



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

신서란(*Phormium tenax*)
추출물과 분획물에 대한 염증 억제
효과

제주대학교 대학원

농화학과

양 권 민

2016년 2월



신서란(*Phormium tenax*)
추출물과 분획물에 대한 염증 억제
효과

지도교수 김 찬 식

양 권 민

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2016년 2월

양권민의 농화학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ ①

위 원 _____ ①

위 원 _____ ①

제주대학교 대학원

2016년 2월

Anti-inflammatory Activity on Crude
Extraction and Solvent fraction of
Phormium tenax

Yang Kwon Min

(Supervised by Professor Chan-Shick Kim)

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

February, 2016

This thesis has been examined and approved.

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

.....
Date

Department of Agricultural Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

This study describes a preliminary evaluation of the anti-oxidative, anti-inflammatory activity, and anti-atopy of *Phormium tenax* 70% ethanol extract and solvent fractions. In order to effectively screen for a natural preservative agent, we first investigated the anti-oxidant activities such as 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity, superoxide radical scavenging capacity, xanthine oxidase inhibitory activity of their. The antioxidant activities showed in EtOAc and BuOH fraction of *P. tenax*, compare with ascorbic acid, butylated hydroxy anisole (BHA), trolox, and allopurinol in these assay systems. In addition, we examined the inhibitory effect of *P. tenax* extract and fractions on pro-inflammatory mediators (Nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin E₂ (PGE₂), COX-2) and pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin- β (IL- β)) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. Finally, we evaluated of their inhibitory effect on the atopic dermatitis-like inflammatory markers (macrophage-derived chemokine (MDC), thymus and activation-regulated chemokine (TARC)) in human keratinocyte HaCaT cells. The CH₂Cl₂ and EtOAc fractions of *P. tenax* inhibited the pro-inflammatory factors and atopic dermatitis-like inflammatory markers in a dose dependent manner.

These results suggest that *P. tenax* may have significant effects on oxidative and inflammatory factors and may be provided as a possible anti-oxidant and anti-inflammatory therapeutic plant.

CONTENTS

ABSTRACT----- i

CONTENTS----- ii

LIST OF TABLE----- iv

LIST OF FIGURES----- v

I. 서론-----1

II. 재 료 및 방 법-----6

1. 신서란 잎 시료의 에탄올 추출물 및 분획물 제조
2. 항염증 실험
 - 2.1. 시약
 - 2.2. 세포배양
 - 2.3. DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 측정
 - 2.4. Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성
 - 2.5. 세포 독성(LDH) 측정
 - 2.6. Nitric oxide(NO) 생성 억제 활성 측정
 - 2.7. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성 측정
 - 2.8. Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL- β) 생성 억제 활성 측정
 - 2.9. Western blot analysis
3. 아토피(Atopy) 유발 인자 억제 활성 실험
 - 3.1 세포 배양 및 시약

3.2 Chemokines(MDC, TARC) 생성 억제 활성 측정

4. 통계처리

III. 결 과-----12

1. 신서란 추출물과 분획물의 항염증 실험

1.1 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 측정

1.2 Xanthine oxidase/Superoxide 억제 활성

1.3. 세포 독성(LDH) 및 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 비교

1.4. 신서란 추출물과 분획물의 PGE₂생성 억제 활성

1.5. 신서란 추출물과 분획물의 iNOS, COX-2 발현 억제 활성

1.6. 신서란 추출물과 분획물의 cytokines(TNF- α , IL-6, IL-1 β) 생성 억제 활성

2. 신서란 추출물과 분획물의 아토피 유발 인자 억제 효과

2.1 신서란 추출물과 분획물의 Chemokines 생성 변화에 미치는 영향

IV. 고 찰-----44

V. 참 고 문 헌-----46

VI. 요 약-----54

LIST OF TABLE

Table1. Comparison of antioxidant potential of 70% EtOH extract and solvent fractions of *Phormium Tenax* -----14

LIST OF FIGURES

- Figure 1.** Systematic purification using solvent partitioning from *Phormium Tenax* -----6
- Figure 2-1.** Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on NO production and cytotoxicity in LPS stimulation in RAW 264.7 cells. -----16
- Figure 2-2.** Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on NO production and cytotoxicity in LPS stimulation in RAW 264.7 cells. -----17
- Figure 2-3.** Inhibitory effect on Ethyl acetate fractions on NO production and cytotoxicity in LPS stimulation in RAW 264.7 cells. -----18
- Figure 3-1.** Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. -----20
- Figure 3-2.** Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. -----21
- Figure 3-3.** Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. -----22
- Figure 4-1.** Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on iNOS and COX-2 protein level in RAW 264.7 cells.-----24
- Figure 4-2.** Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on iNOS and COX-2 protein level in RAW 264.7 cells.-----25

Figure 4-3. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on iNOS and COX-2 protein level in RAW 264.7 cells.-----	26
Figure 5-1. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on TNF- α production in RAW 264.7 cells. -----	28
Figure 5-2. Inhibitory effect of CH ₂ Cl ₂ fractions on TNF- α production in RAW 264.7 cells. -----	29
Figure 5-3. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on TNF- α production in RAW 264.7 cells. -----	30
Figure 5-4. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on IL-6 production in RAW 264.7 cells.-----	31
Figure 5-5. Inhibitory effect of CH ₂ Cl ₂ fractions on IL-6 production in RAW 264.7 cells. -----	32
Figure 5-6. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on IL-6 production in RAW 264.7 cells. -----	33
Figure 5-7. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on IL- β production in RAW 264.7 cells. -----	34
Figure 5-8. Inhibitory effect of CH ₂ Cl ₂ fractions on IL- β production in RAW 264.7 cells.-----	35
Figure 5-9. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on IL- β production in RAW 264.7 cells. -----	36

Figure 6-1. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on MDC production in HaCaT human keratinocytes. -----38

Figure 6-2. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on MDC production in HaCaT human keratinocytes.-----39

Figure 6-3. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on MDC production in HaCaT human keratinocytes.-----40

Figure 6-4. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on TARC production in HaCaT human keratinocytes. -----41

Figure 6-5. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on TARC production in HaCaT human keratinocytes.-----42

Figure 6-6. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on TARC production in HaCaT human keratinocytes.-----43

