



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

RAW 264.7 cell에서 까마귀쪽나무
(*Litsea japonica*) 종자 초임계
추출물의 염증 억제 효과



제주대학교 대학원

응용생명공학과

송 상 목

2015년 2월

RAW 264.7 cell에서 까마귀쪽나무
(*Litsea japonica*) 종자 초임계
추출물의 염증 억제 효과

지도교수 이 동 선

송 상 목

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함



2015년 2월

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

송상목의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ ①

위 원 _____ ①

위 원 _____ ①

제주대학교 대학원

2015년 2월

Anti-inflammatory Activity on Supercritical
Extraction of *Litsea japonica* seed in Murine
Macrophage RAW 264.7 cells

Sang-mok Song

(Supervised by Professor Dong-Sun Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Biotechnology

February, 2015



제주대학교 중앙도서관

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

.....
Date

Department of Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

1. ABSTRACT

This study describes a preliminary evaluation of the anti-inflammatory activity of *Litsea japonica* seed. The supercritical extraction of *L. japonica* seed (LSSE) was obtained using supercritical carbon dioxide, and supercritical carbon dioxide extract (9.48% at 300 bar, 60°C) at concentration of 10 mg/mL. The LSSE dose-dependently inhibited the production of inflammatory markers [nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin E₂(PGE₂), and cyclooxygenase-2(COX-2)] and pro-inflammatory cytokines [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6] induced by LPS treatment. To further elucidate the mechanism of this inhibitory effect of LSSE, we studied LPS-induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) phosphorylation. LSSE inhibited the phosphorylation I κ B- α , NF- κ B and MAPKs in a dose dependent manner. These results suggest that the anti-inflammatory activity of LSSE results from its modulation of pro-inflammatory cytokines and mediators via the suppression of NF- κ B activation and MAPK phosphorylation. This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(SRAA).

CONTENTS

A B S T R A C T	I
C O N T E N T	II
LIST OF TABLES	IV
LIST OF FIGURES	V
1. 서론	1
2. 재 료 및 방 법	4
2.1. 까마귀쪽 나무 종자 시료의 에탄올 추출물 제조	
2.2. 까마귀쪽 나무 종자 시료의 초임계 추출물 제조	
2.3. 시약	
2.4. 세포배양	
2.5. 세포 독성 및 증식률 측정	
1) LDH 분석	
2) MTT 분석	
2.6. Nitric oxide(NO) 생성 억제 활성 측정	
2.7. Prostaglandin E ₂ (PGE) 생성 억제 활성 측정	
2.8. 전염증성 cytokines (TNF- α , IL-6) 생성 억제 활성 측정	
2.9. Western blot analysis	
2.10. 통계처리	
3. 결 과	9

- 3.1. 까마귀쪽나무 종자의 70% EtOH과 초임계 추출 수율(Yield)
- 3.2. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)과 70% EtOH 추출물(LSE)의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 비교
- 3.3. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 세포 독성 측정
- 3.4. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 PGE₂ 생성 억제 활성
- 3.5. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 iNOS, COX-2 발현 억제 활성
- 3.6. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 전염증성 cytokines 생성 억제 활성
- 3.7. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 NF-κB 작용기전 억제 활성
- 3.8. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 MAPKs 인산화 억제 활성

4. 고	찰-----	30
5. 참 고 문 헌	-----	32
6. 요 약	-----	38



LIST OF TABLES

Table 1. Yield variation of *Litsea japonica seed* extraction at depending on the percentage of EtOH.-----10

Table 2. Yield variation of *Litsea japonica seed* supercritical extraction at 60°C, 300bar-----10



LIST OF FIGURES

- Figure 1.** Supercritical fluid carbon dioxide extractor used in experiment-----4
- Figure 2.** Yield variation of *Litsea japonica* seed supercritical extraction at 60°C, 300bar -----10
- Figure 3.** Inhibitory effect of nitric oxide production on LSSE and LSE in RAW 264.7 cells. -----12
- Figure 4.** Cytotoxicity of LSSE on the viability of RAW 264.7 cells.-----14
- Figure 5.** Inhibitory effect of LSSE on PGE₂ production in RAW264.7 cells.--16
- Figure 6.** Inhibitory effects of iNOS and COX-2 protein level on LSSE in RAW 264.7 cells.-----18
- Figure 7-1.** Inhibitory effect of TNF- α production on LSSE in RAW 264.7 cells.-----20
- Figure 7-2.** Inhibitory effect of IL-6 production on LSSE in RAW 264.7 cells. -----21
- Figure 8-1** Inhibitory effect of I κ B- α protein level on LSSE in RAW264.7 cells. -----23
- Figure 8-2.** Inhibitory effect of P-65 protein level on LSSE in RAW264.7 cells.-----24

LIST OF FIGURES

- Figure 8-3.** Inhibitory effect of P-50 protein level on LSSE in RAW264.7 cells.-----25
- Figure 9-1.** Inhibitory effect of ERK protein level on LSSE in RAW264.7 cells.
-----27
- Figure 9-2.** Inhibitory effect of JNK protein level on LSSE in RAW264.7 cells.-----28
- Figure 9-3.** Inhibitory effect of P-38 protein level on LSSE in RAW264.7 cells.-----29



1. 서 론

염증은 생체조직에서 병원체의 침입이나 외부 자극에 대한 방어 반응 중 하나이다. 생체조직이 화학적, 물리적, 생물학적 자극에 의하여 손상되었을 때, 손상을 국소화시키고 원래의 상태로 회복시키려는 생체의 방어기전이다 (Rabson *et al.*, 2005). 자극이 가해지면 Serotonin, Histamine, Prostaglandin과 같은 혈관 활성 물질에 의해 혈관 투과성이 증대되면서 염증 반응이 일어난다(Song *et al.*, 2003). 대식세포 (macrophage)는 다양한 종류의 자극에 의한 염증 반응에 대하여 방어 작용과 숙주의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다(Higuchi M *et al.*, 1990). 대식세포에서 염증 반응이 일어날 때, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine들의 발현이 유도되고, inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 와 같은 염증인자가 생성된다(Stock M *et al.*, 1994; Moncada S *et al.*, 1991; Lee AK *et al.*, 2003). TNF- α , IL-6, IL- β 와 같은 염증매개인자들은 그람음성균의 세포외막에 존재하는 Lipopolysaccharide(LPS)에 의해 발현되며, LPS는 RAW 264.7 cell과 같은 대식세포 또는 단핵구(monocyte)에서 염증매개인자들의 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다(Willeaume V *et al.*, 1996). Nitric oxide(NO)는 반응성이 높은 특성을 가진 free radical로서 신경전달, 혈관 •면역 •혈압에 대한 항상성 유지 및 혈소판 응집 억제 등 생물학적인 차원에서 다양한 매개체 역할을 한다고 알려져 있다(Rho *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006). NO는 Nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성이 조절되며(Moeslinger *et al.*, 2006) NOS는 물리화학적 특성에 따라 endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS), inducible NOS(iNOS)의 세 가지 종류가 존재한다(Son *et al.*, 2006). 이들 중 nNOS는 신경계, 기관지, 위장의 내피세포에 존재하고, eNOS는 혈관내피 세포에 존재한다. 이 두 효소는 체내에서 일정 수준을 유지하면서 혈관확장, 신경세포 신호 전달 및 혈류 분포 조절 등 항상성 유지에 중요한 역할을 한다(Moncada S. *et al.*, (1995). 반면 iNOS는 interferon- γ (IFN- γ) 또는 LPS에 의해 자극을 받을 때 발현되어 다량의 NO를 생성한다(Guzik T.J. *et al.*, 2003; Miyasaka N., *et al.*, 1995). 과도하게 발현된 NO는 염증매개체의 생성을 촉진하여 조직의 손상, 폐혈성 쇼크, 유전자 변이,

