

산딸기 잎 추출물의 항염증 기능 탐색에 관한 연구

김대용 · 조석철^{1*}

서원대학교 제약공학과, ¹서원대학교 식품공학과

Studies on Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract from *Rubus crataegifolius* Leaf

Dae-Yong Kim and Seok-Cheol Cho^{1*}

Department of Pharmaceutical Science & Engineering, Seowon University

¹Department of Food Science & Engineering, Seowon University

Abstract

A lot of research about applications of natural extracts to both food and medicine is in progress. In this paper, we tested the applicability of *Rubus crataegifolius* leaf extract in functional materials including its anti-inflammatory effects. We investigated the effects of *Rubus crataegifolius* leaf extract on the LPS-induced production of inflammatory cytokines and mediators in RAW264.7 macrophage cell line. The protein expression of COX-2, iNOS, IL-4, TNF- α , and IFN- γ , phosphorylation of MAPKs (ERK, JNK, p38) and the activation of NF- κ B with *Rubus crataegifolius* leaf extract were assayed in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Pre-treatment with *Rubus crataegifolius* leaf extract significantly inhibited the protein expression of iNOS and COX-2 in a dose-dependent item and the secretion of inflammatory cytokines such as IL-4, TNF- α , and IFN- γ . *Rubus crataegifolius* leaf extract significantly reduced the phosphorylation of MAPKs. The NF- κ B was strongly suppressed by extracts. Moreover, the pathological phenotypes of contact dermatitis such as erythema, edema, and scabs were significantly decreased in *Rubus crataegifolius* leaf extract-treated mice. These results indicated that *Rubus crataegifolius* leaf extract have an anti-inflammatory effect, and that this might be used as a supplement for the functional materials.

Key words: *Rubus crataegifolius*, macrophage, inflammation, cytokine, contact dermatitis

서 론

현재 우리 사회는 소득의 증가와 삶의 질적 향상에 기인하여 기본적인 의식주 해결의 기본적인 문제에서 기능을 고려하는 상황으로 변화하고 있으며 이러한 경향은 여성 중심의 제품으로 여겨지던 화장품에게도 적용되어 남성용 제품의 수요가 증가하고 있는 추세이다(Ban et al., 2013). 또한 웰빙에 관한 지속적인 관심과 자연주의의 확산으로 천연 소재의 안전성에 주목하게 됨으로써 기능성이 확보된 천연 소재를 이용한 다양한 제품의 개발이 활성화 되고 있으며 이는 기능성 식품 개발에도 적용되어 천연물 유래의 기능성 소재 개발을 위하여 생리 활성 평가가 지속적으로 이루어지고 있다(Chung et al., 2014).

우리나라에서는 예로부터 질병치료를 위한 소재로 천연 소재를 활용해 왔으며, 최근에는 적용분야가 의약품, 건강 기능식품 및 화장품으로 다양해질 뿐 아니라 활용제품이 급격히 증가하는 실정이다(Jeon & Kwon, 2014). 뿐만 아니라 천연 소재에 관한 다양한 연구는 항염, 항암, 항균, 항산화 등의 다양한 생리활성을 밝힘으로써(Bae et al., 2012) 향후 그 적용범위는 지속적으로 확장될 것이다. 선행 연구들에 의하면 블루베리 잎과 백량금 열매 추출물에서 항산화 및 항염 효과를 확인하였고(You & Yoon, 2013; Kim & Lee, 2014), 길경이 중차 추출물의 항산화 활성에 관한 연구(Yoon et al., 2013)가 진행되었다. 또한 녹차 초임계 추출물에서는 피부 염증 유발균에 대한 항균활성 및 항산화 효과에 대한 연구(Kim & Han, 2014)가 진행되었다.

산딸기는 장미과에 속하는 관목의 열매로 야산이나 산악 지역에 자생하며, 6-7월에 성숙하여 수확하는 품종과 9-10월에 수확하는 것으로 분류된다(de Ancos et al., 2000; Zhang et al., 2010). 생산량이 많지 않아 산딸기는 대중적인 가공식품으로 판매되지는 않았으나 식초, 잼, 푸레 등 기본적인 가공품은 물론 케이크, 마카롱 및 파이 등 다양

*Corresponding author: Seok-Cheol Cho, Department of Food Science & Engineering, Seowon University, 377-3 Musimseoro, Seowon-gu, Cheongju, Chungbuk, 28674, Korea
Tel: +82-43-299-8748; Fax: +82-43-299-8107
E-mail: cscho@seowon.ac.kr
Received January 9, 2016; revised February 4, 2016; accepted February 1, 2016