I. 서 론

생체조직의 내외부에서 발생하는 화학적, 물리적, 생물학적 자극에 의하여 생체조직이 손상되었을 때, 손상된 생체조직을 최소화하고 원래의 상태로 회복시키려는 생체의 방어작용에 의해 나타나는 현상 중 하나를 염증이라 할 수 있다 (Rabsom *et al.*, 2005; 김민진, 2012). 자극에 의해 Serotonin, Histamine, Prostaglandin과 같은 혈관 활성 물질이 분비되어 혈관 투과성이 증대됨에 따라 염증 반응이 일어난다 (Song *et al.* 2003). 대식세포(macrophage)는 여러 종류의 자극에 의해 발현 되는 염증 반응에 대한 방어 작용과 숙주의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Higuchi M *et al.* 1990; 송상목, 2015). 대식세포에서 염증 반응이 일어날 때, interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 pro-inflammatory cytokine들의 발현이 유도되고, inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 염증인자가 생성됨이 알려졌다 (Stock M *et al.*, 1994; Moncada S *et al.*, 1991; Lee AK *et al.*, 2003; 송상목, 2015). IL-6, IL- β , TNF- α 와 같은 염증매개인자들은 그람음성균의 세포외막에 존재하는 Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 발현되며, LPS는 RAW 264.7 cell과 같은 대식세포 또는 단핵구(monocyte)에서 염증매개인자들의 발현에 관여한다 (Willeaume V *et al.*, 1996; 김민진, 2012; 송상목, 2015). Nitric oxide(NO)는 높은 반응성을 특성으로 가진 활성라디칼(free radical)로서 신경전달, 혈관·혈압·면역에 대한 혈소판 응집 억제 및 항상성 유지 등 생물학적인 차원의 다양한 매개체 역할을 한다고 보고되어져 있다 (Rho *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006; 송상목, 2015). NO는 Nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성이 조절되며 (Moeslinger *et al.* 2006) NOS는 물리화학적 특성에 따라 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)의 세 가지 종류가 존재한다 (Son *et al.* 2006; Song, 2015). 이들 중 nNOS는 기관지, 위장의 내피세포, 신경계 등에 존재하며, eNOS는 혈관내피 세포에 존재한다. 이 두 효소는 체내에서 혈관확장, 신경세포 신호 전달 및 혈류 분포 조절 등 항상성 유지를 위해 일정 수준을 유지하면서 중요한 역할을 한다 (Moncada S. *et al.* 1995; 송상목, 2015). 반면 iNOS는 interferon- γ (IFN- γ) 또는 LPS 등의 자극을 통해 발현되어 많은 양의 NO를 생성한다 (Guzik T.J. *et al.*,

2003; Miyasaka N. *et al.*, 1995; 김민진, 2012; 송상목, 2015). 과다하게 발현된 NO는 염증매개체의 생성을 활성화 시켜 조직의 손상, 유전자변이, 유전자 변이, 류마티스 관절염, 폐혈성 쇼크, 자가면역 질환 등의 질병을 유발 시킬 수 있다 (Jun *et al.*, 1998; Blonska *et al.*, 2003; 송상목, 2015). NO와 함께 대표적 염증인자인 PGE₂는 통증과 발열에 작용하는 매개체로서 면역반응과 염증반응에 관여한다. COX는 COX-1, COX-2의 두 종류의 이성효소로 존재하며 서로 다른 유전자로부터 생성된다. COX-1은 인체 내부의 방어와 항상성 유지에 관여하고 COX-2는 LPS 또는 interleukin-1(IL-1)의 자극을 통해 발현되어 염증매개체인 PGE₂를 생성시켜 지속적인 염증반응에 관여한다고 알려져 있다 (Dubois R *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1996; 송상목, 2015).

아토피(atopy)는 음식물과 대기 중의 각종 흡입성 물질에 대한 알레르기 반응의 결과로 피부염이나 천식, 알레르기성 비염(고초열)등이 나타나는 것을 Coca AF와 Coke RA에 의해 “아토피”라고 정의 되었으며, 이러한 알레르기 질환에는 아토피 피부염, 천식, 알레르기성 비염(고초열), 알레르기성 결막염 등이 있다(Min, 2004). 특히 아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 알레르기성 비염이나 천식을 동반하는 경우가 많은 만성 피부질환으로, 한 해 출생하는 신생아의 20%가 앓고 있다는 보고가 나올 정도로 매우 흔한 피부병이다. 이 질환은 피부건조증, 소양감, 태선화, 모낭 주위 항진, 구순염, 습진양병변 등의 특징적으로 나타난다 (Kim, 1983; Chang, 1998).

아토피 피부염의 원인에 대한 여러 가설이 대두되었으나 명확한 원인은 밝혀지지 않고 있으며 유전학적·면역학적 요인, 이상 약물반응, 환경요인, 미생물 등이 상호 관여할 것이라고 보고 있다. 최근에는 아토피 피부염 환자에서의 혈청 IgE수치의 비정상적인 증가, 세포면역의 중추적 역할을 담당하는 T림프구의 수적, 기능적 장애 등이 보고된바 있다 (Baik, 2005).

아토피 피부염의 면역학적인 요인으로는 T세포 성숙 결핍설, CD8+ 억제 T세포의 수적 감소 등이 제안 된 바 있었으나, 최근엔 CD4+ T세포의 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다(Min, 2004). 즉, B세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4, B세포로부터 IgE 생성을 촉진하는 IL-5, IgE의 생성을 증폭시키는 IL-6 등을 분비하는 T 세포는 CD4+ T 세포 중 Th2 세포인데, AD환자의 말초 혈액 및 피부 병변으로부터 분리한 항원 특이 T 세포 중 Th2 세포인데, AD환자의 말초 혈액 및 피부 병변으로부터 분리한 항원 특이 T세포 클론이 Th2로 밝혀졌고, 이 세포들에

서 IL-4 등이 Th2 cytokine 프로필이 분비된다는 사실이 입증되었다 (Min, 2004).

인체의 외부 침입에 대한 방어 기작인 면역 체계는 T 세포의 활성화를 중심으로 이루어진다고 알려져 있다 (Kang, 2006). Th1 세포가 생산하는 Th type 1 cytokine 은 Th 1세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 세포의 분화와 증식을 억제하며, 반대로 Th2 세포가 생산하는 Th type2 cytokine은 Th2 세포의 분화와 증식을 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제한다고 알려져 있다 (Kang, 2006). 상호 견제를 통해 균형을 이루어 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 붕괴되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역 질환이 발생하게 되는 것이다 (Chen, 2004; Ngoc *et al.* 2005; Kang, 2007). 아토피 피부염과 같은 알레르기 질환도 이 균형이 Th2쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역 질환 중의 하나이다 (Min, 2004). 즉, Th2 세포와 알레르기 질환의 관계는 Th2 세포 기능의 증가와 Th1 세포 기능의 감소라는 Th2 가설을 통해 이해할 수 있다(Min, 2004; Kang, 2006).

아토피 피부염 환자의 피부에서 T 세포의 이동은 특이 chemokine과 그에 대한 수용체에 의해서 매개된다는 보고가 있다 (Kang, 2007). Chemoattractant cytokine(chemokine)은 염증부위에 면역세포의 분화, HIV감염의 억제, 백혈구의 이동, 면역 조절 기능 등 많은 활성을 가진 분자량이 작은 cytokine의 한 종류이다 (Kang, 2007). 현재 약 50 여종이 알려져 있으며 chemokine은 구조적으로 처음 위치하는 두 개의 시스테인 잔여기의 상대적 위치에 따라 CXC, CC 및 CX3C 그리고 C의 네 종류의 아집단으로 나누어진다 (Kang, 2007). chemokine은 여러 병리학적 증상(감염증질환, 알레르기질환, 혈관성질환, 암질환, 자가면역질환 등)에 밀접하게 관련되어 있으며, 최근 새로운 chemokine과 그 수용체들이 발견되면서 면역세포의 발생과 성숙, stem cell보호, T 세포의 분화와 이주, HIV의 억제 및 Th1/Th2 cytokine balance의 조절 작용 등 새로운 기능들이 많이 알려지고 있다 (Lee, 2002; Baumer *et al.* 2004, Kang, 2007). 그중에서 CC chemokine은 특히 알레르기성 염증 반응에서 호산구, 호염구, 림프구를 끌어들이는 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Lee, 2002; Baumer *et al.* 2004). 또한, chemokine 수용체로는 CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4와 CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8과 CXCR1 등이 있는데, Th1(CXCR3, CCR5) 세포와 Th2(CCR3, CCR4, CCR8) 세포가 각각 다른 chemokine 수용체를 발현한다. 특히, CXCR3와 CCR4 chemokine 수용체는 각각 Th1과 Th2 세포에서 특이적으로 발현된다고 보고되었다 (Belperio,

2004; Esche, 2004; Kang, 2007).

