

석사학위논문

RAW 264.7 세포에서 산귤
(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) 과피
추출물과 sinensetin의 항염증 작용

제주대학교 대학원

생명과학과

신혜선

2010년 2월

RAW 264.7 세포에서 산귤
(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) 과피
추출물과 sinensetin의 항염증 작용

지도교수 김 세 재

신 혜 선

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 2월

신혜선의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2010년 2월

Anti-inflammatory effects of
Citrus sunki Hort. ex Tanaka peel extracts
and sinensetin in RAW 264.7 cells

Hye-Sun Shin
(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

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

2010. 2.

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Sun-Ryung Lee, Assistant Prof. of Biology

(Name and signature)

Date

Department of Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

The peel of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka is a rich source of polymethoxyflavones (PMFs), which exhibit diverse biological potential. In this study, in order to evaluate the usefulness of *C. sunki* peel as anti-inflammatory resource, the anti-inflammatory effects of its peel extracts and sinensetin were investigated in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. Ethanol extract of *C. sunki* peel (EECP) inhibited nitric oxide (NO) production, inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in a dose-dependent manner on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These activities are more stronger in immature peel extracts than mature peel. Also, EECP inhibited the production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), in gene expression levels. After then, the anti-inflammatory activity of sinensetin, which was isolated as single compound from *C. sunki* peel, were assessed. Sinensetin inhibited NO production, the expression of iNOS and COX-2 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, sinensetin promoted the generation of inhibitory kappa B- α (I κ B α), and attenuated LPS-induced phosphorylations of MAPKs such as JNK, ERK and p38, which are up-regulators of iNOS and COX-2 protein. These results suggest that the anti-inflammatory effect of sinensetin may be mediated through at least two signal pathways, the regulation of NF κ B and MAPKs dependent pathways. Thus, the potent anti-inflammatory effect of EECP may be exerted by combining the anti-inflammatory activities of several PMFs which are contained in EECP.

목 차

A B S T R A C T	1
목 차	2
LIST OF TABLE	4
LIST OF FIGURES	5
I. 서 론	7
II. 재 료 및 방 법	10
1. 시료 준비	10
2. DPPH 자유유리기 소거 활성	10
3. 세포 배양	11
4. 세포 독성 측정	11
1) MTT 분석	11
2) LDH 분석	12
5. NO 생성량 측정	12
6. Immunoblotting	13
7. Real-time PCR	14

8. 세포내 ROS 측정	17
9. 면역형광염색	17
10. 통계처리	18
III. 결 과	19
1. 산골 과피 추출물의 항염 활성	19
1) DPPH 자유유리기 소거 활성	19
2) NO 생성 억제 활성	19
3) 전염증성 매개인자 생성 억제 효과	24
4) ROS 생성 저해 활성	24
2. Sinensetin의 항염증 작용	30
1) 전염증성 매개인자 생성 억제 효과	30
2) I κ B α 생성 촉진	30
3) MAP kinases 활성화 저해	31
IV. 고 찰	39
V. 인 용 문 헌	42
VI. 요 약	50

LIST OF TABLE

Table 1. The primer sequences of the genes used in real-time PCR analysis 16
---	----------



LIST OF FIGURES

Figure 1. The free radical scavenging activity of the <i>Citrus sunki</i> extracts on DPPH assay	20
Figure 2. Cytotoxicity of the peel extracts of immature <i>Citrus sunki</i> on LPS-stimulated RAW 264.7 cells	21
Figure 3. Cytotoxicity of the peel extracts of mature <i>Citrus sunki</i> on LPS-stimulated RAW 264.7 cells	22
Figure 4. Effect of the peel extracts of <i>Citrus sunki</i> on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	23
Figure 5. Expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with the peel extracts of <i>Citrus sunki</i>	25
Figure 6. Expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with the peel extracts of <i>Citrus sunki</i>	26
Figure 7. Effect of Expression of the peel extracts of <i>Citrus sunki</i> on pro-inflammatory cytokine expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	27
Figure 8. The ROS-scavenging activity of the peel extracts of <i>Citrus sunki</i> in RAW 264.7 cells	29

Figure 9. Cytotoxicity of sinensetin on LPS-stimulated RAW 264.7 cells	32
Figure 10. Effect of sinensetin on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	33
Figure 11. Expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with sinensetin	34
Figure 12. Expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with sinensetin	35
Figure 13. Effect of sinensetin on the degradation of I κ B α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	36
Figure 14. The effect of sinensetin on NF κ B p65 translocation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	37
Figure 15. Effects of sinensetin on the activation of ERK1/2, JNK1/2 and p38 MAP kinase in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	38

I. 서론

염증이란 특정 자극에 대한 인체 조직의 방어반응 중 하나로 조직변질, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 상태를 유발하는 복잡한 병변으로 많은 질병의 원인으로 알려져 있다 (Park and Yoo, 2004; Nathan, 2002). 면역부전증과 같이 면역계에 결함이 생겨 나타나는 불충분한 면역반응은 감염과 암을 유도할 수 있다. 반면 과도한 염증 반응은 류마티스성 관절염, 동맥경화, 당뇨, 알츠하이머와 같은 질환에서 병적상태와 죽음의 원인이 된다 (Tracey, 2002). 체내에서 일어나는 염증과정에서 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증매개 인자들이 과량으로 생성된다 (Posadas *et al.*, 2000; Tsatsanis *et al.*, 2006).

NO는 체내에서 염증반응 뿐만 아니라 방어기능, 신호전달기능, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있으며 (Nathan 1997; Palmer *et al.*, 1987), nitric oxide synthases (NOSs)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다 (Knowles and Moncada, 1994). NOS는 세포 내에 항상 존재하는 neuronal NOS (nNOS)와 endothelial NOS (eNOS), 그리고 interferon- γ , lipopolysaccharide (LPS), cytokine과 같은 자극에 노출되는 경우에만 발현되는 inducible NOS (iNOS) 등 세 가지 형태로 존재한다 (Lee *et al.*, 2004; Weisz *et al.*, 1996). 이들 NOS 중에서 염증반응과 밀접한 iNOS는 일반적으로 박테리아를 죽이고 종양을 제거하는 목적으로 NO를 생성하지만 병리적인 원인에 의해 과잉 생성될 경우 염증과 종양을 유발하며 (Nathan, 1992; McCartney-Francis *et al.*, 1993) 조직손상, 유전자의 변이 및 신경손상을 일으킨다 (Stuehr *et al.*, 1991; Weisz *et al.*, 1996).

Prostaglandins (PGs)는 cyclooxygenase (COX)에 의해 arachidonic acid로부터 생성되며 세포성장 및 분열, 세포부착, 면역감시 등에 영향을 미친다 (Surh *et al.*, 2001). COX는 COX-1과 COX-2, 두 가지 형태로 존재하며 (Posadas *et al.*, 2000) 이들의 분자량은 모두 70kDa 정도로 (Moon *et al.*, 1998) 60%의 아미노산 유사성을 가진다 (Tsatsanis *et al.*, 2006). COX-1은 거의 모든 세포에

서 발현되며 위 점막 보호, 신장혈류량 조절, 혈소판 응집 제어와 같은 생리학적 기능 유지에 관여한다. 반면에 COX-2는 생리학적으로 정상상태에서는 아주 드물게 검출되지만 섬유아세포, 내피세포, 단핵구와 같은 일부 세포에서 cytokine, 호르몬, 성장인자 등에 의해 빠르고 순간적으로 발현된다 (Posadas *et al.*, 2000; Surh *et al.*, 2001; Tsatsanis *et al.*, 2006; Eibl *et al.*, 2003; DeWitt and Smith, 1995). 염증부위에서는 단핵구와 대식세포들이 LPS 또는 interleukin-1 (IL-1)에 의해 자극을 받아 COX-2를 발현하게 되며, 이로 인해 생성된 PGs에 의해 발열과 통증을 동반한 염증 반응이 지속된다 (DeWitt and Smith, 1995).

대식세포는 거의 모든 조직에 존재하는 면역계 세포로 단핵구와 함께 선천성 면역반응뿐만 아니라 후천성 면역반응에도 관여하여 생체방어에 중요한 역할을 한다. LPS는 그람음성균 세포외막의 구성성분으로 인체가 세균에 감염되었을 때 폐혈성 쇼크상태를 야기하는 내독소로 알려져 있다 (Parham, 2006). 생쥐유래 RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하면 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-12 (IL-12)와 같은 전염증성 cytokine의 합성이 증가되고 (Lee *et al.*, 2004; Mukaida *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2008), iNOS와 COX-2 단백질 발현이 유도된다 (Liu and Malik, 2006). 그리고 LPS에 의한 전염증성 cytokine 및 염증 매개 단백질의 발현은 nuclear factor kappa B (NF κ B)와 mitogen activated protein (MAP) kinase의 활성화 경로를 통해 일어난다고 알려져 있다 (Liu and Malik, 2006; Aga *et al.*, 2004). 이처럼 RAW 264.7 대식세포는 LPS에 의해 확립된 염증반응을 유도하기 때문에 항염증 소재 탐색 연구에 광범위하게 사용되고 있다.