류마티스 관절염, 자가면역 질환 등의 질병을 유발 시킬 수 있다(Jun *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2007; Blonska *et al.*, 2002). NO와 함께 대표적인 염증인자인 PGE₂ 는 발열과 통증에 주로 작용하는 매개체로서 면역반응과 염증반응에 관여한다. COX는 COX-1, COX-2와 같이 두 종류의 이성효소로 존재하며 서로 다른 유전자로부터 생성된다. COX-1은 인체 내부의 항상성 유지와 방어 작용에 관여하고 COX-2는 LPS 또는 interleukin-1(IL-1)의 자극을 통해 발현되며, 발현된 COX-2는 염증매개체인 PGE₂ 를 생성하여 지속적인 염증반응을 일으킨다(Dubois R *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1996). 염증인자 발현에 관여하는 염증매개체 작용 기전에는 nuclear transcription factor-kappa-B(NF-κB)와 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 두 가지 경로가 알려져 있다. NF-κB는 염증반응, 세포분화 및 면역반응에 필요한 유전자 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자 이다(Park *et al.*, 2008). NF-κB의 신호 전달 경로에 관여하는 여러 종류의 단백질 중에 대표적인 단백질은 p65와 p50이 있으며, 두 단백질은 동질 이형체를 이루어 존재한다(Nomura *et al.*, 2001). NF-κB는 모든 세포에 존재하며, 세포질 내에서 NF-κB복합체 억제 구성요소인 inhibitor-kappa-B (I-κB)와 결합하여 존재하다가 외부의 자극에 의해 I-κB가 인산화 되어 핵 내로 들어가 iNOS나 COX-2와 같은 염증매개체를 발현시키는 전사 인자로 작용한다(Rossi *et al.*, 2000). MAPK는 대표적으로 stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase(SAPK/JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK)와 p38 MAPK kinase(p38)가 있다 (Kim *et al.*, 2006). ERK의 활성화로 인해 종양을 형성하는 과정의 신호 전달계에 반응을 일으킴으로써 종양형성에 관여하는 세포의 증식과 분화를 촉진시킨다 (Kimura *et al.*, 1999). p38과 JNK는 다양한 스트레스에 의한 자극을 통해 활성화되어 병리적 과정에 관련된 세포의 분화와 사멸에 관여하여 stress-activated protein kinase(SAPKs)라고 하기도 한다 (Xia *et al.*, 1995).

까마귀쭝 나무(Litsea japonica Jussieu)는 녹나무과에 속하며, 한국의 제주도를 비롯한 일본 남부지방에 자생하고 있는 상록활엽소교목 이다. 까마귀쭝 나무(L. japonica)는 주로 해안가에 분포하고 있으며 바람이 많이 부는 제주도 해안가 등지에서는 방풍목으로 흔히 볼 수 있다. 잎은 녹색의 좁은 타원형이고 뒷면은 미세한 털이 백백이 자란다. 원뿔 모양의 꽃은 황백색이고 잎겨드랑이에서 자라며 자웅이 가화로 암나무와 수나무가 구분된다. 7월~10월 사이에 꽃이 피면 다음해 10월에 질

은 자주색 열매가 익지만 지역과 기후에 따라 6월경부터 익기도 한다(Min *et al.*, 2003). *L. japonica*는 구토, 설사, 두통(Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012; Jiménez-Pérez *et al.*, 2011) 및 중추신경계에 관련된 질병의 치료에 사용되었으며(Kim *et al.* 2013; Sohn *et al.*, 2013), 기존의 연구에서 다양한 종류의 물질이 발견되어 알려져 있다(Takeda *et al.*, 1972; Tanaka *et al.*, 1990). 앞에서 분리한 flavonoids 성분 중에 하나인 tiliroside는 인체의 anti-complement에 대해 억제 작용(Lee *et al.*, 2005)과 혈액 암 세포인 HL-60 cell의 세포사멸을 유도한다는 결과도 보고된 바가 있다(Kim *et al.* 2009). *L. japonica*의 열매는 과육과 종자로 이루어져 있으며, 최근 *L. japonica*의 과육에서 lactones계열의 Hamabiwa A와 Hamabiwa B의 분리를 통해, NF- κ B와 MAPK 경로의 JNK/p38 억제를 통한 진통 및 항염증 효과를 나타냈다(Koo *et al.*, 2014). 그러나 열매의 과육은 총 비중의 40% 정도에 그치며 나머지를 이루고 있는 종자에 대한 연구는 이루어지지 않고 버려지고 있다. 또한, 이전까지 진행 되어온 연구에서는 *L. japonica*의 유효성분을 추출하기 위해 용매구성물의 혼합비율을 통한 용해도의 차이를 이용하는 추출법이 사용되어 왔다. 그러나 대부분의 천연유효 성분은 불안정하거나 복잡한 구조를 가지고 있어 천연유효성분의 효율적인 추출이 어렵고, 이전 용매추출을 통하여 추출된 천연물의 유효성분은 높은 비등점으로 인해 고온에서 유효성분이 분해되거나 파괴되기 쉽다는 단점이 있으며, 추출과정에서 천연물의 유효성분이 용매에 잔존할 가능성이 있기 때문에 용매 추출법이 아닌 초임계 유체를 이용한 초임계 추출을 통하여 *L. japonica*의 종자를 추출하였다. 초임계 추출은 어떤 물질의 임계점을 초월하는 온도와 압력 조건에서 기체와 액체의 중간상태인 초임계 유체의 특성을 이용하여 추출하는 추출법이다(Mc Hugh *et al.*, 1986). 초임계 추출법은 온도와 압력의 변화를 연속적으로 변화시켜 확산계수, 용해도 및 점도 등의 조건을 조절하기 쉽고(Cho *et al.*, 2004), 저온에서 조작성이 가능하여 열에 약한 물질의 추출이 쉽다. 또한, 높은 확산계수와 낮은 점도의 특성을 나타내어 기존의 용매 추출에 비해 높은 추출 수율을 얻을 수 있다(Kiran *et al.*, 1994). 초임계 유체 추출에 널리 사용되는 이산화탄소는 임계 온도와 압력이 낮아 순한 조건으로 추출물을 얻을 수 있고, 물질과의 반응성이 거의 없다(Kim *et al.*, 2003). 따라서 본 연구에서는 초임계 유체 추출을 통한 *L. japonica* 종자를 추출하였고, 염증성 질환에 대한 활용 가능성을 확인하기 위하여 murine macrophage RAW 264.7 세포내 염증성 인자들의 억제 효과를 조사하였다.

2. 재 료 및 방 법

2.1. 까마귀쪽 나무 종자 시료의 에탄올 추출물 제조

본 연구에 사용된 시료는 서귀포시 해안가 일대에서 2014년 6~7월에 채집한 까마귀쪽 나무열매를 과육과 종자로 분리하여 열풍건조기(40℃)에서 약 48시간 건조시킨 후 분쇄하여 분말 시료를 얻었다. 분쇄된 까마귀쪽나무 종자의 분말 시료 400g을 70% EtOH에 침적하고 24시간동안 교반하여 침출시킨 용매를 감압여과 장치를 통해 여과하고 얻어진 여액을 감압 농축 후 동결 건조하여 얻어진 추출물을 통하여 실험을 진행하였다.

2.2 까마귀쪽 나무 종자 시료의 초임계 추출물 제조

까마귀쪽나무 종자 분말 시료 400g을 초임계 추출기의 추출조에 넣어 반응기의 온도 60℃와 압력 300 bar 의 조건으로 맞춰서 4시간 동안 추출 하여 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물을 얻은 후 실험에 사용하였다. 추출에 사용된 초임계유체 추출기는 아주대학교 초임계연구소에서 제작하였고 모델명은 SFE0305R1으로 제주테크노파크 생물종다양성연구소에 설비되어져 있다(Figure 1).



Figure 1. Supercritical fluid carbon dioxide extractor used in experiment

2.3. 시약

세포 계대 배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지와 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (Grand Island, USA)에서 구입하였고, lipopolysaccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4)는 sigma (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. IL-6 정량을 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D System (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Western blot을 위한 Antibody (I κ B- α , phospho-NF- κ B (p65), p38, ERK 1/2, phospho-ERK 1/2, JNK 1/2 와 phospho-JNK 1/2)는 모두 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였고, phospho-p38 은 BD Biosciences (San Diego, USA)로부터 구입하였다. 모든 시약은 sigma등급의 시약을 사용하였다.