다양한 chemokine 수용체들 중 CCR4는 Th2 세포에 많이 발현된다고 알려져 있고, AD-like murine model과 AD 환자의 병변 모두에서 과발현된다는 보고가 있다. 또한, 모든 CLA(+) 피부귀소 기억/작동 T세포는 필수적으로 CCR4를 표현하는 것으로 밝혀졌고, 이러한 CCR4는 Th2 세포와 호산구의 선택적인 염증피부의 동원을 통해 아토피 피부염의 병리기전에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다(Na, 2005). 이러한 CCR4에 특이적으로 결합하는 chemokine으로는 macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)와 thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17)로 알려져 있다. MDC는 단핵구, 단핵구 유래 수지상 세포와 자연살해 세포 등에 대한 이주를 강하게 조절하는 chemokine으로 알려져 있고, TARC는 염증병변으로 Th2 세포의 이주를 선택적으로 조절하는 chemokine으로 보고되었으며, 흉선에서 기본적으로 발현되고 단핵구 유래 수지상 세포, 내피 세포와 각질 세포 등에서 생성되며, 특히 T세포의 피부귀소에 중요한 chemokine 으로 알려져 있다. 최근 MDC와 TARC의 아토피 피부염과 관련된 연구에서는 아토피 피부염 환자에서 혈청농도의 증가가 보고되고, 아토피피부염 동물모형에서 MDC와 TARC의 피부발현이 증가됨이 보고되었다 (Maeda *et al.*, 2002; Shinada *et al.* 2004; Jakubzick, 2004; Rozyk *et al.* 2005; Kang, 2007).

오래전부터 제주도에서 자생하고 있는 신서란은 마섬유의 일종으로 뉴질랜드가 원산지이며, 많은 경질섬유 중에서도 경제적으로 재배되었던 작물로서 척박한 땅에서도 재배가 가능하여 선박용 로프, 그물, 범포등의 원료로 사용되어 졌다 (김봉용 등, 2002). 뉴질랜드가 원산지인 용설란과 여러해살이 상록 초본식물로 학명은 *Phormium Tenax* Forst 이며 New-Zealand flax(뉴질랜드 삼) 혹은 New-Zealand hemp이라고 불려진다. 온대지방에서 경작할 수 있는 경질 섬유로서 잎은 원산지에서 완전히 성장했을 때 길이 1.0~1.2m, 폭 5.0~12.5cm정도이며 10~21℃에서 잘 생육한다고 알려져 있다 (김봉용 등, 2002). 제주도에서도 원산지에서와 거의 동일한 생육상태를 보이며 잘 자라는 것으로 보아 기후와 토질이 신서란 재배에 적합한 것으로 보고되어졌으며 번식은 씨뿌리기도 가능하지만 주로 포기 나누기를 이용하며 심은 후 2년째부터 매년 잎은 1회 수확할 수 있다 (김봉용 등, 2002).

신서란은 오랫동안 각종 끈의 원료로 사용되어졌으나 화학섬유로 제조된 제품으

로 대체되어 지면서 현재는 그 용도가 거의 미미한 실정이다 (김봉용 등, 2002).

신서란의 활용률을 증대하기 위하여 연구가 이루어지고 있으나 대부분이 종이 펄프나 섬유원료에 국한 되어져 있다 (김봉용 등, 2002).

신서란 잎의 기부에서 삼출액을 채취할 수 있으며, 이 삼출액은 뉴질랜드 마오리오족에서 하라케케(Harakeke)라고 알려져 있다(Riley 1994). 마오리오족은 이 삼출액을 화상, 자상, 상처 및 설사의 치료에 사용하였다고 한다 (Riley 1994). 1951년에 실시된 연구에서는 신서란에서 채취한 삼출액이 피부관리에 효과가 있음을 알게 되었다 (McIlroy RJ 1951.).

이에 본 연구에서는 신서란의 추출물과 분획물을 이용하여 항산화, 항염증 및 아토피 유발 인자 억제 효능에 관하여 조사하였다. 항산화 활용 가능성은 DPPH radical 소거활성 및 Xanthine oxidase 억제, Superoxide 소거 활성을 조사하였다. 염증성 질환에 대한 활용 가능성을 확인하기 위하여 murine macrophage cell line RAW 264.7에서 염증성 인자들의 억제 효과를 확인하였고 아토피 질환에 대한 활용 가능성을 확인코자 hIFN- γ 로 자극한 human keratinocyte cell line HaCaT 에서 아토피 유발 인자로 알려진 kemokines(MDC와 TARC) 생성 억제 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 신서란 잎 시료의 에탄올 추출물 및 분획물 제조

본 연구에 사용된 시료는 서귀포시 남원읍 신례리 일대에서 2015년 8월에 채집한 신서란 잎을 열풍건조기(40℃)에서 약 72시간 건조시킨 후 분쇄하여 분말 시료화하였다. 신서란 잎 분말 시료 400g을 70% EtOH에 침적하고 24시간동안 교반하여 침출시킨 용매를 감압여과하여 얻어진 여액을 감압 농축하여 추출물을 확보하였다.

확보된 추출물을 이용하여 추출물 5 g을 증류수 500 mL에 현탁하고 *n*-hexane 500 mL로 2회 추출하였다. *n*-hexane 층을 합하여 농축하여 신서란 *n*-hexane 분획물 112 mg을 제조하였다. 물 층을 methylene chloride 500 mL로 2회 추출하여 합하고 감압 농축하여 methylene chloride 분획물 (CH_2Cl_2) 400 mg을 제조하였다. 물 층을 ethyl acetate 500 mL로 2회 추출하여 합하고 감압 농축하여 ethyl acetate 분획물 (EtOAc) 172 mg을 제조하였다. 물 층을 수포화 butanol 500 mL로 2회 추출하여 합하고 감압 농축하여 신서란 butanol 분획물 (BuOH) 750 mg을 제조하였다. 물 층을 감압 농축하여 신서란 물 분획물 (D.W) 3,566 mg을 제조하였다.(Figure 1.)