감귤류는 동양 전통의학에서 기관지 천식 또는 심장혈류 순환을 개선시키는 약재로 사용되어 왔다 (Choi *et al.*, 2007; Cha and Cho, 2001). 감귤류 과피에는 60여종 이상의 flavonoids가 함유되어 있으며, 이들에 의해 항산화 작용 (Choi *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009), 항염증작용 (Choi *et al.*, 2007), 지질대사 개선 작용 (Monforte *et al.*, 1995; Cha *et al.*, 2001) 등과 같은 다양한 생리활성들이 나타난다고 알려져 있다. 제주 재래귤의 일종인 산귤 (*Citrus sunki*

Hort. Tanaka) 과피 또한 다양한 생리활성들을 가지고 있다고 보고되어 있다 (Kang *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2007). 특히, 산귤 과피에는 성숙시기에 따라 함량변화를 보이는 nobiletin, tangeretin 등과 같은 다기능성 polymethoxyflavones (PMFs)이 다량 함유하고 있어 (Choi *et al.*, 2007), 산귤 과피에 대한 건강증진 소재로서의 활용 가능성에 대한 연구가 요구되고 있다. 본 연구는 산귤 과피 추출물과 산귤 과피에서 분리한 sinensetin의 염증반응 억제 기전을 분자생물학적으로 조사하기 위하여 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시료 준비

본 연구에 사용된 시료는 제주 서귀포시 효돈동에서 2008년 1월에 채집된 성숙한 과실, 2008년 9월에 채집된 미성숙한 과실을 사용하였다. 산골 과실로부터 과피와 과육을 분리한 후 분리된 과피를 충분히 건조시키고 분쇄하여 과피 분말시료를 획득하였다. 과피 추출물을 얻기 위하여 분말시료 50 g에 80% 에탄올(EtOH) 500 ml을 첨가하여 실온에서 3일간 2회 추출하였다. 이렇게 얻은 추출물은 여과지를 이용해 여과 후 회전농축기로 농축하고 동결건조하여 사용하였다. 시료는 실험에 사용하기 전 밀봉하여 냉동보관(-20℃)하였다. 그리고 sinensetin은 Ko *et al.* (unpublished data)의 방법에 따라 분리하여 사용하였다.

2. DPPH 자유유리기 소거 활성

시료의 전자공여능 측정은 Blois 방법 (Blois, 1958)에 따라 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. 먼저 메탄올에 희석시킨 80% 에탄올 추출물을 여러 가지 농도로 100 µl씩 96 well plate에 분주하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하였다. 이후 96 well plate를 차광상태에서 20분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값은 시료의 흡광도를 기준으로 표준화하였고, 대조군으로는 ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였으며 소거능은 다음과 같은 식으로 산출하였다. DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 IC₅₀으로 표시하였으며, 각 시료에 대해 3회 반복 실험하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$$

A_{control} = 메탄올만 첨가한 반응액의 흡광도

A_{sample} = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

3. 세포배양

Mouse RAW 264.7 대식세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

4. 세포 독성측정

1) MTT 분석

시료가 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위해 미토콘드리아의 환원력을 측정하는 MTT 분석을 사용하였다 (Ferrari *et al.*, 1990). RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 96 well cell culture plate에 3×10^4 cells/well로 넣고 24시간 배양 후 여러 농도의 시료를 넣고 한 시간 배양하고 lipopolysaccharide (LPS; Sigma, USA)를 100 ng/ml이 되도록 첨가한 후 22시간 배양하였다. 이후 3-(4,5-dimethylthazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, USA)를 최종 0.4 mg/ml이 되도록 넣고 1시간 배양 후 배지를 제거하였다. 200 μ l의 dimethylsulfoxide (DMSO; Amresco, USA)를 가하여 formazan 침전물을 용해시키고 microplate reader (Bio-tek, USA)로 595 nm 파장을 이용해 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리한 군의 세포독성은 시료를 처리하지 않은 군과 흡광

도 값을 비교하여 평가하였으며 세포독성은 다음과 같은 식에 의해 산출하였다. 시료는 3-4회 반복 실험하였으며 아래 식에 의해 산출된 값의 평균으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{lower control}}) / (A_{\text{upper control}} - A_{\text{lower control}})$$

2) LDH 분석

세포 배양액을 이용하여 세포 손상을 측정하는 방법인 LDH 분석을 수행하였다 (He *et al.*, 2002). RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 96 well cell culture plate에 3×10^4 cells/well로 넣고 24시간 배양 후 여러 농도의 시료를 넣고 한 시간 배양하고 LPS를 100 ng/ml이 되도록 첨가한 후 22시간 배양하였다. 이후 배양액 50 μ l에 LDH 측정 혼합액(LDH Cytotoxicity Detection Kit; TaKaRa, Japan) 50 μ l를 넣고 반응시켰고 HCl을 최종 0.2 N이 되도록 처리하여 반응을 정지시켰다. 이를 microplate reader로 490 nm 파장을 이용해 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 세포에 Triton X-100 (Sigma, USA) 용액을 최종 1%가 되도록 처리한 세포 배양액을 사용하였으며 세포 상해 비율은 다음과 같은 식에 의해 산출하였다. 시료는 3-4회 반복 실험하였으며 아래 식에 의해 산출된 값의 평균으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 \times (A_{\text{sample}} - A_{\text{lower control}}) / (A_{\text{upper control}} - A_{\text{lower control}})$$

$A_{\text{upper control}}$ = Triton-X100 용액의 첨가로 최대 방출되는 LDH 활성

$A_{\text{lower control}}$ = 시료와 Triton-X100 용액의 미처리 방출되는 LDH 활성

A_{sample} = 시료를 처리한 군에서 방출되는 LDH 활성

5. NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO는 세포 배양액에 Griess 시약을 첨가하는 방법으로 nitrite 형태의 NO 양을 측정하였다. 세포배양액 100 μ l와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylene diamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용해 표준곡선을 구하고 이를 이용해 생성된 NO 값을 산출하였다.

6. Immunoblotting

RAW 264.7 세포를 12 well cell culture plate에 5×10^5 cells/well로 넣고 24시간 배양 후 시료를 넣고 한 시간 배양하고 LPS를 100 ng/ml이 되도록 첨가해 18-24시간 배양하였다. 이후 세포를 차가운 PBS를 이용해 2회 세척하고 lysis buffer [1 \times RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, Lake Placid, NY, USA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM NaVO_4 , 1mM 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 상등액만 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 250 mA, 180분 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 (1:5,000, Calbiochem, USA), COX-2 antibody (1:5,000, BD Transduction Laboratories, USA), phospho-ERK1/2 antibody (1:500, Santa Cruz, USA), ERK1/2 antibody (1:1,000, Santa Cruz, USA), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody, SAPK/JNK antibody, phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182), p38 MAP kinase (1:1,000, Cell Signaling Tech,

USA), I κ B α antibody (1:1,000, Santa Cruz, USA), β -actin antibody clone AC-74 (1:10,000, Sigma, USA)를 이용하여 4°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. 단백질을 Enhanced chemiluminescence (ECL) 방법을 이용해 X-ray 필름으로 결과를 확인하였다.

7. Real-time PCR

Real time PCR 분석을 위해 RAW 264.7 세포를 12 well cell culture plate에 1×10^6 cells/well로 넣고 18시간 배양 후 여러 농도의 시료를 넣고 한 시간 전 배양하고 이후 LPS를 100 ng/ml이 되도록 첨가해 6시간 배양하였다. 세포의 total RNA는 TRI reagent (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH)를 이용하여 분리하였다. 배양이 끝난 세포에 TRI reagent를 첨가하여 균질화 한 후, chloroform을 첨가하여 원심분리(12,000 g, 15 min, 4°C)하였다. 상등액을 회수하여 동량의 isopropanol을 첨가하고 원심분리(12,000 g, 8 min, 4°C)하여 RNA를 침전시키고 이를 75% 에탄올로 세척하고 원심분리 (7,500 g, 5 min, 4°C) 후 상등액을 제거하고 건조시켰다. RNA는 nuclease-free water (Amresco, USA)에 용해시킨 후 260 nm 파장으로 흡광도를 측정하여 정량하였다. 260 nm/280 nm 흡광도 비율이 1.6-1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료를 실험에 사용하였다.

cDNA는 Maxime RT PreMix Kit (Intron biotechnology, Korea)를 이용하여 합성하였다. 1 μ g total RNA 와 nuclease-free water 를 최종 20 μ l가 되도록 premix tube에 첨가 한 후 45°C에서 60분, 95°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 nuclease-free water 를 첨가하여 최종 부피가 50 μ l 되도록 하여 사용하였다.

유전자들의 발현 분석을 측정하기 위해 iQ SYBR Green Supermix (SYBR

Supermix; Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 반응은 cDNA 1 μ l, primer 각 10 pmole, 2 \times SYBR Supermix 5 μ l를 혼합한 후 nuclease-free water를 가하여 반응액을 10 μ l에 맞춘 다음 Chromo 4TM Real time PCR Detector (Bio-Rad, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C/ 3분간 initial activation step을 거치고 95 $^{\circ}$ C/ 20초간 denaturation, 65 $^{\circ}$ C/ 20초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C/ 30초간 extension의 과정을 44회 반복하여 증폭하였다. 모든 cycle이 완료된 후 65 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C까지 반응시켜 primer의 melting curve 분석을 실시하였다. 결과는 Chromo 4 Real-Time PCR Detection system의 Gene expression analysis (Bio-Rad, USA)를 이용해 분석하였다. 모든 PCR 산물은 house keeping gene인 β -actin에 대해 상대정량 하였다. Real-time PCR 에서 사용된 primer의 염기서열은 Table 1. 에 나타내었다.

Table 1. The primer sequences of the genes used in real-time PCR analysis.