2.4. 세포배양

한국 세포 주 은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입한 Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin(Gibco, USA)을 포함하는 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) high glucose medium배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고 3일에 한번씩 계대 배양을 실시하였다.

2.5. 세포 독성 및 증식률 측정

1) LDH 분석

10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1.8×10^5 cell/ml로 넣고 18시간 배양 후 시료와 LPS (1 μ g/ml)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 측정했으며, 96well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50uL와 reconstituted substrate mix 50 uL를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50uL의 stop solution을 넣고 microplate reader(Bio-TEK)를 사용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

2) MTT 분석

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/ $m\ell$ 로 96 well plate에 넣고 24시간 배양 후 시료를 처리하고 24시간 배양하였다. 이후 MTT 용액 50uL를 첨가하여 4시간 동안 반응 시켰다. 배양배지를 완전히 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)를 200uL를 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.

2.6. Nitric oxide(NO) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/ $m\ell$ 로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 그다음 시료와 LPS ($1 \mu\text{g}/m\ell$)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 uL와 Griess 시약 100 uL를 96well plate에서 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethyldiamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였고 sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 사용하였다.

2.7. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/ $m\ell$ 로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 ($1 \text{ mg}/m\ell$)로 조제된 시료 50 uL와 LPS ($1 \mu\text{g}/m\ell$)를 함유한 450 uL의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (1,200 rpm, 3min)하여 얻어진 상층액의 PGE₂ 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 (-20°C) 하였다. PGE₂ 는 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

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

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/ $m\ell$ 로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/ $m\ell$)로 조제된 시료 50 μ L와 LPS (1 μ g/ $m\ell$)를 함유한 450 μ L의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (1,2000 rpm, 3min)하여 얻어진 상층액의 전염증성 cytokine 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 (-20 $^{\circ}$ C) 하였다. 전염증성 cytokine은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

2.9. Western blot analysis

RAW 264.7세포 (5.0 X 10⁵ cell/ $m\ell$)를 18시간 전 배양한 후, 시료와 LPS (1 μ g/ $m\ell$)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후 200 μ g의 lysis buffer [50 mM Tris-HCL (pH7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1mM phenylsulfonyl fluoride, 25 μ g/ $m\ell$ aprotinin, 25 μ g/ $m\ell$ leupeptin]를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분~1시간 동안 lysis시킨 후 15,000 rpm 에서 15분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μ g의 lysate를 10~12% mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD, HC, USA)에 200 v로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 bloking 처리는 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 overnight 하였다. iNOS의 발현 양을 확인하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS(1:1000) (Santa-Cruz)을 TTBS용액에 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 4회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Vector Laboratories, Burlingame, USA)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 4회 세정한다. I κ B-a, phosphor-NF- κ B (P65), P38, ERK 1/2, JNK

1/2의 발현 양을 확인하기 위한 항체로는 anti-rabbit (1:1000)을 TTBS용액에 희석하여 4℃에서 overnight한다. 2차 항체로는 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 4회 세정한다. 반응이 완료된 membrane을 ECL 기질 (Intron Biotechnology, Inc, Korea)과 1분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광 하였다.

2.10. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 ± 표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.



3. 결 과

3.1. 까마귀쪽나무 종자의 70% EtOH과 초임계 추출 수율(Yield)

LSSE 분말 시료 400g을 70% EtOH과 초임계 추출을 통하여 추출한 결과, 70% EtOH에 24시간 동안 침적시킨 후 얻은 추출물의 양은 34.4g 으로 8.6%의 추출 수율을 알 수 있었고, EtOH의 비율 변화에도 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다 (Table 1).

초임계 추출물은 300bar, 60℃의 조건으로 4시간 동안 추출 했을 때, 37.92g의 추출 물을 얻어 9.48%의 추출 수율을 확인 할 수 있었다. 초임계 추출은 시간의 변화에 따라 추출물의 수율이 증가하고 3시간 내외에서 추출평형 상태에 도달하는 것을 확인 할 수 있었다. 초임계를 통한 추출은 24시간 동안 추출한 EtOH추출에 비해서 시간 대비 뛰어난 추출 수율을 나타내는 것을 확인하였다(Table 2, Figure 2).



Table 1. Yield variation of *Litsea japonica seed* extraction at depending on the percentage of EtOH.

EtOH(%)	60	70	80
Yield(%)	8.23	8.6	8.56

Table 2. Yield variation of *Litsea japonica seed* supercritical extraction at 60°C, 300bar

Time(min.)	30	60	90	120	150	180	210	240
Yield(%)	3.14	5.52	6.91	7.89	8.84	9.45	9.48	9.48

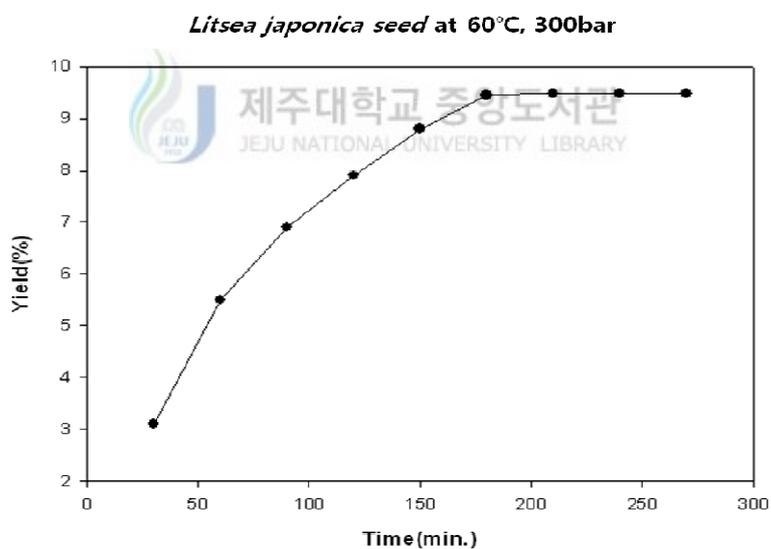


Figure 2. Yield variation of *Litsea japonica seed* supercritical extraction at 60°C, 300bar

3.2. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)과 70% EtOH 추출물(LSE)의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 비교

LPS 로 유도된 Raw 264.7 cell에서 추출물의 NO 생성 저해능을 확인하기 위하여 LSSE, LSE (10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. LSSE와 LSE의 NO 생성 억제 활성을 각각 측정한 결과, LPS 단독 처리군은 NO의 생성을 유도하였으며, 같은 농도의 샘플을 처리하였을 때, LSSE를 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 NO의 생성 억제 활성을 보이는 반면, LSE를 처리한 실험군은 NO의 생성 억제 활성에 대한 효과가 떨어지는 것을 확인 하였다 (Figure 3).



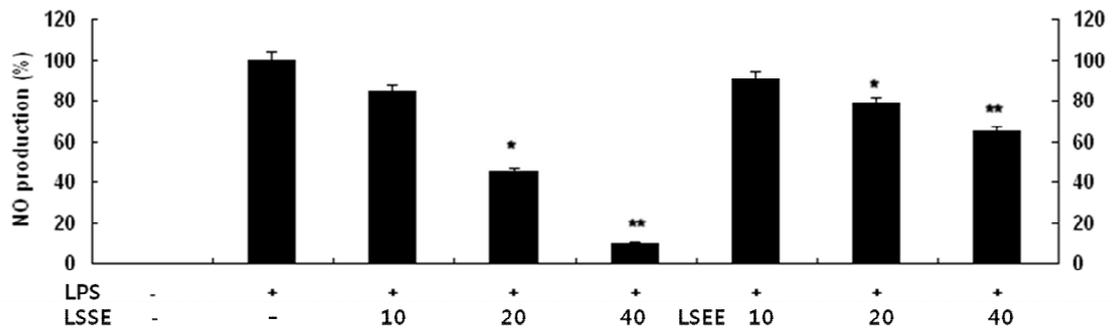


Figure 3. Inhibitory effect of nitric oxide production on LSSE and LSE in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24h in the presence of LSSE and LSE(10, 20, and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

3.3. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 세포 독성 측정

RAW 264.7 cell에 LSSE(10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)를 동시 처리하여 24 시간 배양한 후 MTT와 LDH 분석을 통해서 세포 생존율을 확인하였다. LSSE는 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 농도에서 87~100%의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (Figure 4).