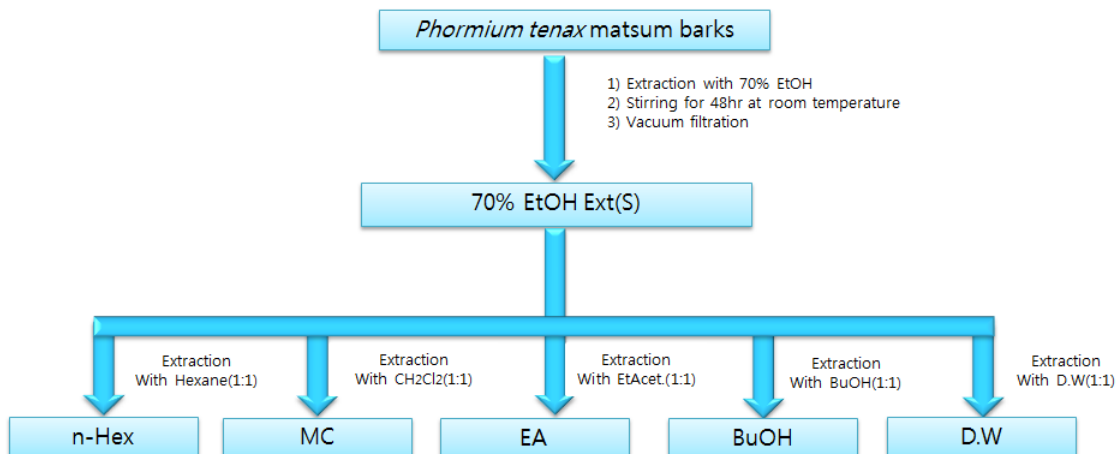


Figure 1. Systematic purification using solvent partitioning from *Phormium Tenax*

2. 항염증 실험

신서란 추출물과 분획물의 항산화 활성과 염증 억제 활성을 측정하기 위하여 다음과 같은 실험방법을 선택하였다.

2.1. 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), St. Louis, MO]는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂ 정량을 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D System (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. DPPH, NBT, xanthine oxidase 등 그 밖의 시약들은 모두 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 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 (dulbeco's modified eagle medium) high glucose medium배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고 3일에 한번 씩 계대 배양을 실시하였다.

2.3 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 측정

항산화활성은 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하여 시료의 라디칼 소거활성을 측정하였다 (Nara *et al.* 2006). 신서란 추출물과 분획물을 methanol에 농도별로 용해시킨 시료액을 20 mM DPPH를 혼합하여 15분간 암실에서 반응시킨 후 517 nm에서 Microplate reader (Powerwave XS, BioTek)로 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 시료 첨가군과 비첨가군을 비교하여 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복 실험

을 통하여 평균값을 구하였다.

2.4. Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성

Xanthine/xanthine oxidase (Valentova K, 2005)에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도를 측정 하였고, 대조군으로는 allopurinol (sigma)를 사용하였다. Superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법으로 560 nm의 흡광도로 측정하였다(Silva *et al.*, 2007) 반응액은 각 시료와 0.5 nM xanthine, 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH7.5) 100 μ L에서 준비하였고 50 mM/mL xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 실험을 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였다.

2.5. 세포 독성 (LDH) 측정

10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1.8 \times 10⁵ cell/mL로 접종하고 18시간 배양 후 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 배지를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 취하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50 μ L와 reconstituted substrate mix 50 μ L를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μ L의 stop solution을 넣고 microplate reader (Bio-TEK)를 사용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

2.6. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8 \times 10⁵ cell/mL

로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 그다음 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess 시약 100 μL 를 96 well plate에서 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 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 cell/mL로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/mL)로 조제된 시료 50 μL 와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유한 450 μL 의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (1,200 rpm, 3min)하여 얻어진 상층액의 PGE₂ 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 (-20°C) 하였다. PGE₂는 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. pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL- β) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cell/mL로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/mL)로 조제된 시료 50 μL 와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유한 450 μL 의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (1,200 rpm, 3min)하여 얻어진 상층액의 pro-inflammatory cytokine 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 (-20°C) 하였다. pro-inflammatory 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 (5.0×10^5 cell/mL)를 18시간 전 배양한 후, 시료와 LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후 $200\mu\text{g}$ 의 lysis buffer [50 mM Tris-HCL (pH 7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO_3 , 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylsulfonyl fluoride, $25\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, $25\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin]를 첨가하여 4°C 에서 30분~1시간 동안 lysis시킨 후 15,000 rpm에서 15분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. $20\sim 30\mu\text{g}$ 의 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. 반응이 완료된 membrane을 ECL 기질 (Intron Biotechnology, Inc, Korea)과 1분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광 하였다.

3. 아토피(Atopy) 유발 인자 억제 활성 실험

신서란 추출물과 분획물의 아토피 억제 활성을 측정하기 위하여 다음과 같은 실험 방법을 선택하였다.

3.1 세포 배양 및 시약

형질전환된 인간각질형성세포주인 HaCaT 세포는 10% 우태아혈청 (fetal bovin serum, FBS; Gibco BRL, USA)과 100 unit/mL penicillin-streptomycin (Gibo BRL, USA)을 첨가한 DMEM (D μ Lbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, USA)을 세포배양액으로 이용하여, 37°C , 5% CO_2 로 유지되는 항온기 (incubator)에서 배

양하였다. 계대배양은 배양 플라스크 면적의 80% 정도를 차지할 때까지 배양한 다음, 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 배양 플라스크로부터 분리 한 후, 10% FBS가 포함된 배양액으로 trypsin을 중화하고 원심 분리하여 수 차례 계대배양 하였다. Human interferon- γ (hIFN- γ , recombinant E, coli)는 Roche (Korea) 제품을, β -actin primer는 Sigma-Aldrich 제품을, human MDC, human TARC ELISA kit는 R&D (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3.2 Chemokine (MDC, TARC) 생성 억제 활성 측정

Human keratinocyte cell line 인 HaCaT 세포를 DMEM 배지를 이용하여 5×10^5 cell/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50 μ L를 hIFN- γ (최종농도 10 ng/mL)를 포함하는 새로운 배지 (FBS(-)) 450 μ L에 가하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000rpm, 3min) 하여 얻어진 상층액의 MDC 및 TARC 함량을 각각 human MDC immunoassay, human TARC immunoassay kit (R&D System Inc. Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

4. 통계처리

모든 실험은 3반복 이상 실시하였고, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 \pm 표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 신서란 추출물과 분획물의 항염증 실험

1.1 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 측정

항산화 물질의 가장 특징적인 작용기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성라디칼 (free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다고 보고되었다 (Ak and Gülçin, 2008). 신서란의 추출물 및 분획물의 항산화 활성에 대해 조사하기 위하여 항산화 표준물질 중 비타민 C (100 mM), butylated hydroxy anisole (BHA) (100mM)와 비교하였다. 그 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 신서란 추출물 및 분획물 시료의 항산화 활성을 측정한 결과 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)의 활성라디칼 (free radical) 소거활성은 조추출물과 *n*-hexane (526 $\mu\text{g}/\text{mL}$), methylene chloride (530 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ethyl acetate (561 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 분획물에서 IC_{50} 값이 확인됐다.

1.2 Xanthine oxidase/Superoxide 억제 활성

Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 요산(uric acid)과 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기는 산소로부터 발생하게 되며, 이때 생성된 산소유리기는 세포의 손상을 초래하게 된다 (Silva *et al.*, 2007). 또한 superoxide radical은 세포에 유해한 산소유리기로 xanthine oxidase와 마찬가지로 세포의 손상을 일으키므로 이로써 이를 소거하는 항산화 활성을 가진 물질은 매우 중요하다 (Ak and Gülçin, 2008). 신서란 추출물과 분획물의 Xanthine oxidase 소거활성과 superoxide radical 소거활성 조사하기 위하여 항산화 표준물질 중 비타민 C (100 mM), butylated hydroxy anisole (BHA) (100mM)와 비교하여 xanthine/xanthine oxidase system으로 측정하였다. 측정된 결과는 Table 1.에서 보는 바와 같이 Xanthine oxidase 소거활성(IC₅₀)은 *n*-hexane (455 µg/mL)과 물(335 µg/mL) 분획물에서 확인 되었다. superoxide radical 소거활성 (IC₅₀)은 *n*-hexane (775 µg/mL) 분획물에서 확인 되었다.