한 제품에 적용되고 있어 그 활용분야가 점차 확장되고 있다. 산딸기에는 다양한 종류의 phytochemical 물질을 함유하고 있어 항산화, 항염, 항균 등의 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Zhang et al., 2010; Bobinaite et al., 2012). 특히 flavonoid, tannin, phenolic acid와 같은 페놀성 화합물과 수용성 색소인 anthocyanin 성분이 다량 함유되어 있으며, 각종 약리 작용을 하는 triterpen류가 존재하는 것으로 알려져 있다(Bobinaite et al., 2012). 산딸기에 대한 연구는 생리활성 물질의 탐색을 중심으로 진행되어 산딸기 추출물의 항산화효과, 암세포의 증식 억제 및 항염증 효과 등에 관한 연구(Juranic et al., 2005; Huang et al., 2011) 등이 진행되었으며 국내에서는 예로부터 약용식물에 이용되고 있는 복분자(*Rubus coreanus*, 복분자 딸기의 익지 않은 열매)의 기능성에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다(Yang et al., 2007).

염증 반응은 외부 자극에 대한 신체조직의 방어기작으로 외부로부터 발생한 물리적, 화학적 자극에 의한 신체 손상을 회복하려는 기전이다(Jung et al., 2014). 이런 염증 반응에서 대식세포는 interleukin-4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ)와 같은 염증성 매개 물질을 생산하여 초기 방어기작에 관여하지만(Higuchi et al., 1990) 이런 매개 인자가 과발현 되면 지속적인 염증 반응으로 인해 만성 염증성 질환이 유도된다(Ljung et al., 2006). 이와 같이 염증성 사이토카인은 염증 반응과 관련되어 있어서 이들의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증 질환의 예방 또는 치료제로서 관심을 받고 있다. 특히 현재 사용되고 있는 항염 소재가 부작용을 발생하고 있기 때문에(Kim et al., 2009) 항염 기능을 가진 제품의 개발에 있어서 기능성과 안전성이 확보된 천연물 유래 소재 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

현재까지 산딸기에 대한 연구는 열매나 씨앗에 존재하는 생리활성 물질에 국한되어 왔으나(Lee et al., 2014) 본 연구에서는 산딸기 열매를 수확한 후 부산물로 폐기되는 산딸기 잎에 존재하는 소재의 항염증 효과를 확인함으로써 향후 산딸기 산업의 부가가치를 상승시키고 산딸기 잎에서 추출한 항염증 소재의 기능성 소재에 대한 적용 가능성을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

산딸기 잎 추출물의 제조

실험에 사용된 산딸기 잎은 경상북도 포항에서 구입하여 건조한 후 4°C에서 저온 저장하며 이용하였다. 에탄올추출물은 70% (w/v, 이하 동일)의 에탄올(Daejung, Ansan, Korea)을 사용하여 시료 중량의 10배(w/v)를 첨가한 후 진탕배양기(WiseBath, Daihan Scientific, Wonju, Korea)를 사용하여 실온에서 24시간 동안 30 rpm으로 교반하면서 추

출한 후 상층액과 침전물을 분리하였으며 동일한 방법을 3회 반복하여 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.2, GE, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 여과한 후 감압농축기(Rotary Vacuum Evaporator, N-100, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 동결 건조한 후 -4°C로 보관하면서 실험에 사용하였다.

세포 배양

마우스 대식세포 RAW264.7는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Pittsburgh, PA, USA), 100 U/mL penicillin/streptomycin (HyClone, Pittsburgh, PA, USA)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, Pittsburgh, PA, USA) 배양액에서 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator (Steriliser SFB400, Memmert, Schwabach, Germany)에서 배양하였다(Guan et al., 2014).

세포 독성 측정

산딸기 잎 추출물의 세포 독성은 Berridge & Tan (1993)의 방법을 참고하였다. RAW264.7 세포를 10% FBS (HyClone, Pittsburgh, PA, USA)를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 96 well plate (CORNING, Corning, NY, USA)에 5×10⁴ cells/mL의 세포를 100 μL씩 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator (Steriliser SFB400, Memmert, Schwabach, Germany)에서 24시간 배양하였다 산딸기 잎 추출물을 배양액에 농도별(0, 10, 20, 100, 200, 1000, 2000 μg/mL)로 100 μL를 제조하여 처리하여 최종 농도가 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 μg/mL로 되도록 하여 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후 CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 세포독성을 측정하였다. 각 배양액 100 μL에 CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Reagent를 20 μL씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 방치한 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