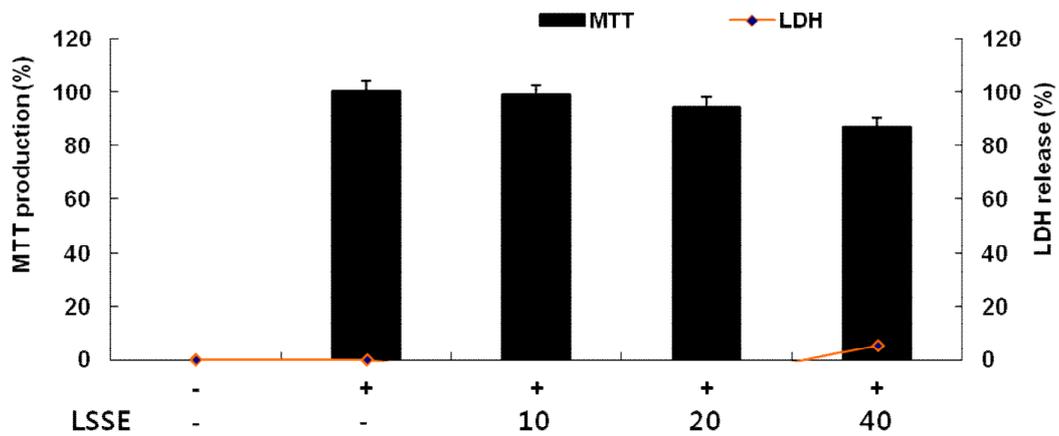


Figure. 4. Cytotoxicity of LSSE on the viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.8×10^5 cells/ml) plated on 96-well plates were treated with aliquots of LSSE at 37°C for 24 h. Cytotoxicity of LSSE was assessed by MTT and LDH assays. Values are expressed as means \pm S.D. of triplicate experiments. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments.

3.4. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 PGE₂ 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell에 LSSE(10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)를 동시 처리하여 24 시간 배양한 후 PGE₂ ELISA assay kit를 이용하여 PGE₂ 생성 억제 활성을 확인한 결과, LPS단독 처리군에 비해 농도 의존적으로 PGE₂ 가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5)..



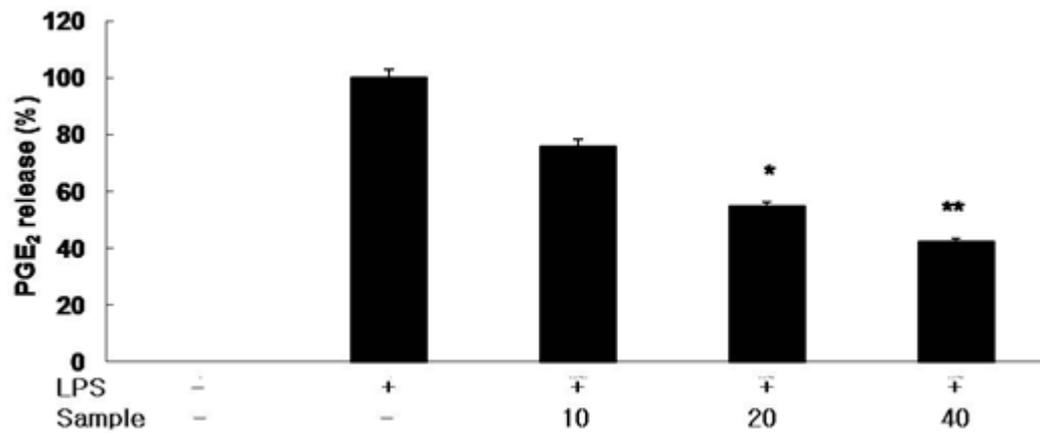
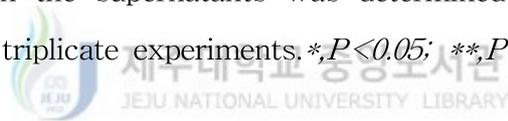


Figure 5. Inhibitory effect of LSSE on PGE₂ production in RAW264.7 cells. Cells(1.8×10^5 cells/ml) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24h in the presence of LSSE (10, 20, and $40 \mu\text{g/ml}$) Supernatants were collected, and the PGE₂ concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$



3.5. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 iNOS, COX-2 발현 억제 활성

LSSE에 의한 NO, PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2의 발현 억제로 인한 것 인지 확인하기 위하여 이들 단백질 수준을 Western blot analysis로 확인하였다. RAW 264.7 cell에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$), LSSE를 10, 20 및 40 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 농도로 처리하여 24시간 배양한 후 iNOS, COX-2의 발현 억제 활성을 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군 에서는 iNOS, COX-2의 발현이 현저히 증가하였고 LSSE 처리군 에서는 농도 의존적으로 iNOS, COX-2의 발현을 억제함을 알 수 있었다 (Figure 6).



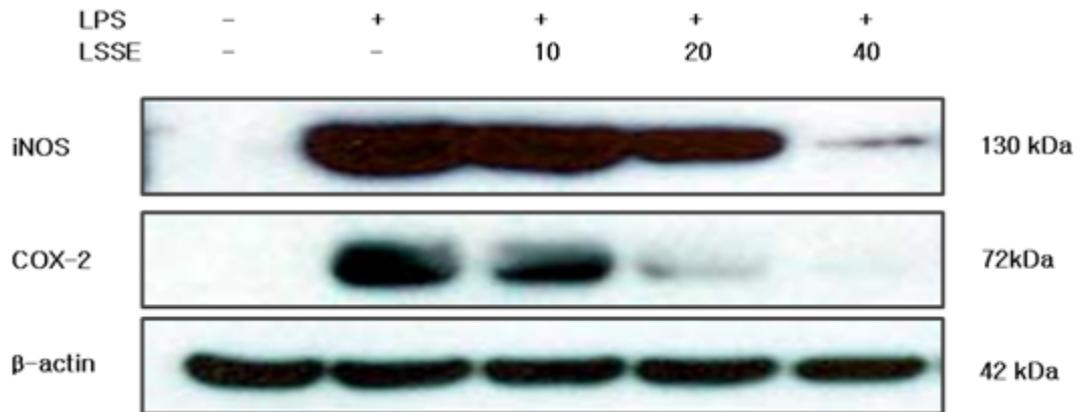


Figure 6. Inhibitory effects of iNOS and COX-2 protein level on LSSE in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.2×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in the presence of LSSE (10, 20, and $40 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method.

3.6. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 전염증성 cytokines 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell에서 LSSE가 전염증성 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 발현에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. RAW 264.7 cell에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)와 LSSE를 10, 20 및 40 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 농도로 처리하여 TNF- α 와 IL-6의 생성 억제 활성을 확인한 결과 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다 (Figure 7-1, 2).