Gene	Primer sequences	
IL-1 β	Forward	5'-CAG GAT GAC ATG AGC ACC-3'
	Reverse	5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3'
IL-6	Forward	5'-GTA CTC CAG AAG ACC AGA GG-3'
	Reverse	5'-TGC TGG TGA CAA CCA CGG CC-3'
TNF- α	Forward	5'-TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG-3'
	Reverse	5'-CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3'
β -actin	Forward	5'-AGG CTG TGC TGT CCC TGT AT-3'
	Reverse	5'-ACC CAA GAA GGA AGG CTG GA-3'

8. 세포내 ROS 측정

세포내에서 생성되는 활성산소종은 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 측정하였다 (Choi *et al.*, 2007). RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 96 well cell culture plate에 3×10^4 cells/well 로 넣고 24시간 배양하였다. 이후 세포가 들어있는 96 well plate에 CM-H₂DCFDA를 최종 50 μ M이 되도록 넣고 차광 상태에서 30분간 배양하였다. 배양 된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 여러 농도의 시료를 넣고 한 시간 배양 하고 LPS를 500 ng/ml이 되도록 첨가해 28시간 배양 후 형광측정장치를 이용하여 485 nm/520 nm의 파장에서 형광을 측정하였다. 시료는 5회 반복 실험하여 평균값으로 나타내었다.

9. 면역형광염색

RAW 264.7 세포를 4 well chamber slide (Lab-Tek, USA)에 4×10^5 cells/well로 넣고 24시간 배양 후 시료를 넣고 한 시간 배양하고 LPS를 100 ng/ml이 되도록 처리하여 40분간 자극을 주었다. 이후 세포를 차가운 PBS를 이용해 3회 세척한 후 3.7% formaldehyde로 상온에서 15분간 고정시키고 다시 PBS로 세척하였다. 고정된 세포에 Triton X-100이 0.2% 포함된 PBS를 처리하여 상온에서 20분간 반응시키고, 3% BSA를 포함한 PBS를 넣고 상온에서 1시간 반응 후 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 NF κ B p65 antibody (Santa Cruz, USA)를 BSA가 3% 포함된 PBS 용액에 1:50 으로 희석하여 4°C에서 하루 밤 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 세포는 1×PBS 용액으로 3회 세척 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated 된 2차 항체 (Santa Cruz, USA)를 1:50으로 희석하여 상온에서 1시간 반응한 후 1×PBS 용액으로 3회 세척하였다. 핵의 위치를 확인하기 위해 DAPI를 1 μ g/ml의 농도로 5분간 처리하였고 이후 1×PBS로 3회 세척 후 공초점레이저스

케닝현미경 (FV500. Olympus Optical Co., Japan)을 사용하여 관찰하였다.

10. 통계학적 분석

실험결과는 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 으로 나타냈으며 student's t -test로 통계학적 유의성을 검증하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 산굴 과피 추출물의 항염 활성

1) DPPH 자유유리기 소거 활성

성숙 정도에 따른 과피 추출물의 DPPH의 자유유리기 소거 활성을 측정한 결과, 미성숙 산굴 과피 추출물의 IC_{50} 값은 $882.6 \pm 51.4 \mu\text{g/ml}$ 로 산출되었고 성숙한 산굴 과피 추출물의 경우 농도 의존적으로 자유유리기를 소거하는 경향은 보이나 IC_{50} 값은 실험 농도 범위 내에서 산출할 수 없었다. 산굴 과피 추출물의 DPPH 소거 활성은 대조군으로 사용된 ascorbic acid ($IC_{50}=35.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$)와 비교해 낮았다. 그러나 미성숙 산굴 과피 추출물과 성숙 과피 추출물의 활성을 비교한 결과, $250 \mu\text{g/ml}$ 농도부터 미성숙 산굴 과피 추출물이 성숙 과피 추출물보다 유의적으로 높은 자유유리기 소거 활성을 보였다 (Figure 1).

2) NO 생성 억제 활성

우선 RAW 264.7 대식세포에 산굴 과피 추출물의 세포독성을 측정하고자 MTT와 LDH 분석을 수행하여 미성숙 및 성숙 과피 추출물 모두 사용된 농도 범위 ($9.4\text{--}300 \mu\text{g/ml}$) 에서 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (Figure 2, Figure 3). 이후 NO 생성을 측정한 결과 미성숙 및 성숙 산굴 과피 추출물 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다. DPPH 자유유리기 소거활성과 마찬가지로, NO 생성 억제 활성 또한 미성숙 과피 추출물이 성숙 과피 추출물 보다 높게 나타났다 (Figure 4).

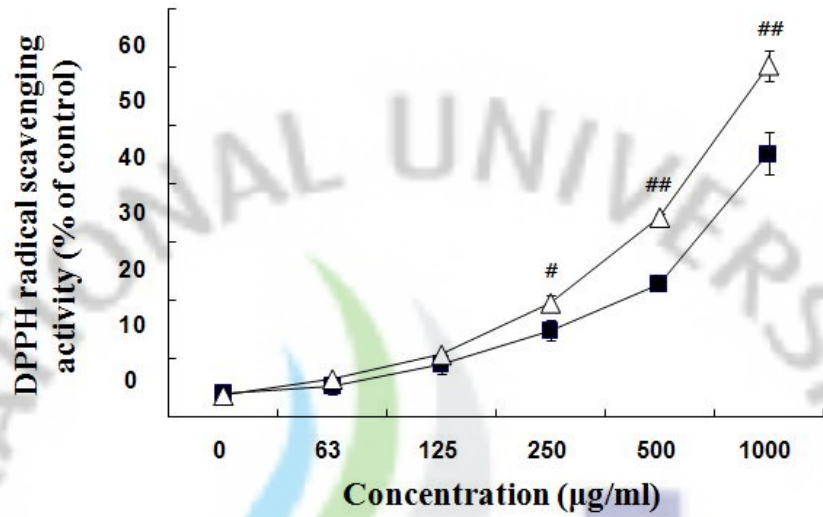


Figure 1. The free radical scavenging activity of the *Citrus sunki* extracts on DPPH assay. The data expressed as means \pm S.E. of three determinations. # $P < 0.05$, ## $P < 0.005$ compared to mature peel extract group. (Δ : Extract of immature peel, \blacksquare : Extract of mature peel)

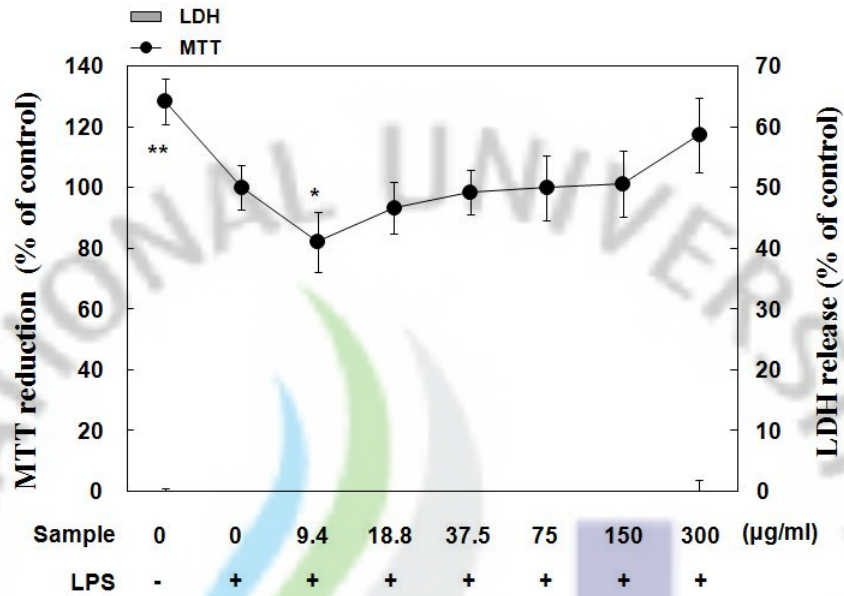


Figure 2. Cytotoxicity of the peel extracts of immature *Citrus sunki* on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150, 300 µg/ml) of immature peel extract for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data expressed as means ± S.E. of four determinations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared to positive control group.

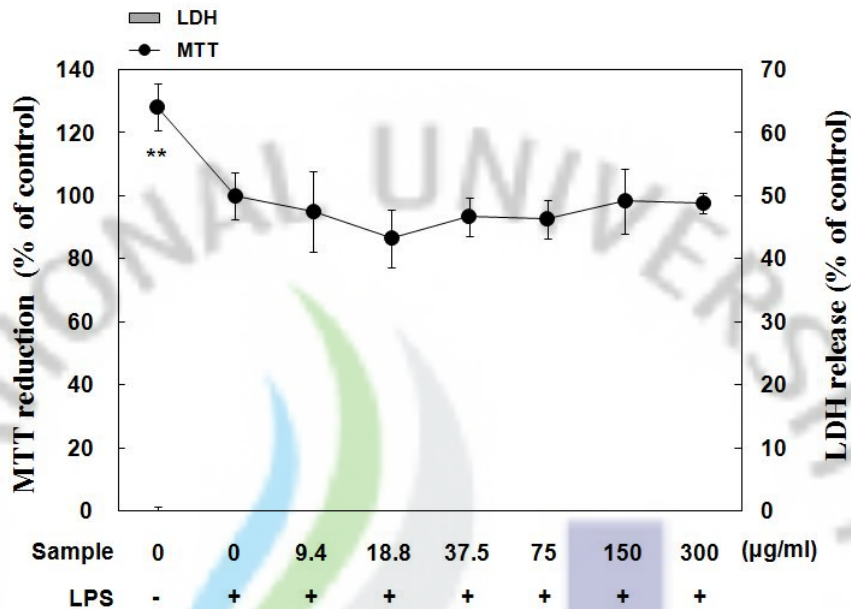


Figure 3. Cytotoxicity of the peel extracts of mature *Citrus sunki* on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150, 300 µg/ml) of mature peel extract for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data expressed as means \pm S.E. of four determinations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared to positive control group.