염증성 사이토카인 발현 측정

염증성 사이토카인 측정은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용하였다(Ghayor et al., 2015). 96-well plate에 RAW264.7 세포를 4×10⁵ cells/well로 현탁하였다. 24시간 후 다양한 농도의 산딸기 잎 추출물을 농도별로(25, 50, 100 μg/mL) 전처리하고 2시간 뒤에 lipopolysaccharide (LPS) (1 μg/mL)을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 세포 상층액만을 수집하여 원심분리(1,800×g, 4°C, 5분)하여 상등액만을 모아 IL-4, TNF- α , IFN- γ 의 발현양을 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

염증관련 단백질 발현 측정

RAW264.7 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate (CORNING, Corning, NY, USA)에 4×10^5 cells/mL의 세포수가 되도록 3 mL씩 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 새로운 DMEM배지로 교환한 후 산딸기 잎 추출물의 농도를 25, 50, 100 µg/mL가 되도록 세포에 처리하여 2시간 동안 배양한 후 자극제인 LPS를 처리하고 배양하였다. 24시간 후 단백질 발현을 측정하기 위하여 배지를 제거하고 차가운 PBS로 세척한 후 cell lysates는 lysis buffer (10 mM pH 7.4 Tris-HCl, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)를 첨가하여 단백질을 추출하였다. 단백질을 정량하여, 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후, membrane으로 transfer하여 5% skim milk에 1시간 동안 blocking하였다. Cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 단백질 발현은 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham, PA, USA)을 이용하여 확인하였다(Wallert et al., 2015).

핵 단백질 추출

Nuclear factor-kappaB (NF-κB)의 활성화 정도를 분석하기 위해 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 방법을 활용하였다(Ghayor et al., 2015). 우선 산딸기 잎 추출물(25, 50, 100 µg/mL)을 처리한 RAW264.7 세포로부터 핵 단백질을 분리하였다. 산딸기 잎 추출물로 처리된 세포 (2×10^6 cells/dish)를 배양액을 제거하고 PBS로 세척하여 세포를 회수하고, 180 µL의 hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.02% NaN₃, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7.4)를 넣고, 20 µL의 5% nonidet NP-40을 첨가하여 5분 동안 반응시켰다. 이후 원심분리(1,800×g, 4°C, 5분)한 후 상층액을 세포질 추출물로 이용하였다. 침전물은 hypotonic buffer로 한번 세척 하고, hypertonic buffer (20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-

ethanesulfonic acid, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.02% NaN₃, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7.4)를 넣고 1시간 동안 얼음 위에 방치시킨 다음 원심분리(13,000×g, 4°C, 10분)하여 상층액을 회수하여 핵 단백질을 분리하였다. NF-κB의 활성은 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) kit (Signosis, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

Oxazolone를 이용한 접촉성 피부염 모델

만성 접촉성 피부염 모델을 위해 oxazolone으로 감작시킨 뒤 반복적으로 피부에 도포하여 접촉성 피부염을 유도한 뒤 병변 부위를 관찰함으로써 산딸기 잎 추출물의 만성 접촉성 피부염 억제 효과를 확인하였다(Kim et al., 2010). Hairless 마우스는 대한바이오링크(Umsung, Korea)에서 구입한 SKH-1outbred mice를 사용하였다. 실험은 에탄올을 이용하여 5% oxazolone을 제조하여 hairless 마우스의 등 부위에 골고루 도포하여 감작(민감화)시키고 7일 후 추출물을 도포한 다음 30분 후에 다시 5% oxazolone을 도포하여 접촉성 피부염을 유발시켰다. 2일 간격으로 9회 반복하여 피부염을 유발시킨 후 병변 부위를 관찰하였다(Fig. 1).

통계처리

실험 결과는 통계 프로그램 SPSS 10.0 for window (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 활용하여 통계처리 하였다. 유의차 검증은 one-way ANOVA test를 이용하여 분석한 후, p=0.05 수준에서 Dunnett 다중비교법에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

세포 독성

대식세포는 염증 반응에서 여러 자극에 의해 활성화되어 부종, 열 등의 염증 반응을 유도하고 염증성 사이토카인을 분비하여 다른 염증 세포들이 염증 부위로 이동할 수 있게