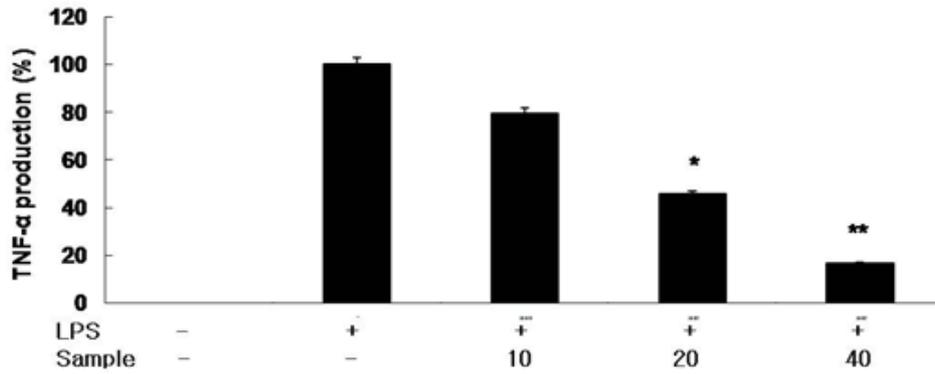


Figure 7-1 . Inhibitory effect of TNF- α production on LSSE in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/ml) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 h in the presence of LSSE (10, 20, and $40 \mu\text{g/ml}$). Supernatants were collected, and the TNF- α concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

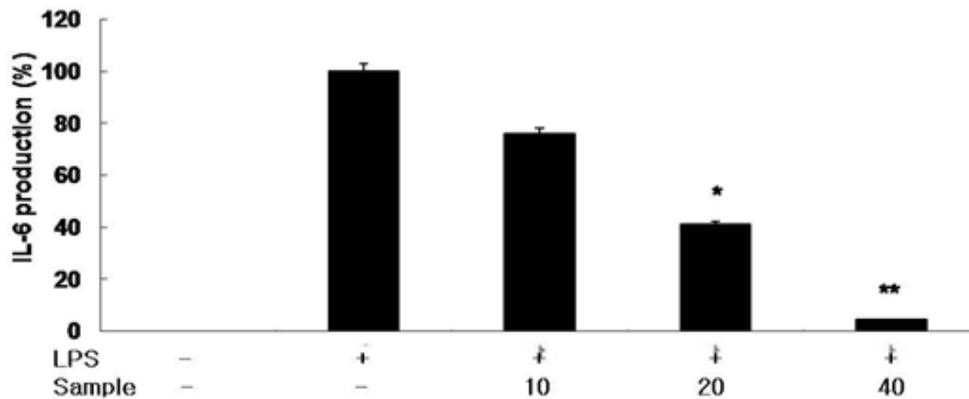


Figure 7-2. Inhibitory effect of IL-6 production on LSSE in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/ml) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 h in the presence of LSSE (10, 20, and $40 \mu\text{g/ml}$). Supernatants were collected, and the IL-6 concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

3.7. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 NF- κ B 작용기전 억제 활성

LSSE가 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 신호전달경로에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 LSSE(10, 20, 및 40 μ g/ml)를 처리하고 2시간후에 LPS(1 μ g/ml)로 자극하였다. LPS처리 10분, 20분, 30분 후 단백질을 분리하여 Western blot analysis로 I κ B- α , P50, P65의 변화를 확인하였다. 그결과 LPS 처리후 20분에서 I κ B- α 와 p65의 degradation을 농도의존적으로 억제 시켰고, p50에 대한 활성은 나타나지 않는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 8-1, 2, 3).

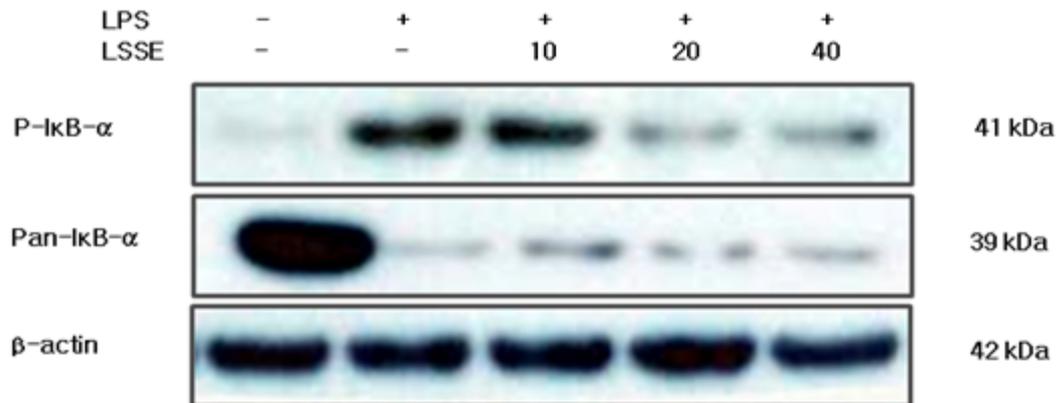


Figure 8-1. Inhibitory effect of IκB-α protein level on LSSE in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.8×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were pre-incubated for 2 hr with LSSE (10, 20, and 40 μ g/ml) at indicated concentrations and then stimulated for 20 min with LPS (1 μ g/ml). The levels of p-IκB-α (phosphorylated-IκB-α) and pan-IκB-α were determined using immunoblotting method.

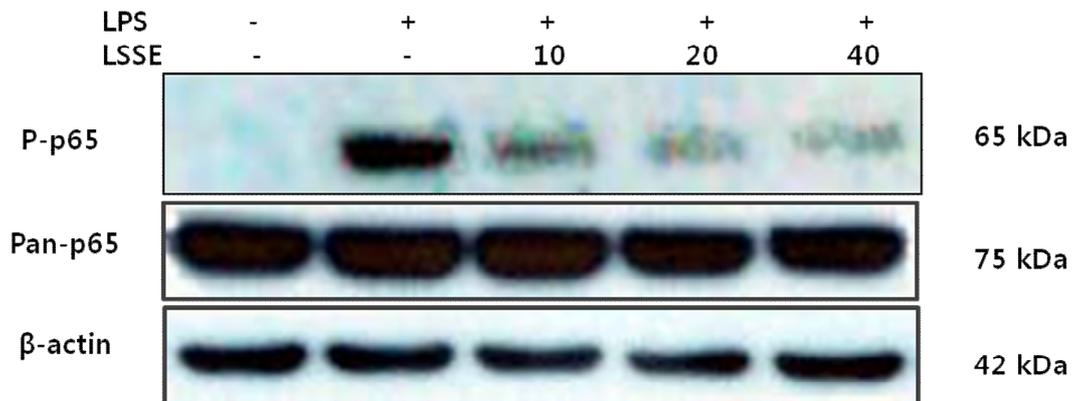


Figure 8-2. Inhibitory effect of P-65 protein level on LSSE in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.8×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were pre-incubated for 2 hr with LSSE (10, 20 and 40 μ g/ml) at indicated concentrations and then stimulated for 30 min with LPS (1 μ g/ml). The levels of p-p50 (phosphorylated-p50) and pan-p50 were determined using immunoblotting method.

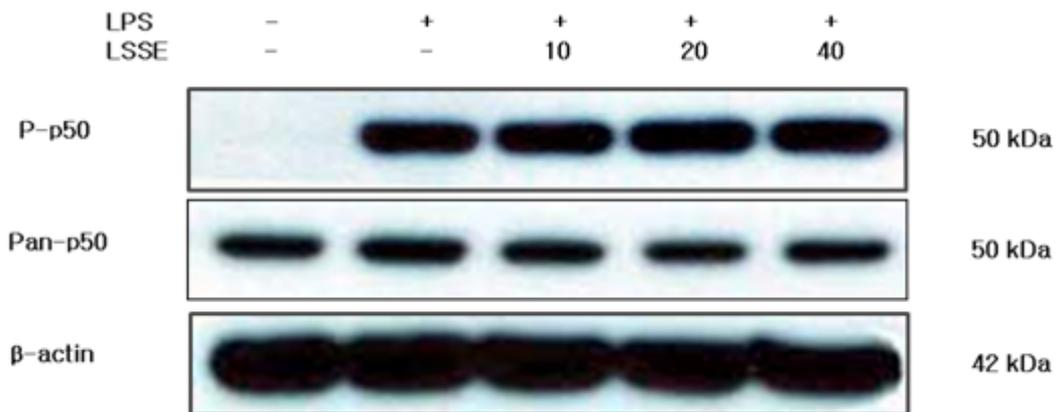


Figure 8-3. Inhibitory effect of P-50 protein level on LSSE in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.8×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were pre-incubated for 2 hr with LSSE (10, 20, and 40 μ g/ml) at indicated concentrations and then stimulated for 20 min with LPS (1 μ g/ml). The levels of p-p50 (phosphorylated-p50) and pan-p50 were determined using immunoblotting method.