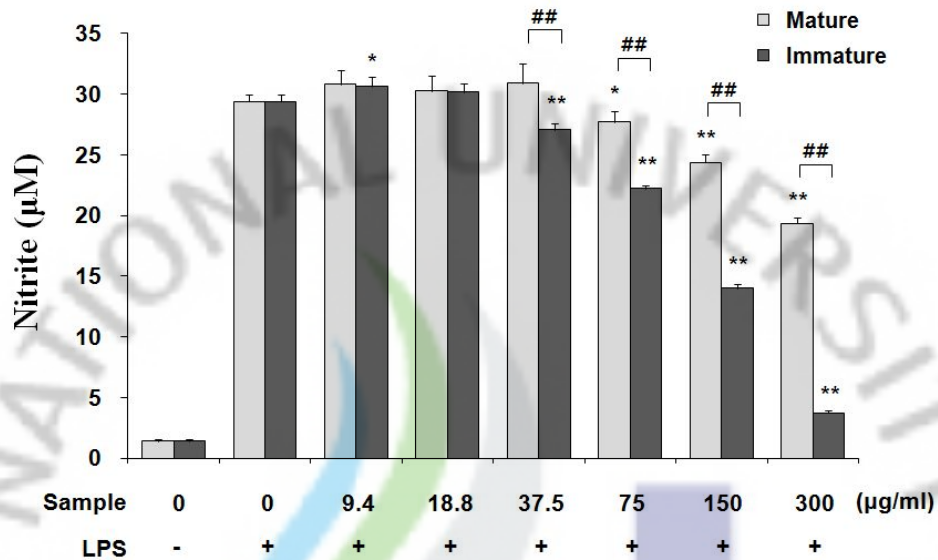


Figure 4. Effect of the peel extracts of *Citrus sunki* on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cell were incubated with the indicated concentrations (0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150, 300 µg/ml) of each extracts for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. The data expressed as means ± S.E. of four determinations. # $P < 0.05$, ## $P < 0.005$ compared to mature peel extract group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared to positive control group.

3) 전염증성 매개인자(iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성 억제 효과

산굴 과피 추출물이 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 Western blot 기법으로 확인하였다. RAW 264.7 대식세포에 LPS를 단독으로 처리하였을 때 iNOS와 COX-2 단백질 발현양이 증가됨을 확인할 수 있었다. 그러나 LPS를 처리하기 1시간 전에 산굴 과피 추출물을 75, 150, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하면 이들 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 마찬가지로 미성숙 과피 추출물이 성숙 과피 추출물에 비해 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 더 강력하게 저해하였다 (Figure 5, Figure 6).

또한, RAW 264.7 대식세포에서 산굴 과피 추출물이 전염증성 cytokines 발현에 미치는 영향을 real-time PCR 방법으로 분석하였다. 세포에 100 ng/ml의 LPS를 처리하고 6시간 경과되면 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현이 유도되었고, 과피 추출물을 1시간 동안 전 처리하면 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 저해됨을 관찰 할 수 있었다 (Figure 7). 그러나 성숙 과피 추출물은 IL-1 β 의 mRNA 발현은 억제하지 못하였다 (Figure 7B). 마찬가지로 미성숙 과피 추출물이 성숙 과피 추출물에 비해 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , 그리고 IL-6의 mRNA 발현을 더 강력하게 저해하였다 (Figure 7).

4) ROS 생성 저해 활성

추출물이 RAW 264.7 대식세포에서 LPS를 처리하여 생성되는 활성산소종 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 산굴 추출물을 전 처리하고 LPS로 자극하여 유도되는 활성산소종을 측정한 결과, 산굴 과피 추출물이 세포내에서 생성되는 활성산소종을 농도 의존적인 양상으로 감소시킴을 보여주었다 (Figure 8). 성숙 과피 추출물에 비해 미성숙 산굴 과피 추출물이 세포내 활성산소종 생성을 강하게 저해하였다 ($##P < 0.005$ at 300 $\mu\text{g/ml}$).

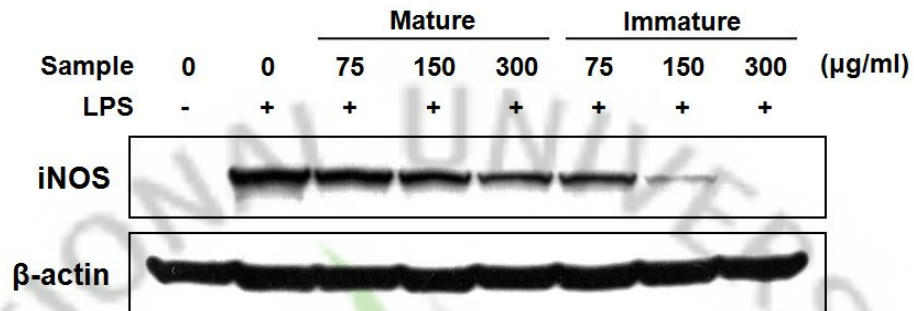


Figure 5. Expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with the peel extracts of *Citrus sunki*. Cells were treated with the indicated concentration (75, 150, 300 µg/ml) of each extracts for 1 h, and then the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 18 h. The protein level were determined by Western blot analysis.

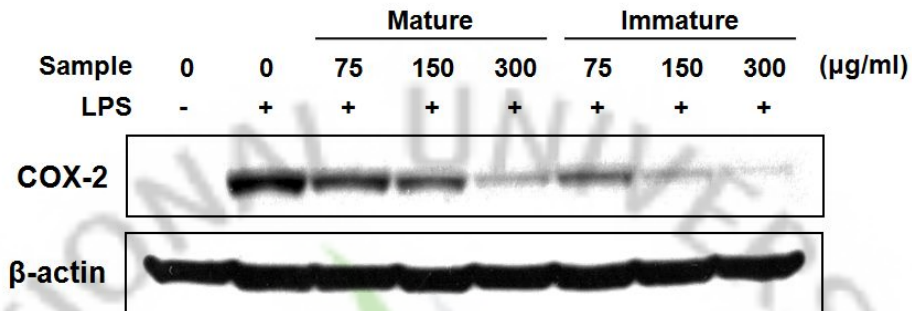
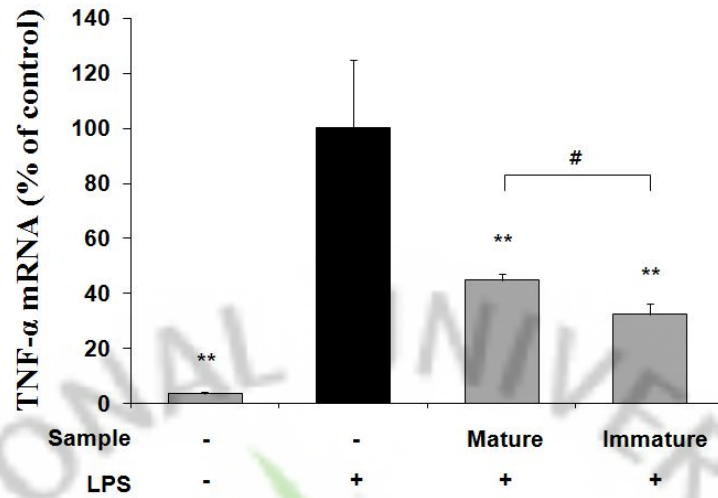


Figure 6. Expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with the peel extracts of *Citrus sunki*. Cells were treated with the indicated concentration (75, 150, 300 µg/ml) of each extracts for 1 h, and then the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 18 h. The protein level were determined by Western blot analysis.

A.



B.

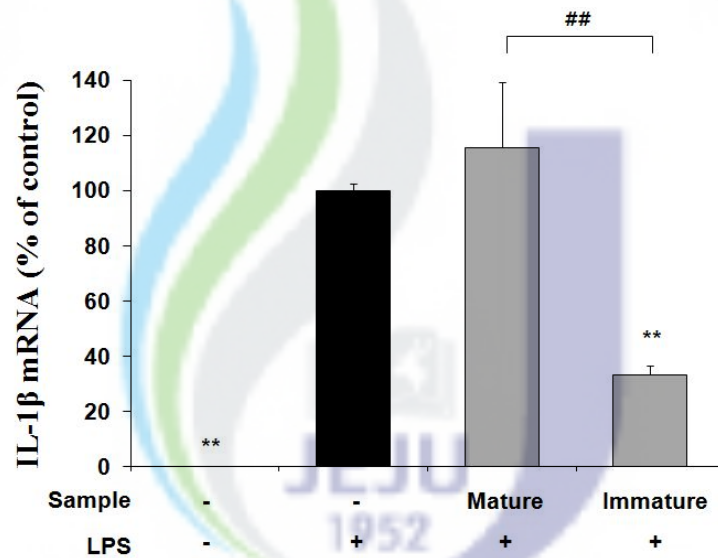


Figure 7-1. Effect of Expression of the peel extracts of *Citrus sunki* on pro-inflammatory cytokine expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with the 150 μ g/ml of each extracts for 1 h, and then the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 6 h. Each mRNAs were analyzed by Real-time PCR assay. (A) TNF- α and (B) IL-1 β mRNA expression level normalized by β -actin. # P < 0.05, ## P < 0.005 compared to mature peel extract group. * P < 0.05, ** P < 0.005 compared to positive control group.