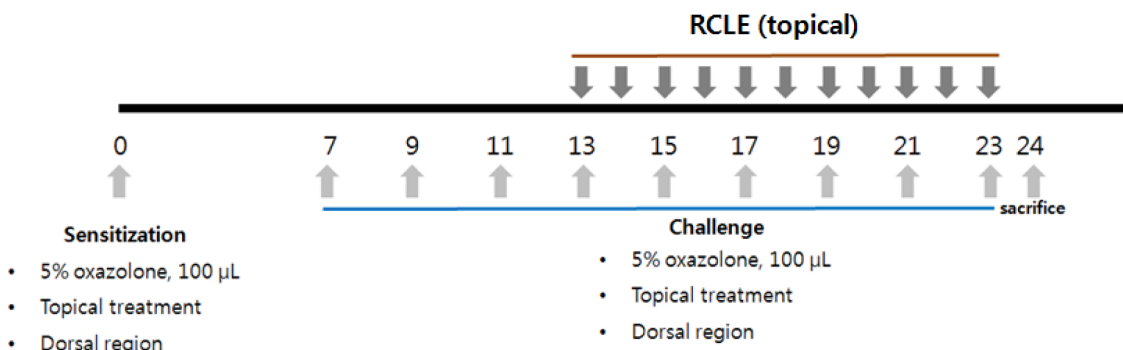


Fig. 1. Methods of oxazolone challenges and topical administration of *Rubus crataegifolius* leaf extracts. Mice were sensitized with oxazolone (5%, 100 µL) or EtOH (100 µL) to dorsal skin.

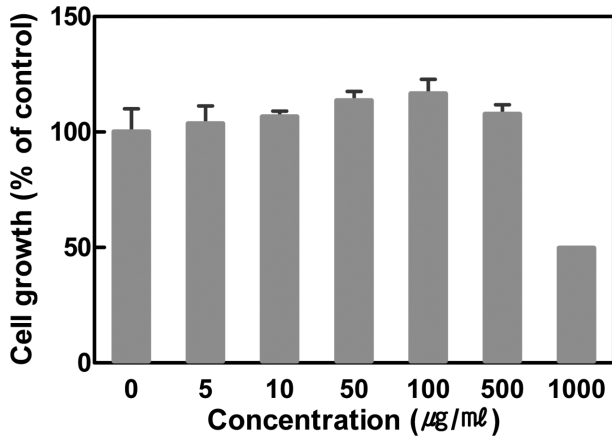


Fig. 2. Effect of *Rubus crataegifolius* leaf extracts on cell viability in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells treated with various concentrations of *Rubus crataegifolius* leaf extracts for 24 h. Cell viability measured by proliferation assay kit.

한다(Li et al., 2015). 산딸기 잎 추출물을 대식세포에 농도별로(5, 10, 50, 100, 500, 1000 µg/mL) 처리하여 proliferation kit를 사용하여 세포 성장률을 측정된 결과, 1,000 µg/mL에서 성장저해와 세포 독성이 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 따라서 추후 진행된 실험은 세포 독성이 없는 농도인 25, 50, 100 µg/mL으로 진행하였다.

염증성 사이토카인 발현 억제 효과

염증 반응이 개시되면 IL-4, TNF-α, IFN-γ 등의 다양한 염증성 사이토카인이 반응에 참여하게 된다(Kim et al., 2013). 특히 대식세포에서는 LPS 등의 여러 자극 인자에 의해서 활성화가 되면 여러 염증성 사이토카인을 유리함으로써 염증반응에 관계된다. 산딸기 잎 추출물이 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 염증성 사이토카인의 발현이 산딸기 잎 추출물에 의하여 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 3). IL-4의 경우 산딸기 잎 추출물의 농도를 25, 50, 100 µg/mL로 증가시키므로써 발현억제율이 33.7%, 59.9%, 76.4%로 증가함으로써 농도 증가에 비례하여 억제율이 상승하는 효과를 나타내었다. TNF-α 및 IFN-γ의 경우도 동일한 산딸기 잎 추출물의 농도에서 발현율이 각각 39.3%, 79.5%, 89.2%와 35.1%, 55.9%, 74.2%의 억제율을 나타내어 정도의 차이는 있으나 산딸기 잎 추출물이 세포독성을 나타내지 않는 100 µg/mL 이하의 농도에서는 농도 의존적으로 LPS 자극에 의한 염증성 사이토카인의 발현을 억제함을 확인하였다.

COX-2와 iNOS 발현 억제 효과

염증 반응의 초기에는 주로 COX-2와 iNOS, 그리고 이들에 의해 발현되는 염증성 매개물질에 의해 반응이 유도된다(Deveraux et al., 1998). COX-2는 정상적인 신체 조건에서는 발현이 되지 않으나 여러 사이토카인이나 LPS