3.8. 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 MAPKs 인산화 억제 활성

LSSE가 LPS에 의해 유도된 MAPKs 신호전달경로에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 LSSE(10, 20 및 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 2시간후에 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극하였다. LPS처리 10분, 20분, 30분 후 단백질을 분리하여 Western blot analysis로 phospho-ERK, ERK, phospho-JNK, JNK, phospho-P38, P38 을 확인하였다. 그결과 LPS 처리후 20분에서 ERK, JNK 및 P38의 인산화를 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure. 9-1, 2, 3).



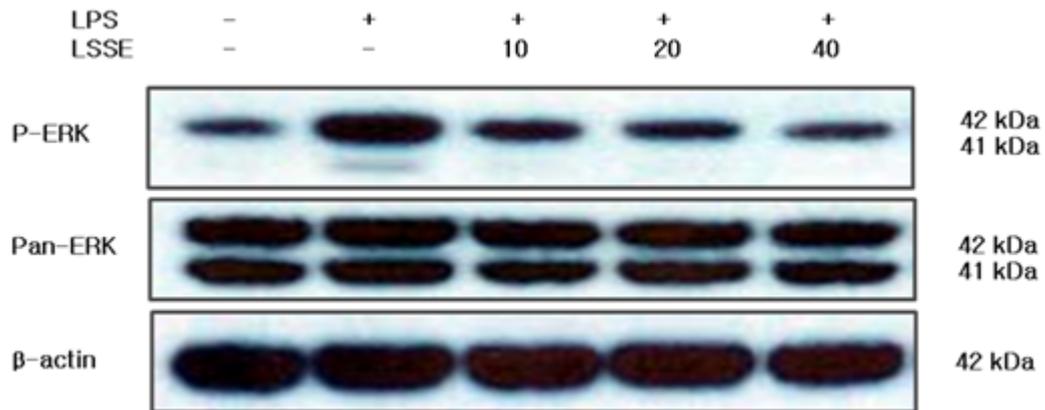


Figure 9-1. Inhibitory effect of ERK protein level on LSSE in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.8×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were pre-incubated for 2 hr with LSSE (10, 20, and 40 μ g/ml) at indicated concentrations and then stimulated for 20 min with LPS (1 μ g/ml). The levels of p-ERK (phosphorylated-ERK) and pan-ERK were determined using immunoblotting method.

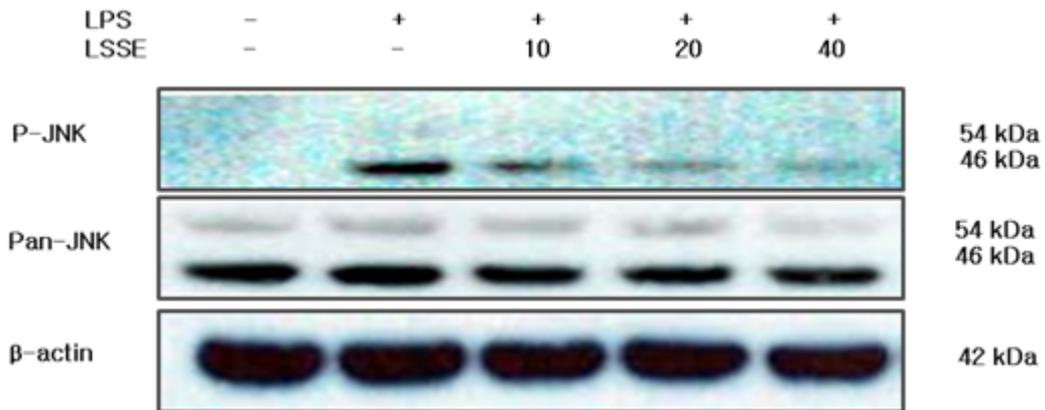


Figure 9-2. Inhibitory effect of JNK protein level on LSSE in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.8×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were pre-incubated for 2 hr with LSSE (10, 20, and 40 μ g/ml) at indicated concentrations and then stimulated for 20 min with LPS (1 μ g/ml). The levels of p-JNK (phosphorylated-JNK) and pan-JNK were determined using immunoblotting method.

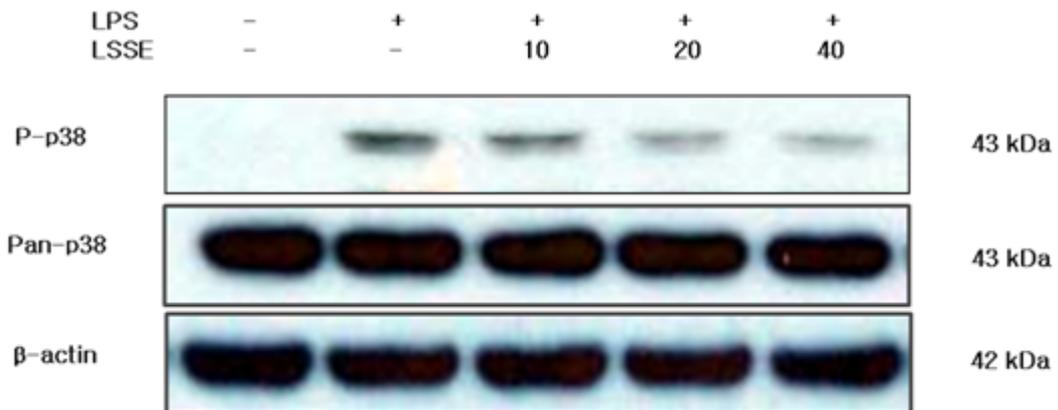


Figure 9-3. Inhibitory effect of P-38 protein level on LSSE in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.8×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were pre-incubated for 2 hr with LSSE (10, 20, and 40 μ g/ml) at indicated concentrations and then stimulated for 20 min with LPS (1 μ g/ml). The levels of p-p38 (phosphorylated-p-38) and pan-p-38 were determined using immunoblotting method.



4. 고 찰

까마귀쪽 나무(*Litsea japonica* Jussieu)는 녹나무과에 속하며, 한국의 제주도를 비롯하여 일본 남부지방에 자생하고 있는 상록활엽소교목 이다(Min et al., 2003). 까마귀쪽나무(*L. japonica*)는 구토, 설사, 두통 및 중추신경계에 관련된 질병의 치료에 사용되었으며, 잎에서 분리한 *tiliroside*는 인체의 *anti-complement*에 대한 억제 작용이 있다고 보고된 바가 있다. 또한 과육과 종자로 이루어진 열매의 과육에서는 진통효과 및 항염증 효과가 있다고 알려져 있으나 현재 까마귀쪽나무 종자(*Litsea japonica* seed)에 대한 연구는 보고된 바 없다. 이에 본 연구에서는 까마귀쪽나무 종자의 활용가능성의 평가를 위하여 까마귀쪽나무 종자의 추출물을 연구하였다. 추출 과정에서 일반적으로 실험에 사용되고 있는 용매를 이용한 추출과 초임계 유체 이산화탄소를 이용한 추출 방법으로 추출물을 제작 하였다. 60, 70, 80%의 Ethanol(EtOH)에 침적시킨 후 24시간 교반 하여 추출 하였을 때, 각각 8.23, 8.6, 8.56%의 추출 수율을 나타내며 미미한 차이를 보였다. 그 중 수율이 가장 높은 70% EtOH을 이용하여 추출물을 제작하였다. 초임계 이산화탄소 유체 추출의 경우 초임계 유체의 낮은 표면장력과 점도, 높은 확산계수의 특성으로 고체 물질 내부로의 침투가 용이하여 유효성분의 효과적인 추출을 할 수 있다는 장점이 있다. 일정한 조건(60℃, 300bar)으로 4시간 동안 추출 하였을 때 9.48%의 수율을 보이며 24시간 동안 추출한 용매추출법에 비해 효과적인 추출 수율을 확인 할 수 있었다.