Treatment	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^{a)}		
	DPPH radical scavenging activity	Xanthine oxidase inhibitory activity	Superoxide radical scavenging activity
BHA	>100	26.5 \pm 1.5	30.0 \pm 0.9
Vit.C	>100	32.1 \pm 3.5	89.9 \pm 2.1
70% EtOH	617.70 \pm 0.75	>1000	>1000
<i>n</i> -Hex	526.00 \pm 0.05	455.10 \pm 0.14	775.80 \pm 0.30
MC	530.50 \pm 0.53	>1000	>1000
EtOAc	561.60 \pm 0.66	>1000	>1000
<i>n</i> -BuOH	>1000	>1000	>1000
DW	>1000	335.30 \pm 0.80	>1000

a) IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments.

Table1. Comparison of antioxidant potential on 70% EtOH extract and solvent fractions of *Phormium Tenax*.

1.3. 세포 독성(LDH) 및 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 비교

신서란 추출물과 분획물의 세포 독성을 조사하기 위하여 RAW 264.7 cell에 추출물과 분획물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 LDH 분석을 통해서 세포 생존율을 확인하였다. 추출물과 분획물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 10% 이내의 세포 독성이 있음을 확인하였으며 methylene chloride 분획물에서 세포 독성이 가장 낮았다 (Figure 2-1).

LPS 로 유도된 RAW 264.7 cell에서 추출물의 NO 생성 저해능을 확인하기 위하여 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 분획물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. LPS 단독 처리군은 NO의 생성을 유도하였다. LPS 단독 처리군의 NO 생성량을 100%로 하여 추출물과 분획물의 NO 생성 억제 활성을 비교하였다. 같은 농도의 추출물과 분획물 처리하였을 때, methylene chloride 분획물을 처리한 실험군에서 NO의 생성이 10% , ethyl acetate분획물을 처리한 실험군에서 NO의 생성이 20%로 LPS 처리군에 비하여 NO 생성 억제 활성이 우수함을 알 수 있었다 (Figure 2-1). 이에 NO 생성 억제 활성이 우수한 methylene chloride 분획물과 ethyl acetate 분획물을 농도별 (25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 NO 생성 억제 활성을 추가로 확인한 바 농도 의존적으로 NO생성을 억제하는 것을 확인 하였다 (Figure 2-2, 2-3).

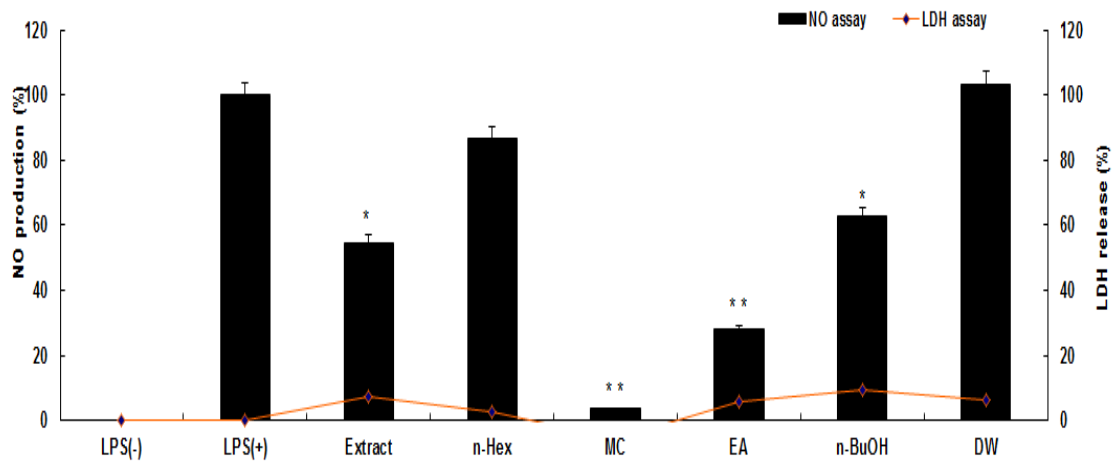


Figure 2-1. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on NO production and cytotoxicity in LPS-stimulation RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Cytotoxicity was determined using the LDH method. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

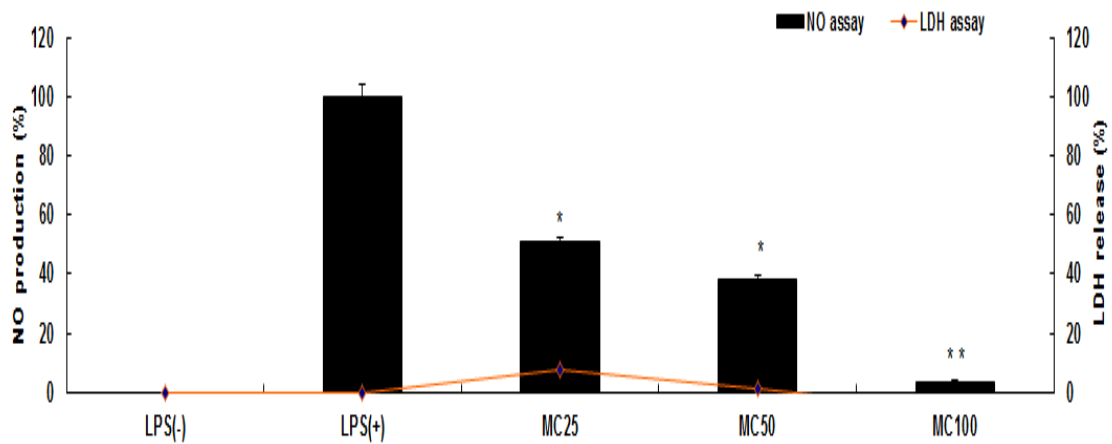


Figure 2-2. Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fractions on NO production and cytotoxicity in LPS-stimulation RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h in the presence of CH_2Cl_2 fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Cytotoxicity was determined using the LDH method. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

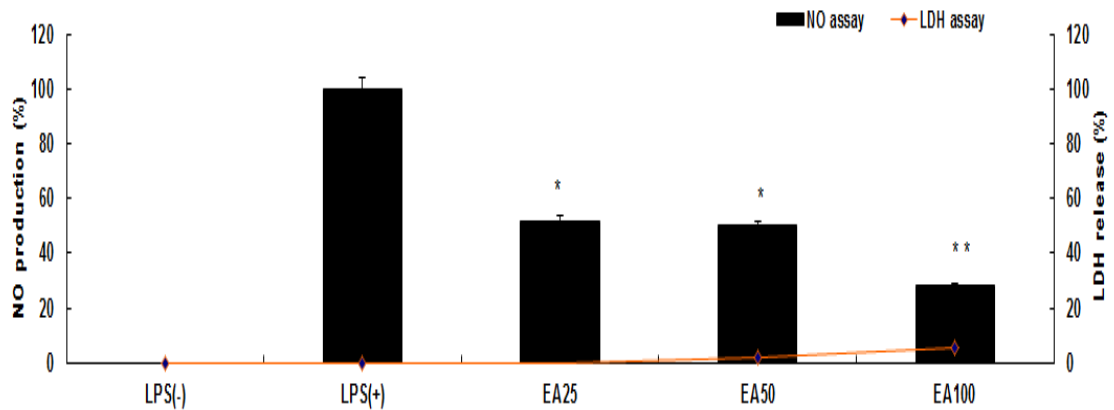


Figure 2-3. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on NO production and cytotoxicity in LPS-stimulation RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cytotoxicity was determined using the LDH method. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