C.

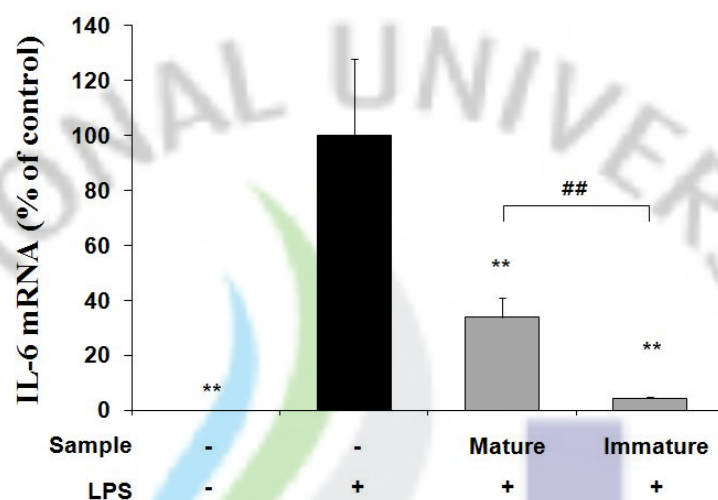


Figure 7-2. Effect of Expression of the peel extracts of *Citrus sunki* on pro-inflammatory cytokine expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with the 150 $\mu\text{g/ml}$ of each extracts for 1 h, and then the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 6 h. Each mRNAs were analyzed by Real-time PCR assay. (C) IL-6 mRNA expression level normalized by β -actin. # $P < 0.05$, ## $P < 0.005$ compared to mature peel extract group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared to positive control group.

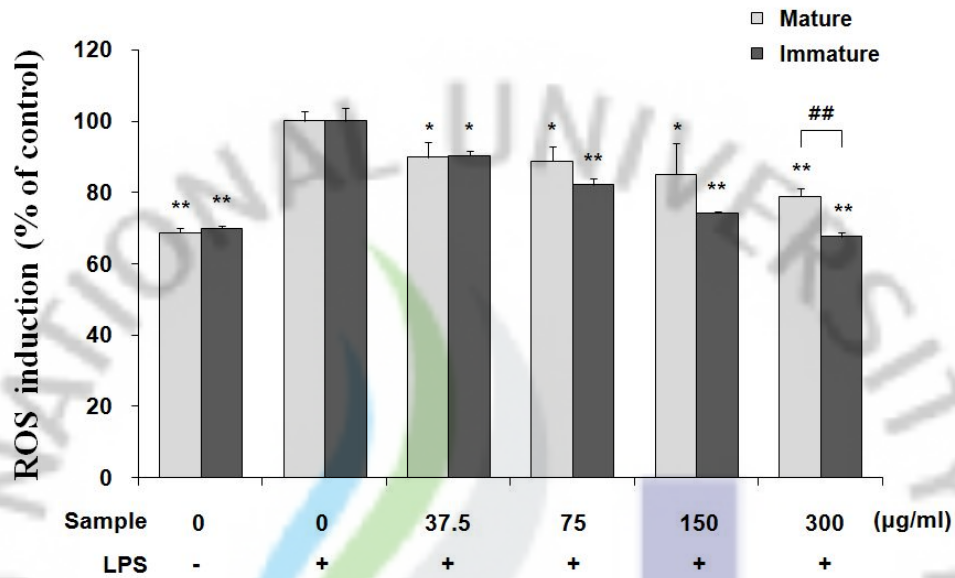


Figure 8. The ROS-scavenging activity of the peel extracts of *Citrus sunki* in RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 1 h with the indicated concentrations (0, 37.5, 75, 150, 300 µg/ml) of each extract, and then incubated with LPS (100 ng/ml) for 28 h. The data are expressed as means \pm S.E. of three determinations. # $P < 0.05$, ## $P < 0.005$ compared to mature peel extract group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared to positive control group.

2. Sinensetin의 항염증 작용

일반적으로 PMFs를 포함한 플라보이드류 함량은 성숙 과피 보다는 미성숙 과피에 더 많이 함유되어 있다. 따라서 미성숙 과피 추출물이 성숙 과피 추출물 보다 더 좋은 항염 활성을 보여 주는 것으로 해석할 수 있다. 후속연구로서 미성숙 과피에서 분리한 PMFs 중에서 항염 기전이 아직 밝혀져 있지 않는 sinensetin의 항염증 작용을 조사하였다.

1) 전염증성 매개인자 생성 억제 효과

우선 sinensetin의 적정 처리 농도를 결정하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에서 sinensetin의 세포독성을 확인하였다 (Figure 9). 세포독성을 나타내지 않는 농도에서 sinensetin은 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다. 100 μ M sinensetin을 처리한 세포에서 NO 생성은 40% 이상까지 억제됨을 관찰할 수 있었다 (Figure 10). 이러한 sinensetin에 의한 NO 생성 억제가 염증 매개인자를 생성하는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 조절을 통해 일어나는지를 확인하기 위하여 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 Western blot 방법으로 분석하였다. 예상한 것처럼 sinensetin은 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 저해하였다 (Figure 11, Figure 12).

2) I κ B α 생성 촉진 (혹은 보호)

Sinensetin에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 저해가 NF κ B의 경로를 통해 일어나는지를 확인하기 위하여 sinensetin을 처리한 세포에서 NF κ B의 세포질 요소인 I κ B α 단백질 양을 Western blot 기법으로 분석하였다. Figure 13에서 보는 바와 같이 세포에 LPS 처리하면 I κ B α 가 급속하게 분해되어 20분까지는 세포질에서 I κ B α 단백질이 검출되지 않지만, 40분이 지나면 세포질에 I κ B α 가 축적되기 시작한다. 그러나 50 μ M sinensetin을 전처리한 세포에서는 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 I κ B α 단백질 생성이 빠르게 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 sinensetin이 I κ B α 생성을 촉진하는데 관여할 수 있다는 것을 의미하였다. 또한, Figure 13에서 보여준

sinensetin을 전 처리한 세포와 전 처리하지 않고 LPS 만을 처리한 세포에서 I κ B α 양적 차이가 핵으로 전이된 NF κ B p65의 양이 차이를 나타내는지를 확인하기 위하여 면역형광염색 기법으로 p65의 세포내 위치를 확인하였다. Figure 14에서 보는 바와 같이 시료와 LPS를 처리하지 않은 음성 대조군 세포에서는 대부분의 p65가 세포질에 존재하였고 (Figure 14, control), LPS 처리하여 40분이 경과한 세포에서는 p65 단백질이 핵으로 전이되었다 (Figure 14, LPS). 그러나 sinensetin을 전 처리한 후 LPS를 처리한 세포에서는 음성 대조군과 유사하게 대부분의 p65 단백질이 세포질에 존재하고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 14, sinensetin + LPS).

3) MAP kinases 활성화 저해

Sinensetin의 항염증 작용이 MAP kinases 경로와 관련성이 있는지를 확인하기 위하여 세포에 sinensetin을 1시간 동안 전 처리한 후 LPS로 자극을 주면서 시간별로 ERK, JNK, p38 인산화 정도를 분석하였다 (Figure 15). Sinensetin은 ERK의 초기 (30분) 인산화에는 영향을 끼치지 않았지만, LPS 자극 후 1시간부터는 대조군에 비해 인산화를 감소시키는 활성을 보였다. 또한, sinensetin은 LPS에 의한 초기 JNK와 P38 활성화에는 영향을 주지 않았지만, 6시간 이후부터는 sinensetin은 대조군에 비해 분명하게 이들의 활성화를 저해하는 양상을 보여 주었다 (Figure 15).

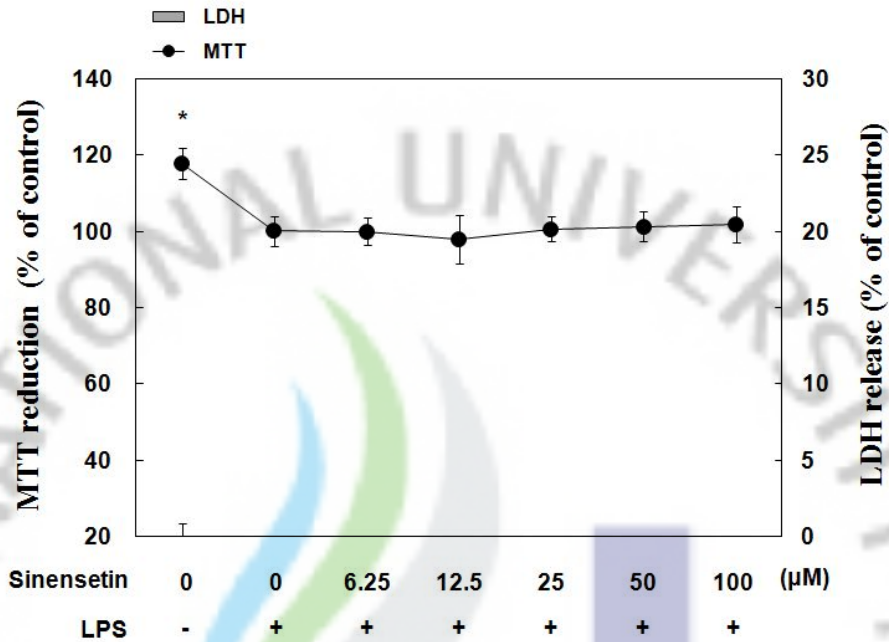


Figure 9. Cytotoxicity of sinensetin on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cell were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) of sinensetin for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data expressed as means ± S.E. of three determinations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared to positive control group.

