소시켰다. 이러한 결과들은 HRF-EA가 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 NF- κ B와 MAPKs의 활성화 억제를 통하여 항 염증성 효능을 나타냄을 시사하였다. 또한, 개민들레의 항염증 활성 성분을 동정하기 위하여 HRF-EA에 함유된 기지 화합물을 HPLC로 분석하였다. 그 결과, HRF-EA에는 lutein을 약 70 mg/g 포함하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 HRF-EA의 항염증 소재로서 활용 가능성을 제시해준다.