1.4. Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성 억제 활성

신서란 추출물과 분획물에 대한 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 활성을 확인하기 위하여 RAW 264.7 cell에 추출물, 분획물(100 μ g/mL)과 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 PGE₂ ELISA assay kit를 이용하여 PGE₂ 생성 억제 활성을 조사하였다. LPS 무처리군의 PGE₂ 생성을 0%, LPS단독 처리군의 PGE₂ 생성을 100%으로하여 추출물과 분획물 처리군을 비교하였다. 그 결과 methylene chloride 분획물에서 PGE₂ 생성이 2~3%, ethyl acetate 분획물에서 PGE₂ 생성이 20%수준임을 확인하였다 (Figure 3-1). PGE₂ 생성 억제 활성이 우수한 두 분획물을 농도별 (25, 50, 100 μ g/mL)로 처리하여 PGE₂ 생성 억제 활성을 조사한 바 농도 의존적으로 PGE₂ 생성을 억제함을 확인하였다 (Figure 3-2, 3-3).

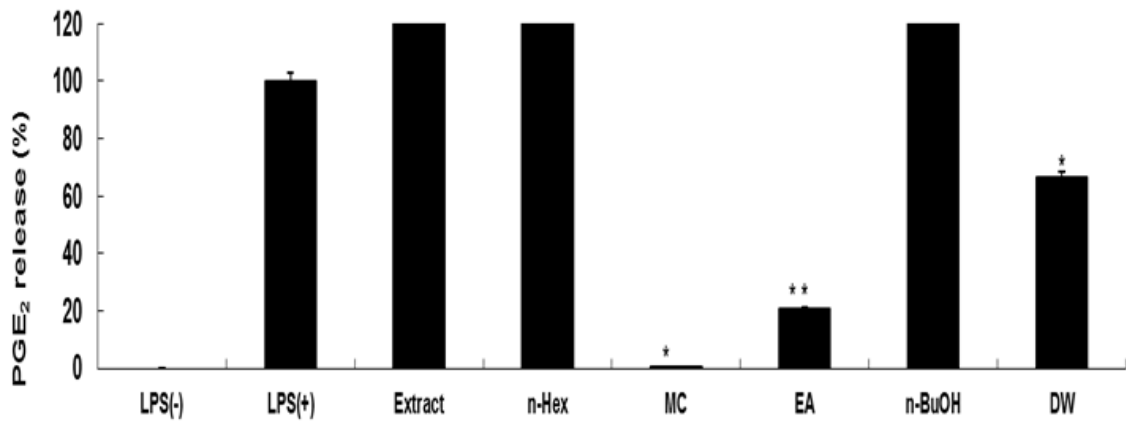


Figure 3-1. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Cells(1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) Supernatants were collected, and the PGE₂ concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

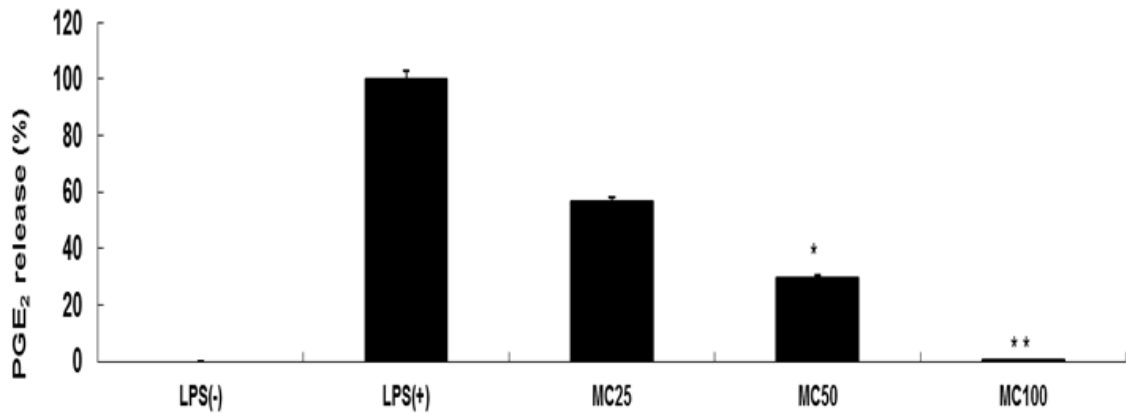


Figure 3-2. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Cells(1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24h in the presence of CH₂Cl₂ fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the PGE₂ concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

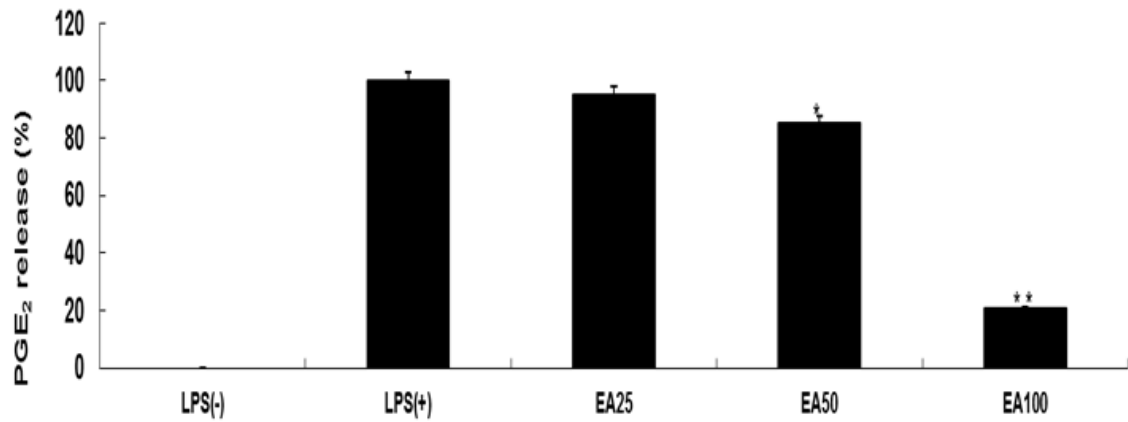
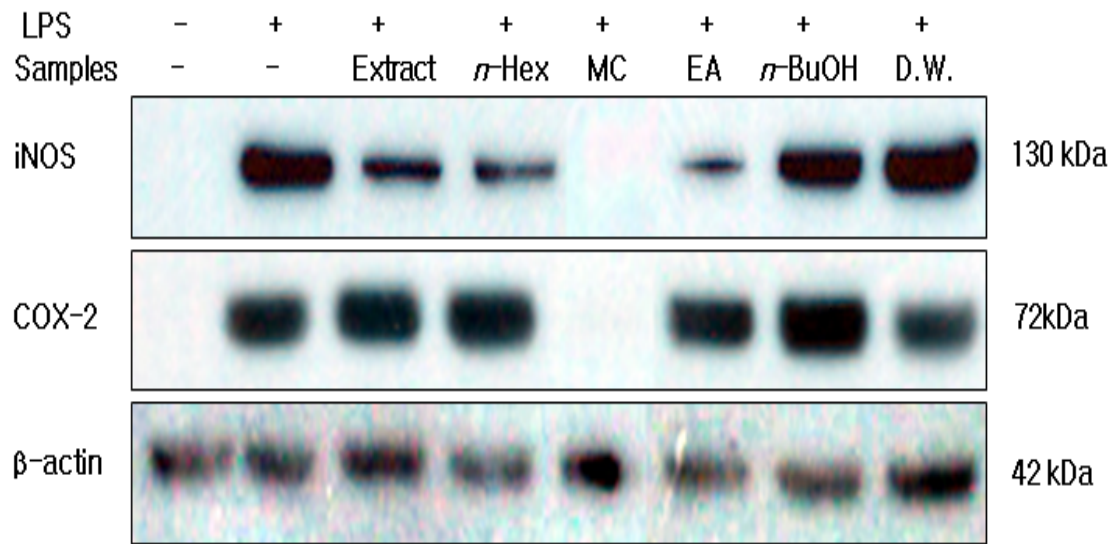