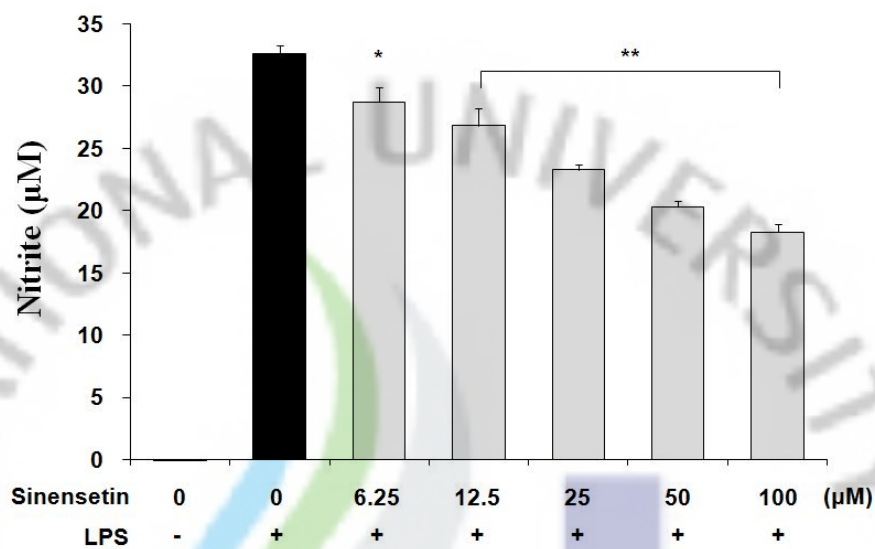


Figure 10. Effect of sinensetin on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cell were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM) of sinensetin for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. The data expressed as means \pm S.E. of three determinations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared to positive control group.

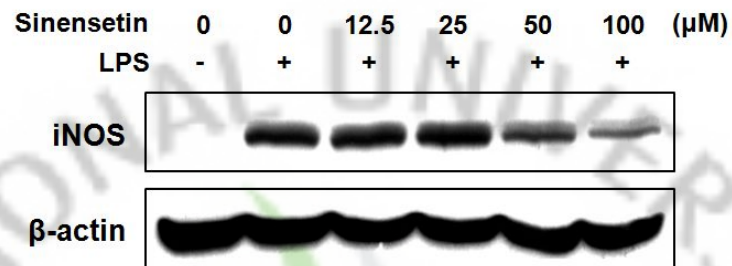


Figure 11. Expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with sinensetin. Cells were treated with the indicated concentration (0, 12.5, 25, 50, 100 μ M) of sinensetin for 1 h, and then the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. The protein level were determined by Western blot analysis.

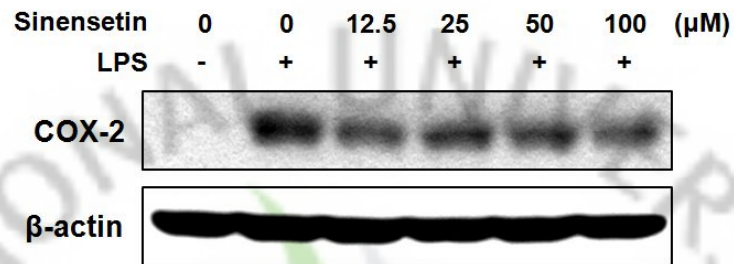


Figure 12. Expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with sinensetin. Cells were treated with the indicated concentration (0, 12.5, 25, 50, 100 μ M) of sinensetin for 1 h, and then the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. The protein level were determined by Western blot analysis.

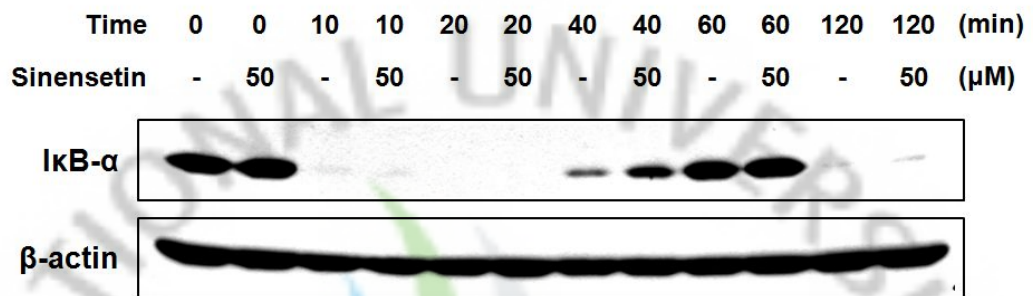


Figure 13. Effect of sinensetin on the degradation of I κ B α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cell were incubated with sinensetin (50 μ M) for 1 h, and then stimulated the LPS (100 ng/ml) for the indicated times (0, 10 20 40 60 120 min). The protein level were determined by Western blot analysis.

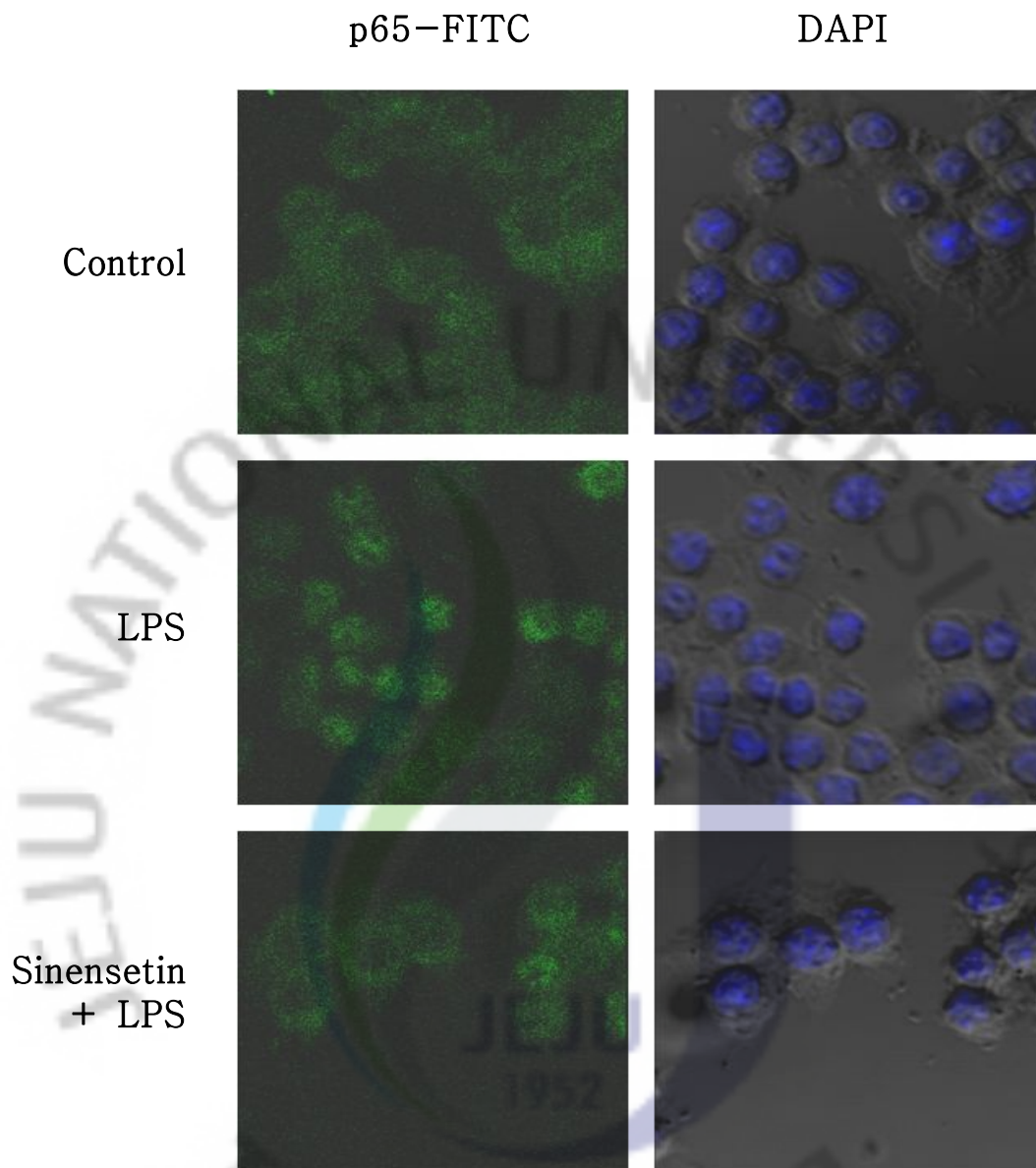


Figure 14. The effect of sinensetin on NF κ B p65 translocation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Subcellular localization of p65 NF κ B was examined using immunofluorescence staining and analyzed under confocal microscopy. Cell were treated with sinensetin (100 μ M) for 1 h before the addition of LPS for 40 min. Cell were stained with antibodies to NF κ B p65 (shown in green) and DAPI (shown in blue).