염증반응은 외부의 자극을 받아 활성화된 면역세포들에 의해 매개되며, RAW 264.7 cell은 LPS와 같은 염증 유발물질에 의해 자극을 받아 TLR-4(toll-like receptor-4)를 통해 NF- κ B와 MAPKs가 활성화 되어 염증반응이 일어난다. (Yeh et al., 2011). 세 종류의 NOS 중에서 주로 염증반응에 관여하는 iNOS와 대식세포에서 감염이나 손상 혹은 스트레스에 의해 발현되는 COX-2는 염증매개물질인 NO와 PGE₂의 생합성을 촉진시켜 염증을 유발시킨다 (Kim et al., 2004; Lee et al., 2006). 이에 따라 RAW 264.7 cell에 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(*Litsea japonica* Seed Supercritical Extraction, LSSE)과 까마귀쪽나무 종자 추출물(*Litsea japonica* seed Extraction, LSE)이 염증인자의 생성을 억제하는지 확인해 보았다. 그 결과 LSSE는 LPS 단독 처리군과 비교해 볼 때 88%의 NO 억제 활성을 보이는

반면, LSE는 LPS단독 처리군에 비해 33% 정도의 NO생성 억제 효과만을 나타내어 LSSE에 대한 실험을 진행하였고, LSSE의 NO와 같은 염증인자인 PGE₂ 의 억제 활성을 확인 한 결과 58%의 억제 활성을 보이는 것으로 나타났다.

NO와 PGE₂ 생성에 관여하는 iNOS와 COX-2의 억제 활성을 보기 위해 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 단백질을 분리하여 확인한 결과 LPS 단독 처리군에 비해 LSSE이 iNOS와 COX-2의 유도 발현을 억제시키는 것을 확인 할 수 있었다.

NF-κB는 LPS 자극으로 인해 발현되는 염증매개단백질의 발현에 중요한 역할을 한다. NF-κB는 세포질에서 IκB와 결합한 비 활성상태로 존재 하다가, LPS와 같은 자극에 의해 활성화되면 IκB가 저하 되면서 핵 내로 이동하여 iNOS및 COX-2 등의 전사를 일으킨다(Ahn et al., 2005; Grossman et al., 2002). 이와 관련하여 LSSE를 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에 처리 한 후, 억제된 iNOS와 COX-2가 NF-κB 경로의 억제 활성에 영향을 주는지 알아보기 위해 Western blot analysis를 통해 확인해 보았다. 그 결과 NF-κB 경로의 IκB-α와 p65에서의 억제 효과를 확인 할 수 있었지만, p50 에서의 활성은 나타나지 않았다. 그러나 결과적으로 생성되는 염증 매개 인자인 iNOS, COX-2, IL-6, TNF-α등의 생성억제를 나타냄으로써, LSSE가 NF-κB 경로에 염증인자 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다.

LPS에 의해서 자극을 받았을 때, NF-κB와 더불어 MAPK경로를 통해서도 염증매개 단백질을 조절 하기도 한다. MAPK를 통한 경로에는 ERK, JNK 그리고 p38이 NO, IL-6, IL-1β 와 IL-6의 생성에 관여한다는 연구결과가 있다.(Ghazizadeh et al., 2007). 이러한 연구 결과를 바탕으로 LSSE가 MAPKs의 인산화에 대한 영향이 있는지 확인한 결과, RAW 264.7 cell에 LPS로 자극을 주고 LSSE를 처리하여 ERK, JNK 그리고 p38의 농도를 확인하였다. LSSE는 JNK와 p38의 농도의존적인 억제 활성을 확인 할 수 있었고, ERK에서도 LPS 단독 처리군에 비해서 감소시킨 것을 확인 할 수 있었다.

위의 결과를 통해서 LSSE는 NF-κB 와 MPAK 경로에서 염증매개 cytokine들의 선택적인 억제 활성 보이며 NO, PGE₂ , TNF-α 및 IL-6의 감소효과를 나타냈음을 보여주고 있다.

이러한 결과들을 종합해본 결과, 까마귀쪽 나무의 종자에서도 잎을 비롯한 과육과 함께 약리학적으로 이용될 수 있는 근거를 시사하며, 염증치료제 유효 성분 및 작용기전 연구에 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

5. 참 고 문 헌

Cho Y.K., Kim S.H., Kim J.W., Lee S.Y., Kim W.S., Ryu J.H., Lim G.B. Extraction of glabridin from licorice using supercritical carbon dioxide. *KSBB J.* (2004) 19:427-432

Blonska M., Czuba Z.P., Krol W., Effect of flavones derivatives on interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA expression and IL-1 β protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophage. *Scand J. Immunol.* (2003) 57: 162-166

Dubois R., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van De Putte L.B.A., Lipsky P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* (1998) 9(19):2045-2046

Guzmán-Gutiérrez SL, Gómez-Cansino R, García-Zebadúa JC, Jiménez-Pérez NC, Reyes-Chilpa R. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *J Ethnopharmacol.* (2012) 143:673 - 9

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

Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* (1990) 144:1434-31

Jun CD, Pae HO, Kim YC, Jeong SJ, Yoo JC, Lee EJ, Choi BM, Chae SW, Park RK, Chung HT. Inhibition of citric oxide synthesis by butabof fraction of the

methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophage. *J Ethnopharmacol*, (1998) 62: 129-135

Jiménez-Pérez N, Jiménez-Pérez N, del C, Lorea-Hernández FG, Jankowski CK, Reyes-Chilpa R. Essential oils in Mexican Bays (*Litsea* spp., Lauraceae): taxonomic assortment and ethnobotanical implications. *Econ Bot* (2011) 65:178 - 89

Kim H.S., Kim B.Y., Lee S.Y., Kim E.S., Lee E.K., Ryu J.H., Lim G.B. Extraction of glycyrrhizic acid from licorice using supercritical carbon dioxide/aqueous ethanol. *Korean J. Biothechnol Bioeng.* (2003) 18;347-351

Kim JH, Kim DH, Baek SH, Lee HJ, Kim MR, Kwon HJ and Lee CH, Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF- κ B and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*, (2006) 71: 1198-1205

Kim J.Y., Jung K.S., Jeong H.G. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 in macrophages. *FEBS Letters* (2004) 569:321-326

Kim J.H., Kim D.H., Baek S.H., Lee H.J., Kim M.R., Kwon H.J., Lee C.H. 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.* (2006) 72(8):1198-1205

Kim J, KimCS, Lee IS, Lee YM, Sohn E, Jo K, et al. Extract of *Litsea japonica* ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice. *Endocrine* (2013) [Epub ahead of print].

Kimura A., Ohmichi M., Kurachi H., Ikegami H., Hayakawa J., Tasaka K.,

Kanda Y., Nishio Y., Jikihara H., Matsuura N., Murata Y. 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.* (1999) 59:5133-5142

Kiran E, Sengers J. Supercritical Fluids-Fundamentals for application. Kluwer academic publishers. *Dordrecht. Boston. London.* (1994) pp. 3-64

Koo H.J., Yoon W.J., Sohn E.H., Ham Y.M., Jang S.A., Kwon J.E., Jeong Y.J., Kwak J.H., Sohn E.S., Park S.Y., Jang K.H., Seung N.K., Han H.S., Jung Y.H., Kang S.C. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation. (2014) *Int. Immunopharmacol.* 22:84-97

Lee H.J., Knag G.J., Yoon W.J., Kang H.K., Kim Y.S., Kim S.M., Yoo E.S., Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW 264.7 and HaCaT cell. *Kor. J. Pharmacogn.* (2006) 37(2):74-80

Lee, S. Y., Min B. S., Kim J. H., Lee, J., Kim, T. J., Kim, C. S., Kim, Y. H., Lee, H. K. Flavonoids from the Leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *Phytotherapy research.* (2005) 19:273-276

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

Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by saquinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br. J. Pharmacol.* (2003) 139: 11-22

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology. Pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* (1991) 43:109-142

Moeslinger T, Friedl R, Spieckermann PG. Inhibition of inducible nitric oxide synthesis by azathioprine in a macrophage cell line. *Life Sci*, (2006) 79: 374-381

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

Min BS, Lee SY, Kim JH, Kwon OK, Park BY, An RB, et al. Lactones from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *J Nat Prod* (2003) 66:1388 - 90.