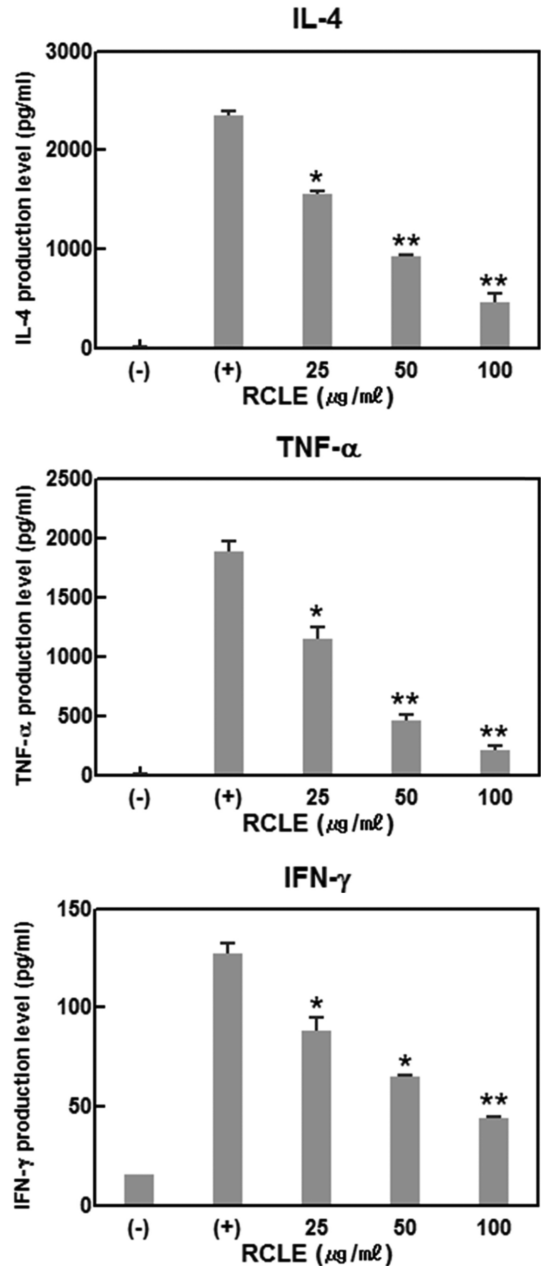


Fig. 3. The effects of *Rubus crataegifolius* leaf extracts on cytokine production in LPS-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with *Rubus crataegifolius* leaf extracts as indicated dose, then stimulated LPS (1 µg/mL) for 24 h. The supernatants were harvested and IL-4, TNF-α and IFN-γ levels were measured by ELISA method as described in Method. RCLE, *Rubus crataegifolius* leaf extracts. * $p < 0.05$ vs (+). ** $p < 0.01$ vs (+).

자극에 의하여 발현되어 prostaglandin을 생성시켜 염증 반응을 유도한다(Chen et al., 2001). 그러므로 COX-2 발현 억제는 염증을 억제하는 효과를 나타낼 수 있다. iNOS는 염증 반응을 일으키는 중요한 효소로 많은 양의 nitric oxide (NO)를 생성한다. iNOS가 과도하게 발현되면 많은 양의 NO가 생성되어 염증을 일으킨다(Hanisch, 2002).

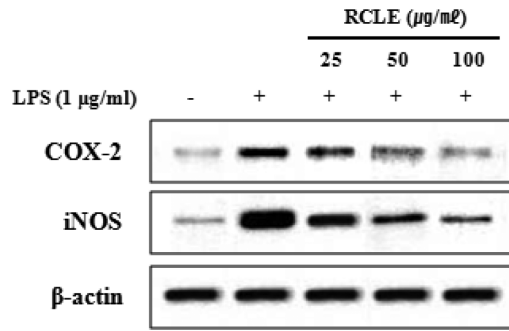


Fig. 4. The effects of *Rubus crataegifolius* leaf extracts on COX-2 and iNOS expression in LPS-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with *Rubus crataegifolius* leaf extracts as indicated dose, then stimulated LPS (1 µg/mL) for 24 h. Expression of two proteins was determined by western blot. RCLC, *Rubus crataegifolius* leaf extracts.

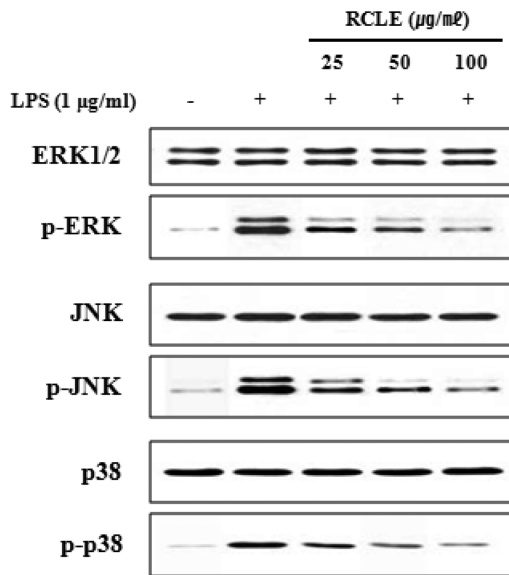


Fig. 5. The effects of *Rubus crataegifolius* leaf extracts on MAPK activation in LPS-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with *Rubus crataegifolius* leaf extracts as indicated dose, then stimulated LPS (1 µg/mL) for 24 h. Phosphorylation of ERK, JNK and p38 was determined by western blot. RCLC, *Rubus crataegifolius* leaf extracts.