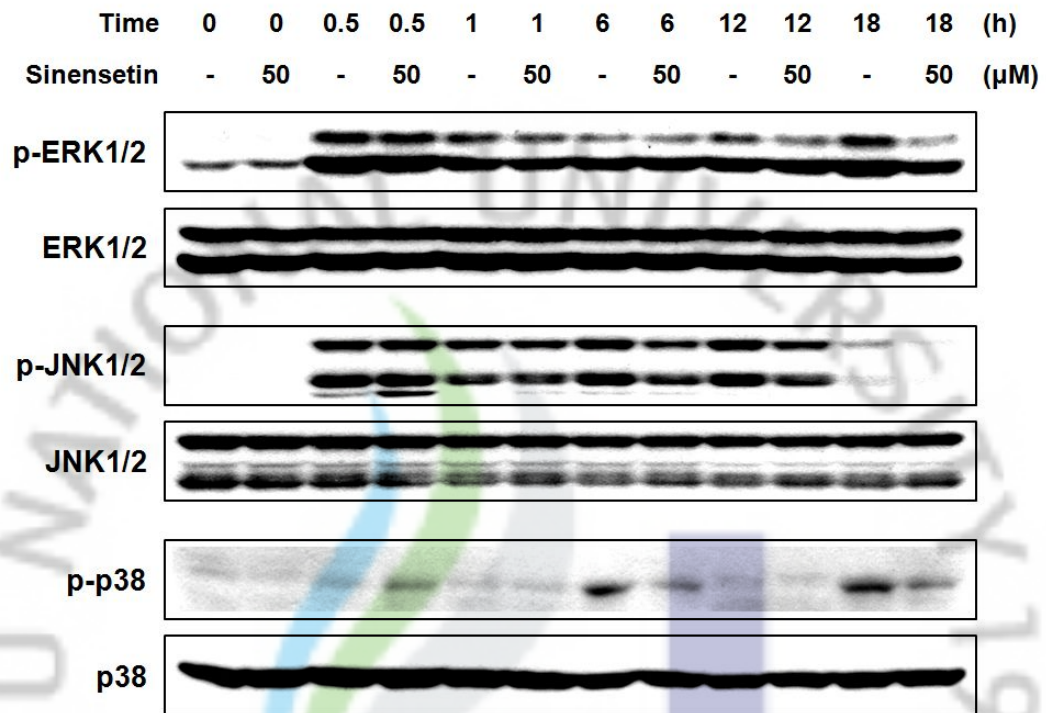


Figure 15. Effects of sinensetin on the activation of ERK1/2, JNK1/2 and p38 MAP kinase in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cell were incubated with sinensetin (50 μ M) for 1 h, and then stimulated the LPS (100 ng/ml) for the indicated times (0, 0.5, 1, 6, 12, 18 h). The protein level were determined by Western blot analysis.

IV. 고찰

제주도에는 오래 전부터 재배되어 12여종의 재래귤들이 있다. 재래귤 중에서도 미성숙 산귤 과피는 다양한 생리활성효과를 가지는 polymethoxyl flavones (PMFs)을 비교적 많이 함유하고 있으며, 대식세포에서 NO 소거능 역시 다른 감귤과 비교해 높은 소거능을 가지는 것으로 보고되었다 (Choi *et al.*, 2007). 본 연구에서는 제주도에서 소규모로 재배되고 있는 산귤 과피가 인체 건강증진 소재로서의 활용가능성이 있는지를 평가하기 위하여 산귤 과피 유래 추출물과 화합물의 항염 활성을 분자생물학적으로 연구하였다.

산귤 과피 추출물은 DPPH 자유유리기 소거능과 대식세포에서 활성산소종의 생성을 억제하였다. 이러한 항산화 활성은 PMFs을 포함한 flavonoids 함량이 높은 미성숙 과피 추출물에서 월등하게 높게 나타났다. 체내에서 생성되는 자유유리기는 생명유지와 관련하여 중요한 역할을 하지만 (McCord, 2000) 활성산소종과 함께 체내에서 산화스트레스로 작용해 각종 질병의 근원이 되기도 한다 (Cho *et al.*, 2008; Delanty and Dichter, 1998). 최근 이러한 산화적 손상을 방어하는 기작을 통해 질병을 억제하는 다양한 항산화제의 연구가 활발히 진행되고 있다 (Stanely Mainzen Prince and Menon, 2001; Son *et al.*, 2004). 활성산소종은 염증반응에서 NF κ B 활성화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 vitamin C, vitamin E와 같은 항산화제는 NF κ B의 활성을 억제한다는 연구결과가 보고되었다 (Scherck *et al.*, 1991; Calfee-Mason *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 1997).

산귤 추출물은 대식세포에서 LPS로 유도된 NO 생성, iNOS와 COX-2 단백질 발현을 저해하였으며, 항산화 활성과 마찬가지로 이들 활성 또한 미성숙한 과피 추출물이 성숙 과피 추출물 보다 강한 것으로 나타났다. 최근 들어 iNOS의 promoter activity 억제 (Kim and Park, 2009), 효소활성 억제 (Moscatelli *et al.*, 2006), 유전자 전사 억제 (Hyun *et al.*, 2009), 혹은 세포 밖으로 분비된 NO 소거 (Kim and Park, 2009) 등과 같은 NO 생성 억제 물질들이 보고된 바

있다. COX-2는 염증의 주요 매개체인 PGs의 생성을 조절하며 (Tsatsanis *et al.*, 2006) 류마티스성 관절염과 같은 만성염증과 (Posadas *et al.*, 2000), 대장암, 유방암, 폐암 등에 (Harris, 2009) 관련되어 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 PGE₂ 생성을 분석하지는 않았지만, 산굴 과피 추출물이 COX-2 발현을 억제하기 때문에 PGE₂ 생성 또한 억제할 것이라 사료된다.

염증반응에서 전염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 (Palsson-McDermott and O'Neill, 2004), LPS에 의한 대식세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Conti *et al.*, 2004). IL-1 β 는 혈관 내피를 활성화시키고 면역계세포 활성화에 관여하고 IL-6는 림프구 활성화를 통해 항체생성과 관련되며 (Murphy *et al.*, 2008) TNF- α 는 LPS 반응의 주요 매개체로 선천적 면역반응과 만성 염증에 관여한다고 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2003). 미성숙 산굴 과피 추출물은 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 유전자 발현을 전사수준에서 저해하는 활성을 보여주었다. 따라서 DPPH 자유기 소거 활성, 세포내 활성산소종 저해, 염증매개 인자 저해 활성을 가진 미성숙 산굴 과피 추출물이 항산화제 혹은 항염소재로의 개발 가능성은 충분하다고 사료된다.

미성숙 산굴 과피가 성숙 과피보다 항산화 활성과 항염활성이 높은 것은 미성숙한 과피에 다량 존재하는 PMFs에 기인할 것이라 추출할 수 있다 (Choi *et al.*, 2007). PMFs는 다른 야채, 과일에는 거의 없고 감귤류의 특징적인 성분으로 임파구 증식억제, 항염증, 항괴양 등의 생리활성을 가진다고 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2009, Cha and Cho, 2001). Chio 등 (2007)은 활성화된 대식세포에서 nobiletin이 NF κ B의 DNA 결합을 저해함으로써 염증 억제효과를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서는 동일한 계열의 화합물인 sinensetin (Del Rio *et al.*, 1998)의 염증 억제 효과와 억제 기전을 확인해보았다.

Nobiletin과 마찬가지로 sinensetin은 NO 생성, iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 억제하는 활성을 보여 주었다. iNOS, COX-2의 유전자 발현은 세포내에서 염증과 증식반응에 관여하는 다양한 유전자를 조절하는 NF κ B (Brand *et al.*, 1997)에 의해 조절된다고 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006). 따라서 iNOS와 COX-2의 발현 조절이 NF κ B 신호전달 경로와 연관이 있음을

확인하기 위해 NF κ B의 구성성분을 조사하였다. Sinensetin은 세포질내의 I κ Ba 단백질의 생성 촉진과 p65의 핵내 전이를 감소시키는 분명한 활성을 보였다. LPS에 의한 NF κ B 경로에서 I κ Ba의 분해에 의해 p65, p50 복합체가 핵으로 전위되어 염증성 매개인자의 전사인자로 작용하기 때문 (Hayden and Ghosh, 2004)에, 이 결과는 sinensetin은 I κ Ba의 생성을 촉진시킴으로써 NF κ B 경로에 의한 염증 매개 단백질의 생성을 저해하는 것임을 강력하게 시사해 주고 있다.

RAW 264.7 세포는 LPS에 의해 MAP kinase가 활성화 된다고 알려져 있다 (Kang *et al.*, 2006). ERK의 활성화는 NF κ B의 소단위체인 p65의 Ser536을 인산화 시키며, COX-2의 발현을 유도하고 (Hu *et al.*, 2004), JNK는 인산화된 c-jun에 의해 iNOS와 COX-2의 또 다른 전사인자인 AP-1의 전사활성을 촉진한다고 알려져 있고 (Eferl and Wagner, 2003), p38은 COX-2의 mRNA 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Winzen *et al.*, 1999). 본 연구에서 sinensetin은 LPS로 유도되는 MAP kinases인 ERK, JNK, p38의 인산화를 저해하는 활성을 보여주었다. 이는 sinensetin 항염작용이 ERK, JNK, p38의 인산화를 감소시키는 MAP kinase 경로를 통해서도 일어난다는 것을 암시하는 결과이다. 그러나 이에 대한 상세한 연구가 필요하다.