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

Mc Hugh M.A., KruKonis V.J. Supercritical fluid extraction: principle and practice. Butterworths, Stoneham, MA, USA (1986) pp.608

Nomura, Y., NF- κ B activation and I κ B- α dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life sci*, (2001) 68: 1695-1701

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

Rossi A., Kapahi P., Natoli. G., Takahashi T., Chen Y., Karin M., Santoro M.G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B

kinase. *Nature*. (2000) 403: 103-108

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

Rho TC, Choi HC, Kim BY, Kim YH, Ahn JS, Kim YK, and Lee HS. Inhibitory effect of Coumarins on nitric oxide production in LPS-activated murine macrophages. *Kor. J. Pharmacogn*, (1999) 30: 413-416

Sohn E, Kim J, Kim CS, Lee YM, Jo K, Shin SD, et al. The extract of *Litsea japonica* reduced the development of diabetic nephropathy via the inhibition of advanced glycation end products accumulation in db/db mice. *Evid Based Complement Alternat Med* (2013)2013:769416.

Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia Cordata* root. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* (2003) 32: 1053-1058,

Son CG, Shin JW, Cho JH, Cho CK, Yun CH, Chung W, Han SH. Macrophage activation and nitric oxide production by water soluble components of *Hericium erinaceum*. *Int Immunopharmacol*, (2006) 1363-1369

Stock M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of Proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl. Int.* (1994) 7: 647-649

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

Tanaka, H., T. Nakamura, T., and Ichino, K., Butanolides from *Litsea japonica*.

Phytochemistry. (1990) 29:857-859

Takeda, K., Sakurawi, and K., Ishii, H., Components of the Lauraceae family-1.
New lactonic compounds from *Litsea japonica*. *Tetrahedron*. (1972) 28:3757-3766

Willeaume V, Kryus V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *Journal of Inflammation*. (1996) 46: 1-13

Xia Z., Martin D., Joel R., Roger J.D., Michael E.G. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Dol* (1995) 270:1326-1331

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

김엘비라, 부혜진, 현재희, 김상철, 강정일, 김민경, 유은숙, 강희경. 까마귀쪽나무 (*Litsea japonica*)의 HL-60 및 HL-60/ADR 세포 Apoptosis 유도 효과. *약학회지* (2009) 1:6-11

6. 요약

본 연구에서는 까마귀쪽나무 종자를 항염증 개선소재로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여 RAW 264.7 cell에서 까마귀쪽나무 추출물의 염증억제 활성을 연구하였다. 우선 까마귀쪽나무 종자를 70% 에탄올과 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출하였고 70% 에탄올을 이용한 추출에 비해 초임계 추출의 수율이 월등히 뛰어나는 것을 확인하였고 두 추출물의 NO 생성 억제 활성을 확인하였다. 이 중 항염증 활성이 뛰어난 까마귀쪽나무 종자 초임계 추출물(LSSE)의 항염증 효과를 분석하였다. LSSE가 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였고, LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 염증성 매개인자인 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 nitric oxide(NO)와 pro-inflammatory cytokine들 (interleukin-6(IL-6), tumour necrosis factor- α (TNF- α))의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. 또한, LSSE가 염증을 일으키는 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)와 nuclear factor- κ B(NF- κ B)경로에 영향을 미쳐 iNOS와 COX-2의 발현을 억제 기전에 대한 분석을 진행했다. LSSE는 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 p65의 인산화 억제와 I κ B- α 가 degradation되는 것을 억제시킴으로써 NF- κ B에 의한 cytokine들의 발현을 감소시키는 것을 확인하였고 p38, ERK, JNK의 인산화를 억제시켜 MAPKs에서도 효과를 나타냈다.

위의 결과들을 통해 LSSE는 NF- κ B와 MAPKs의 작용 기전에 대한 억제 효과가 있고 이를 바탕으로 대식세포 관련 염증인자에 대하여 항염증 효과가 있다는 것을 나타냈고 염증으로 인한 질병의 개선 소재로서의 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글

돌아보면 대학원 2년이라는 시간이 어떻게 지나갔는지도 모를 정도로 빠르게 지나간 것 같습니다. 처음 대학원을 등록 할 때만 해도 과연 내가 대학원 졸업을 할 수 있을까에 대한 막연함과 불안감에 잠 못 이룬 적도 있었지만 그동안의 과정을 통해 한걸음 더 나아갈 수 있었습니다. 제가 이렇게 논문을 쓰는 과정에서 많은 분들의 도움이 있었기에 이렇게 글로나마 감사의 마음을 전하고자 합니다.

학부 생활을 할 때부터 실험실 생활과 학업에 충실하지 못했던 저에게도 항상 많은 관심과 격려를 해 주신 이동선 교수님 감사합니다. 실험실을 그만두고 졸업을 한 후에 찾아가 대학원을 다니겠다고 했을 때에도 흔쾌히 허락을 해주셨기에 자신감을 갖고 대학원도 다닐 수 있었고 졸업도 할 수 있었습니다. 앞으로 더 발전하는 저의 모습을 보여 드리기 위해서 열심히 하겠습니다. 그리고 바쁘신 와중에도 많이 부족했던 저의 논문을 심사해주시고 주옥같은 조언을 해주신 류기중 교수님과 김소미 교수님께 진심으로 감사드립니다. 대학원 생활을 하면서 많은 배움을 주신 김민영 교수님 감사합니다.

처음 저에게 실험을 배울 수 있게 도움을 주고 대학원을 다닐 수 있게 용기를 준 원종이형 감사합니다. 형이 있었기에 지금의 제가 있을 수 있고, 여기서 다 전할 수는 없겠지만 연구소 후배로서 때로는 친 동생처럼 생각해주시는 그 마음을 마음속 깊이 간직하겠습니다. 제가 연구소에 다니면서도 졸업을 할 수 있게 많은 도움과 배려를 해 주신 김창숙 소장님과 박수영 팀장님, 정용환 박사님께 감사를 전하고 싶습니다. 대학원은 같이 다녔고 졸업도 같이 하지만 먼저 졸업한 것 같은 느낌으로 많은 도움을 받은 영종이형이 없었으면 더 힘들었을 것 같습니다. 바쁜 와중에도 여러 가지로 신경 많이 써준 영민이 누나 감사합니다. 같은 팀은 아니지만 신경 많이 써주는 경후형, 룸메이트로서 많은 조언을 해준 창식이형, 과제로 고생할 때 도와주고 조언해준 대경이형, 이제 대학원 들어가서 아직 열심히 해야 되는 우철이형, 연구소 유일한 친구이자 많은 도움을 주는 선아, 같이 고생하면서 많은 의지가 되어준 수경이, 힘들 때 서귀포에서 많은 위로를 해준 시택이형, 인철이형 모두에게 감사를 전하고 싶습니다. 그리고 많은 조언과 격려를 해주신 고미희 박사님, 대주쌤을 비롯한 연구소 구성원 모두에게 감사드립니다.

지금은 힘들지만 앞으로 잘나갈 우리 친구들 용진이, 진수, 드라, 승보, 지루박, 때모, 정현, 화조와 고생하고 있는 철이 까지 덕분에 힘이 되고 즐겁게 살 수 있어 고맙고 많은 위로와 격려를 보내준 희균이형과 제훈이 에게도 감사를 전합니다.

끝으로 언제나 제 편이 되어 주시고 많은 걱정과 사랑을 보내주는 우리 엄마 아빠께 너무도 죄송하고 감사합니다. 그리고 평소에 표현이 서툴러서 따뜻한 말 한마디 건네지 못했지만 우리 누나, 수진이, 상현이와 상문이 에게도 미안하고 너무 고마운 마음을 전하며 사랑하는 우리 가족에게 이 논문을 바칩니다.