LPS 자극과 산딸기 잎 추출물 처리 후 세포질의 COX-2와 iNOS 단백질 발현량을 측정된 결과, LPS 자극에 의하여 COX-2와 iNOS의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였으며(Fig. 4) 증가된 단백질 발현이 산딸기 잎 추출물의 처리에 의하여 농도의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. 그러므로 산딸기 잎 추출물은 COX-2와 iNOS 발현 억제를 통하여 염증억제효과를 확인할 수 있었다.

MAPKs 인산화 억제 효과

MAPK는 염증성 사이토카인 발현에 중요한 조절인자로서 ERK, JNK, p38의 신호전달경로를 가지고 있으며 대식

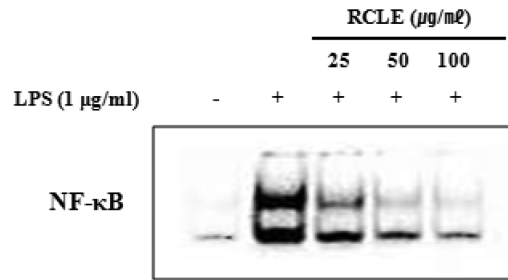


Fig. 6. The effects of *Rubus crataegifolius* leaf extracts on NF-κB and AP-1 activation in LPS-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with *Rubus crataegifolius* leaf extracts as indicated dose, then stimulated LPS (1 µg/mL) for 24 h. Activation of NF-κB was determined by EMSA assay kit. RCLC; *Rubus crataegifolius* leaf extracts.

세포에서 LPS는 표면의 toll like receptor4 (TLK4)를 자극하여 MAPK의 활성화를 유도하여 염증성 매개인자들의 발현을 유도한다(Kim et al., 2010). 또한 COX-2와 iNOS 발현이 조절되는 과정에는 MAPKs가 관여한다고 알려져 있다(Marina et al., 2000). RAW264.7 세포에 산딸기 잎 추출물을 농도별로 처리한 후, LPS로 자극한 후 세포질에서 단백질을 분리하여 MAPKs의 인산화를 측정된 결과 ERK, JNK, p38의 인산화가 증가하였으며 증가된 인산화는 산딸기 잎 추출물에 의하여 농도의존적으로 감소되는 것을 확인함으로써(Fig. 5) 산딸기 잎 추출물의 항염증 효과가 MAPK 분자 조절에 의한 것임을 확인하였다

전사인자 NF-κB 활성 억제 효과

염증성 사이토카인의 발현 조절과 MAPKs 신호전달체계에 관여하는 전사인자로는 NF-κB가 있다. NF-κB는 외부 자극에 의해 사이토카인과 케모카인 등 다양한 매개체의 세포 내 합성을 조절하는 전사인자이다(Kim et al., 2014). 따라서 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 핵 단백질을 추출하여 EMSA assay kit를 활용하여 NF-κB의 활성화에 대한 산딸기 잎 추출물의 억제 효과를 확인한 결과 LPS에 의해 핵 내 NF-κB의 발현이 증가하였고 산딸기 잎 추출물에 의하여 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 6).

접촉성 피부염 억제 효과

Oxazolone 도포로 유도한 접촉성 피부염 마우스 모델은 사람의 아토피 피부염과 매우 유사한 임상학적, 면역학적 특징을 가지고 있으며 다른 피부염 모델보다 간단하게 만들 수 있는 장점이 있다(Chung et al., 2014). Oxazolone만을 도포한 hairless 마우스에서는 인설, 홍반 등이 발생하였으나 산딸기 잎 추출물을 동시에 도포하였을 때 병변 부위가 유의적으로 완화된 것을 육안으로 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