Figure 3-3. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Cells(1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24h in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the PGE₂ concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

1.5. iNOS, COX-2 발현 억제 활성

신서란 추출물 및 분획물에 의한 NO, PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2의 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 이들 단백질 수준을 Western blot analysis로 확인하였다. RAW 264.7 cell에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 추출물과 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 배양한 후 iNOS, COX-2의 발현 억제 활성을 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서는 iNOS, COX-2의 발현이 현저히 증가하였고 methylene chloride 분획물과 ethyl acetate 분획물에서 iNOS, COX-2의 발현을 억제함을 알 수 있었다 (Figure 4-1). 이에 이 두 분획물에 대하여 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 동일한 방법으로 재연하였다. 그 결과 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 발현을 억제함을 알 수 있었다 (4-2, 4-3).

A



B

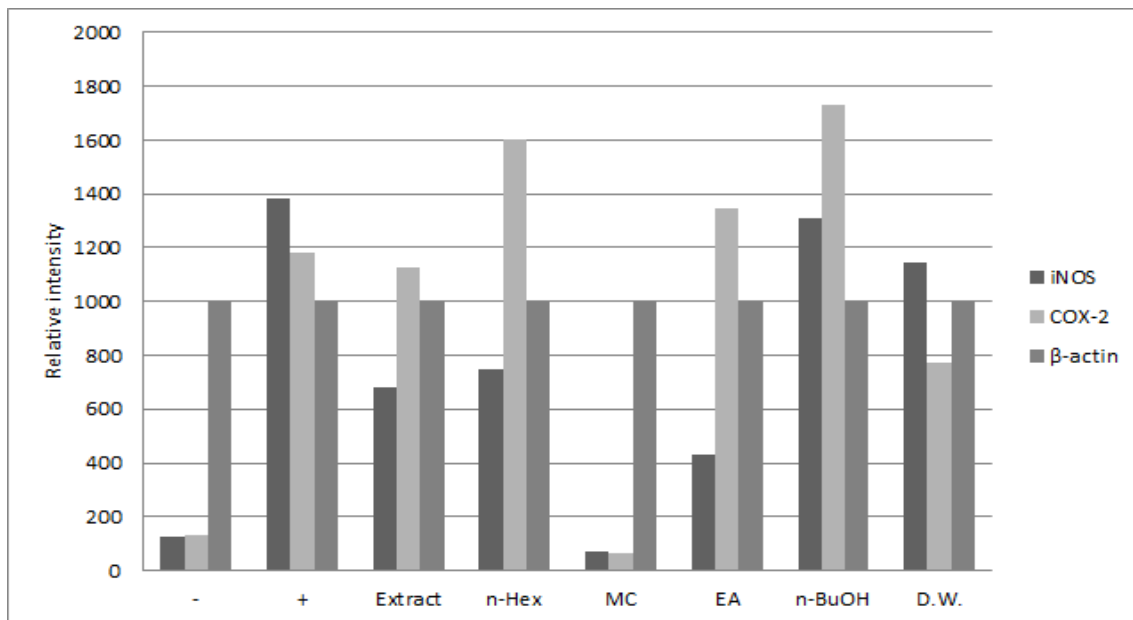
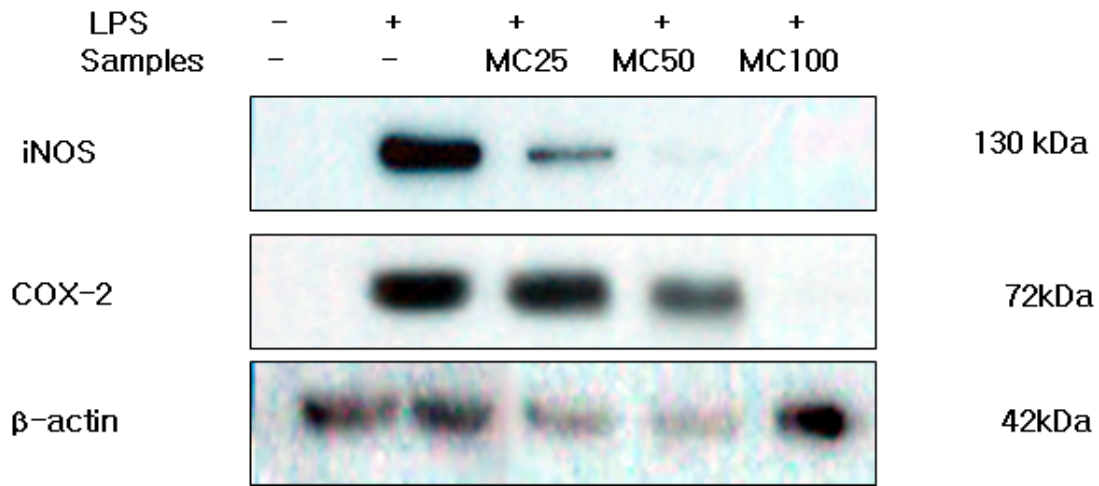


Figure 4-1. Inhibitory effects of 70% EtOH extract and solvent fractions on iNOS and COX-2 protein level in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.2×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions ($100 \mu\text{g/mL}$) for 24 hr. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method. (A) Western blot, (B) Relative intensity