결론적으로 미성숙 산골 과피 추출물은 자유유리기 소거활성, 염증매개 인자들의 생성을 억제함으로써 뛰어난 항산화, 항염 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한, 산골 과피에서 분리한 sinensetin이 NF κ B 경로와 MAP kinase 경로를 통해 iNOS, COX-2, NO의 생성을 억제한다는 사실을 규명하였다. 하지만 산골 과피를 항염증 소재로 개발하기 위해서는 시료 채집시기 별에 따른 비교 연구 및 sinensetin의 염증 억제 기전을 구명하기 위한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 인용 문헌

- Aga M, Watters JJ, Pfeiffer ZA, Wiepz GJ, Sommer JA, Bertics PJ (2004) Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286(4):C923-30
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200
- Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA (1997) Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol.* 82(2):297-304
- Calfee-Mason KG, Spear BT, Glauert HP (2002) Vitamin E inhibits hepatic NF-kappaB activation in rats administered the hepatic tumor promoter, phenobarbital. *J Nutr.* 132(10):3178-85.
- Cha JY, Cho YS (2001) Biofunctional Activities of Citrus Flavonoids. *J. Korean Soc.Agric.Chem. Biotechnol.* 44(2):122-28
- Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Jo YS (2001) Effects of Hesperetin and Naringenin on Lipid Concentration in Orotic Acid Treated Mice. *Korean J. Life Science* 9:389-94
- Cho SH, Choi YJ, Rho CW, Choi CY, Kim DS, Cho SH (2008) Reactive Oxygen Species and Cytotoxicity of Bamboo (*Phyllostachys pubescens*) Sap. *Korean J. Food Preserv.* 15(1):105-10

- Choi SY, Hwang JH, Ko HC, Park JG, Kim SJ (2007) Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- κ B and Reactive Oxygen Species production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 15;113(1):149-55
- Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, Han SH, Yun SH, Kim SJ (2007) Correlation between flavonoid content and the Nitric oxide production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull.* 30(4):772-8
- Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T (2004) Cytokines and fever. *Front Biosci.* 9:1433-49
- Cui ZG, Kim BY, Kang SH, Lee YJ, Lee DH, Lee YK, Park DB (2007) Fermented Peel of Citrus sunki Hort. ex Tanaka Promotes Ethanol Metabolism and Suppresses Body Fat Accumulation. *Food Sci. Biotechnol.* 16(2):311-14
- Del Río JA, Arcas MC, Benavente-García O, Ortuño A (1998) Citrus Polymethoxylated Flavones Can Confer Resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* Species. *J. Agric. Food Chem.* 46 (10):4423-4428
- Delanty N, Dichter MA (1998) Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand.* 98(3):145-53
- DeWitt D, Smith WL (1995) Yes, but do they still get headaches? *Cell.* 83(3):345-8

- Eferl R, Wagner EF (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 3(11):859-68
- Eibl G, Bruemmer D, Okada Y, Duffy JP, Law RE, Reber HA, Hines OJ (2003) prostaglandin(2) is generated by specific cyclooxygenase-2 activity and increases VEGF production in cyclooxygenase-2-expressing human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 11:306(4):887-97.
- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*. 7:131(2):165-72
- Harris RE (2009) Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*. 17(2):55-67
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 18(18):2195-224.
- He Q, Riley RT, Sharma RP (2002) Pharmacological antagonism of fumonisin B1 cytotoxicity in porcine renal epithelial cells (LLC-PK1): a model for reducing fumonisin-induced nephrotoxicity in vivo. *Pharmacol Toxicol*. 90(5):268-77
- Hu J, Nakano H, Sakurai H, Colburn NH (2004) Insufficient p65 phosphorylation at S536 specifically contributes to the lack of NF-kappaB activation and transformation in resistant JB6 cells. *Carcinogenesis*. 25(10):1991-2003

- Hyun MS, Hur JM, Shin YS, Song BJ, Mun YJ, and Woo WH (2009) Comparison Study of White Ginseng, Red Ginseng, and Fermented Red Ginseng on the Protective Effect of LPS-induced Inflammation in RAW 264.7 Cells. *J. Appl. Biol. Chem.* 52(1), 21-27
- Kang SH, Lee YJ, Lee CH, Kim SJ, Lee DH, Lee YK, Park DB (2005) Physiological Activities of Peel of Jeju-indigenous Citrus sunki Hort. Tanaka. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(6):983-88
- Kang YJ, Wingerd BA, Arakawa T, Smith WL (2006) Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J Immunol.* 177(11):8111-22
- Kim CM, Park YK (2009) The Effects of Different Extracts of *Ostericum koreanum* on the Production of Inflammatory Mediators in LPS-stimulated RAW264.7 Cells. *Kor. J. Herbology* 24(1):169-178
- Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH (2009) Composition of Flavonoids and Antioxidative Activity from Juice of Jeju Native Citrus Fruits during Maturation. *Korean J Nutr* 42(3):278-90
- Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1;298 (Pt2):249-58.
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG (2003) 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. *British journal of pharmacology.* 139:11-20

- Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW (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 macrophages. *Biol Pharm Bull.* 27(5):617-20
- Liu SF, Malik AB (2006) NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(4):L622-L645
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1;178(2):749-54
- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108(8):652-9.
- Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, Lo Curto RB (1995) Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmacol.* 50(9):595-9.
- Moon TC, Chung KC, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW (1998) Screening of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors from natural products. *Yakhak hoeji* 42(2) 214-19
- Moscattelli V, Hnatyszyn O, Acevedo C, Megias J, Alcaraz MJ, Ferraro G (2006) Flavonoids from *Artemisia copa* with anti-inflammatory activity. *Planta Med.* 72(1):72-4.

- Mukaida N, Ishikawa Y, Ikeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K, Matsushima K (1996) Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of lipopolysaccharide receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J Leukoc Biol.* 59(2):145-51
- Muñoz E, Blázquez MV, Ortiz C, Gomez-Díaz C, Navas P (1997) Role of ascorbate in the activation of NF-kappaB by tumour necrosis factor-alpha in T-cells. *Biochem J.* 325 (Pt 1):23-8.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008) *Immunobiology* 7th (p.5-7, 57-59)
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6(12):3051-64
- Nathan C (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.* 15;100(10):2417-23
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature.* 420(6917):846-52
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 11-17;327(6122):524-6
- Palsson-McDermott EM and O'Neill LA (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.*

113:153-162

Parham P (2006) *The immune system/2e* (p.233-36)

Park CY, Yoo HJ (2004) Inflammation and obesity. *J Korean Soc Endocrinol.* 19(2):97-108

Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payá M, Alcaraz MJ (2000) Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 361(1):98-106

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10(8):2247-58.

Son HY, Bae SJ, Park JH, Lee JH, Park JY, Kim YM, Song HS, Kim MS, Lee IK, Lee KU (2004) Prevention of Endothelial Apoptosis by Alpha-lipoic Acid: Role of AMP-activated Protein Kinase. *Korean J Lipidol* 14(2):96-103

Stanely Mainzen Prince P, Menon VP (2001) Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. *Phytother Res.* 15(3):213-8

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1;88(17):7773-7

Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthases through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* 1;480-481:243-68

Tracey KJ (2002) The inflammatory reflex. *Nature.* 420(6917):853-9

Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(10):1654-61

Weisz A, Cicatiello L, Esumi H (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J.* 15;316(Pt1):209-15

Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Müller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* 18(18):4969-80

VI. 요약

제주 재래귤인 산귤 (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)의 과피에는 다양한 생리활성기능을 가진 polymethoxyflavones (PMFs)의 함량이 높다고 알려져 있다. 본 연구에서는 항염증 개선소재로서 산귤 과피의 활용 가능성을 평가하기 위하여 산귤 과피 추출물과 sinensetin의 염증억제 기전을 RAW 264.7 세포에서 분석하였다. 우선 미성숙 및 성숙한 산귤 과피 에탄올 추출물의 DPPH 소거능을 비교한 결과, 미성숙 산귤 과피 추출물이 성숙한 과피 추출물보다 DPPH 소거능이 양호하였다. 그리고 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화시킨 RAW 264.7 세포에서 산귤 과피 추출물이 여러 염증 매개인자의 생성이 미치는 영향을 분석한 결과, 산귤 과피 추출물은 nitric oxide (NO)와 활성산소종 (ROS)의 생성을 농도 의존적으로 저해하였고, inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 단백질 발현과 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 mRNA 발현 역시 저해시켰다. 이러한 활성 또한 미성숙 산귤 과피 추출물이 성숙한 과피 추출물보다 높은 저해효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 미성숙한 산귤 과피 추출물에 다량 함유된 PMFs 중 sinensetin의 염증 억제 효과와 그 기전을 조사하였다. Sinensetin은 NO 생성과 iNOS, COX-2의 발현을 농도 의존적으로 저해하였다. 그리고 sinensetin은 RAW 264.7 세포에서 extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) 와 p38 stress-activated protein kinase (p38)의 인산화를 감소시켰다. 또한, nuclear factor κ B (NF κ B) 경로에서 inhibitory κ Ba (I κ Ba)의 생성을 촉진하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, sinensetin은 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 인산화 감소와 I κ Ba의 생성촉진에 영향을 줌으로써 전염증성 매개인자의 생성이 억제되는 것이라 사료된다. 본 연구결과는 산귤 과피의 염증 억제 활성이 과피에 함유되어 있는 PMFs의 다양한 염증 억제기전들이 통합되어 나타난다는 것을 보여주고 있으며, 성숙한 개체와 미성숙한 개체 간 염증 억제효과의 차이는 과실의 성숙 정도에 따른 과피의 PMFs의 함량 변화에 기인한 것이라 사료된다.