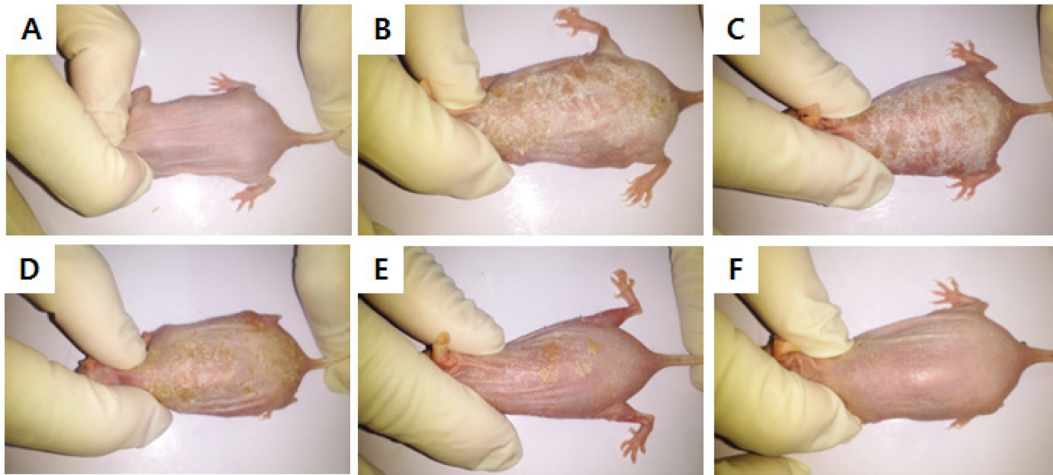


Fig. 7. The effect of *Rubus crataegifolius* leaf extracts on the dorsal phenotypes. *Rubus crataegifolius* leaf extracts were repeatedly applied to the dorsal skin of hairless mice. After 3 weeks, the difference in the skin irritation between oxazolone group and extract-treated group was determined based on the change of dorsal pathological phenotype. A, normal hairless mouse group; B, 5% oxazolone-treated group, C, 5% oxazolone-treated after EtOH group; D, 5% oxazolone-treated after *Rubus crataegifolius* leaf extract 25 µg/mL; E, 5% oxazolone-treated after *Rubus crataegifolius* leaf extract 50 µg/mL; F, 5% oxazolone-treated after *Rubus crataegifolius* leaf extract 100 µg/mL.

요 약

웰빙에 대한 지속적인 관심과 자연주의의 확산으로 안전성과 기능성이 확보된 천연 소재에 관심이 높아지고 이를 이용한 기능성 식품 개발이 지속적으로 증가하고 있다. 특히 항염 효과를 지닌 천연 소재를 찾고자 많은 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 산딸기 잎 추출물을 이용하여 기능성 천연 소재로서의 가능성을 연구하였다. 항염 활성을 조사하기 위해서 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에 LPS로 유도된 염증 반응에서 산딸기 잎 추출물의 매개체 억제 효과를 측정하였고 oxazolone을 이용하여 접촉성 피부염이 유도된 hairless 마우스를 이용하여 산딸기 잎 추출물의 항염 효과를 확인하였다. LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 COX-2, iNOS와 같은 염증성 매개체뿐만 아니라 염증성 사이토카인의 생성 및 발현이 산딸기 잎 추출물에 의하여 현저히 억제됨을 확인하였으며 이러한 산딸기 잎 추출물의 항염증효과는 NF-κB의 활성을 억제하여 나타나는 것으로 밝혀졌으며 NF-κB의 상위 신호전달경로인 MAPKs에도 영향을 미치는 것으로 증명되었다. 또한 hairless 마우스에 유도된 접촉성 피부염에 산딸기 잎 추출물을 처리하여 3주간 피부 병변을 관찰한 결과 염증 반응이 현저히 완화되는 것을 확인하였다. 이상의 결과들을 종합해보면, 산딸기 잎 추출물이 항염 효능을 가진 천연물 소재로서 활용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 다양한 염증성 질환에서 여러 매개체들의 과도한 발현이 그 질환의 원인임을 생각해 볼 때 산딸기 잎 추출물은 항염을 목적으로 하는 여러 제품들에서 다양하게 활용할 수 있는 천연물 소재가 될 것으로 판단되며, 기능성 식

품 개발에 있어 산딸기 잎 추출물의 활용성이 높아질 것으로 사료된다.

References

- Bae, IS, Shim MJ, Lee JY, Kim YC. 2012. Application tests of phellodendrin cortex water extract as functional cosmetic raw materials. *J. Invest. Cosmetol.* 8: 1-8.
- Ban HJ, Kim MY, Ko KS. 2013. A study on the cosmeceutical ingredient of the methanol extract of *Acanthopanax sessiliflorus* Seeman. *J. Kor. Soc. Beauty Cultural Arts* 2: 36-42.
- Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 474-482.
- Bobinaité R, Viskelis P, Venskutonis PR. 2012. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chem.* 132: 1495-1501.
- Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. 2001. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 20: 3921-3926.
- Chung HJ, Pyun HB, Hwang JK. 2014. Panduratin A, an activator of PPAR- α/δ , suppresses the development of oxazolone-induced atopic dermatitis-like symptoms in hairless mice. *Life Sci.* 100: 45-54.
- Chung KH, Jo HJ, Yoon JA, Song BC, An JH. 2014. Free radical-scavenging activities of Amaranth (*Amaranthus spp. L.*) seed extracts. *Food Eng. Prog.* 18: 116-123.
- de Ancos B, González EM, Cano MP. 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity

- affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4565-4570.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17: 2215-2223.
- Ghayer C, Gjoksi B, Siegenthaler B, Weber FE. 2015. N-methyl pyrrolidone (NMP) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing NF- κ B signaling. *Inflamm. Res.* 64: 527-536.
- Guan F, Wang H, Shan Y, Chen Y, Wang M, Wang Q, Yin M, Zhao Y, Feng X, Zhang J. 2014. Inhibition of COX-2 and PGE2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells by lonimacranthoide VI, a chlorogenic acid ester saponin. *Biomed. Rep.* 2: 760-764.
- Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140-155.
- Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages, tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* 144: 1425-1431.
- Huanga HP, Chang YC, Wu CH, Hung CN, Wang CJ. 2011. Anthocyanin-rich mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun. *Food Chem.* 129: 1703-1709.
- Jeon HJ, Kwon HJ. 2014. Antioxidant effects and functional evaluation of *Gynura procumbens* extracts as a collaboration material for cosmetics and functional food. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 12: 499-507.
- Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, Cho JH, Kuk YI, Hyun KH, Cho HW. 2014. Inhibitory effect of *Alopecurus aequalis Sobol.* ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells. *Korean J. Medicinal. Crop Sci.* 22: 98-104.
- Juranic Z, Zizak Z, Tasic S, Petrovic S, Nidzovic S, Lepasovic A, Stanojkovic T. 2005. Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. *Food Chem.* 93: 39-45.
- Kim BH, Lee YT, Kang KH. 2010. *Codonopsis lanceolata* inhibits inflammation through regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* 24: 80-84.
- Kim BW, Kim JI, Kim HR, Byun DS. 2014. Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoi* on lipopolysaccharides stimulated RAW264.7 cells. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* 47: 527-536.
- Kim DH, Hwan EY, Son JH. 2013. Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorius* seed extracts in RAW264.7 cell. *J. Life Sci.* 23: 55-62.
- Kim JE, Lee YK, Nam SH, Choi SI, Goo JS, Jang MJ, Lee HS, Son HJ, Lee CY, Hwang DY. 2010. The symptoms of atopic dermatitis in NC/Nga mice were significantly relieved by the water extract of *Liriope platyphylla*. *Lab. Anim. Res.* 26: 377-384.
- Kim MJ, Im JR, Yoon KS. 2009. Anti-inflammatory effects of prescription extracts containing *Forsythia viridissima* L. *J. Soc. Cosme. Scientists Korea* 35: 277-285.
- Kim MK, Lee IC. 2014. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of extracts from Blueberry (*Vaccinium ashei*) Leaf. *J. Kor. Soc. Beauty Art* 15: 109-120.
- Kim YR, Han JS. 2014. A Study of Antimicrobial and anti-oxidative activities on skin inflammation-causing microbes of supercritical green tea extract. *J. Kor. Soc. Beauty Art* 14: 71-80.
- Lee HH, Moon YS, Yun HK, Park PJ, Kwak EJ. 2014. Contents of bioactive constituents and antioxidant activities of cultivated and wild raspberries. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 32: 115-122.
- Li Y, Wu Q, Deng Y, Lv H, Qiu J, Chi G, Feng H. 2015. D(-)-Salicin inhibits the LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells and mouse models. *Int. Immunopharmacol.* 26: 286-294.
- Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, Johansson C, Schmidt PT, Herufl M, Lundberg JO, Hellstrom PM. 2006. Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus nonresponders. *World J. Gastroenterol.* 12: 971-975.
- Marina L, Kamal RM, Andrew F, Gary B, Jeremy S, Andrew RC. 2000. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4265-4274.
- Wallert M, Schmözl L, Koeberle A, Krauth V, Gleit M, Galli F, Werz O, Birringer M, Lorkowski S. 2015. α -Tocopherol long-chain metabolite α -13'-COOH affects the inflammatory response of lipopolysaccharide-activated murine RAW264.7 macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 59: 1524-1534.
- Yang HM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. 2007. Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 342-347.
- Yoon MY, Han EH, Han YS. 2013. A study on Anti-oxidant activity and whitening action of *Plantago asiatica* L. seed extract. *J. Kor. Soc. Beauty Art* 14: 259-269.
- You SH, Yoon MY. 2013. Effects of Anti-oxidant activity and anti-inflammation action on extracts isolated from *Ardisia crenata* fruit. *J. Kor. Soc. Beauty Art* 14: 197-208.
- Zhang L, Li J, Hogan S, Chung H, Welbaum GE, Zhou K. 2010. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chem.* 119: 592-599.