A



B

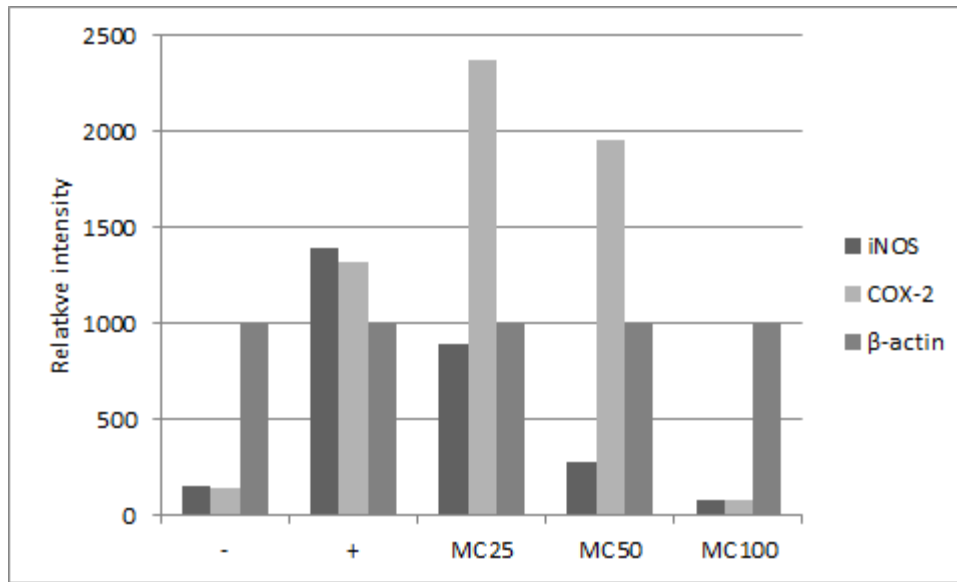
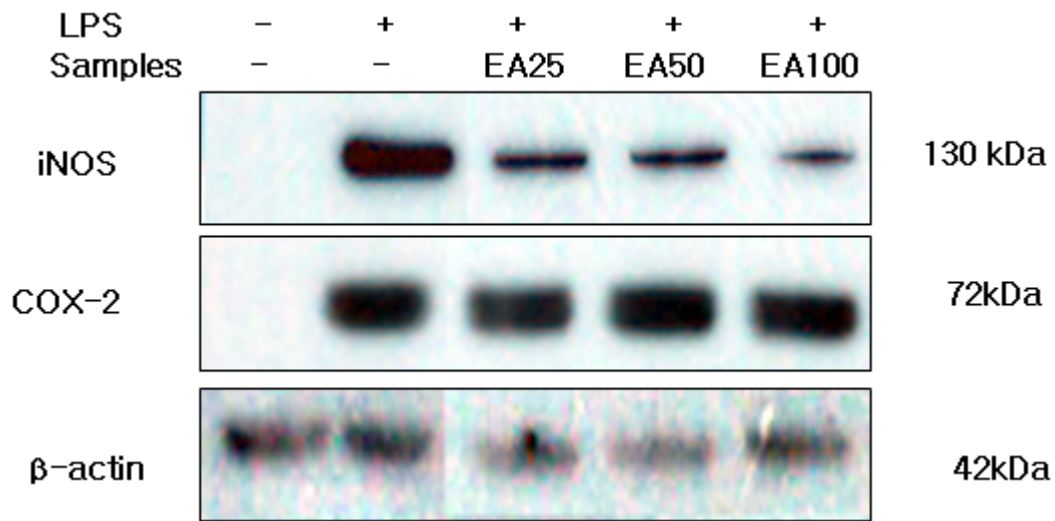


Figure 4-2. Inhibitory effects of CH_2Cl_2 fractions on iNOS and COX-2 protein level in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.2×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of CH_2Cl_2 fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method. (A) Western blot, (B) Relative intensity

A



B

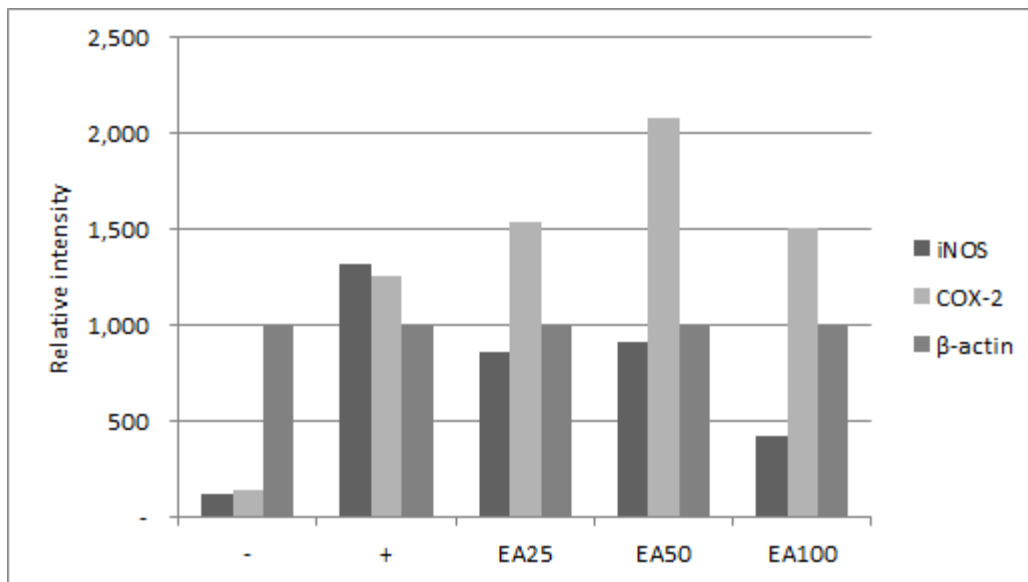


Figure 4-3. Inhibitory effects of ethyl acetate fractions on iNOS and COX-2 protein level in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.2×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g/mL}$) for 24 hr. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method. (A) Western blot, (B) Relative intensity

1.6. pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL- β) 생성 억제 활성

신서란 추출물 및 분획물이 RAW 264.7 cell에서 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 와 IL-6 및 IL-1 β 의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ELISA kit를 이용하여 RAW 264.7 cell에 LPS(1 μ g/mL)와 추출물, 분획물을 100 μ g/mL 농도로 처리하여 TNF- α 와 IL-6, IL-1 β 의 생성 억제 활성을 확인하였다. LPS 무처리군의 pro-inflammatory cytokine 생성을 0%, LPS 처리군의 pro-inflammatory cytokine 생성을 100%로 하여 비교였다.

TNF- α 의 생성억제는 methylene chloride 분획물 (30% 수준)과, ethyl acetate 분획물 (50% 수준)에서 억제하고 있음을 확인하였다 (Figure 5-1). 이 두 분획물에 대하여 농도별 (25, 50, 100 μ g/mL)로 TNF- α 의 생성 억제 활성을 조사한바 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다 (Figure 5-2, 5-3).

IL-6의 생성억제는 Figure 5-4에서 보는 바와 같이 methylene chloride 분획물 (15% 수준)과, ethyl acetate 분획물 (50% 수준)에서 억제하고 있음을 확인하였다. 이 두 분획물에 대하여 농도별 (25, 50, 100 μ g/mL)로 IL-6의 생성 억제 활성을 조사한바 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다 (Figure 5-5, 5-6).

IL- β 의 생성억제는 methylene chloride 분획물 (0% 수준)과, ethyl acetate 분획물 (10% 수준)에서 억제함을 확인하였다 (Figure 5-7). 이 두 분획물에 대하여 농도별 (25, 50, 100 μ g/mL)로 IL- β 의 생성 억제 활성을 조사한바 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다 (Figure 5-8, 5-9).

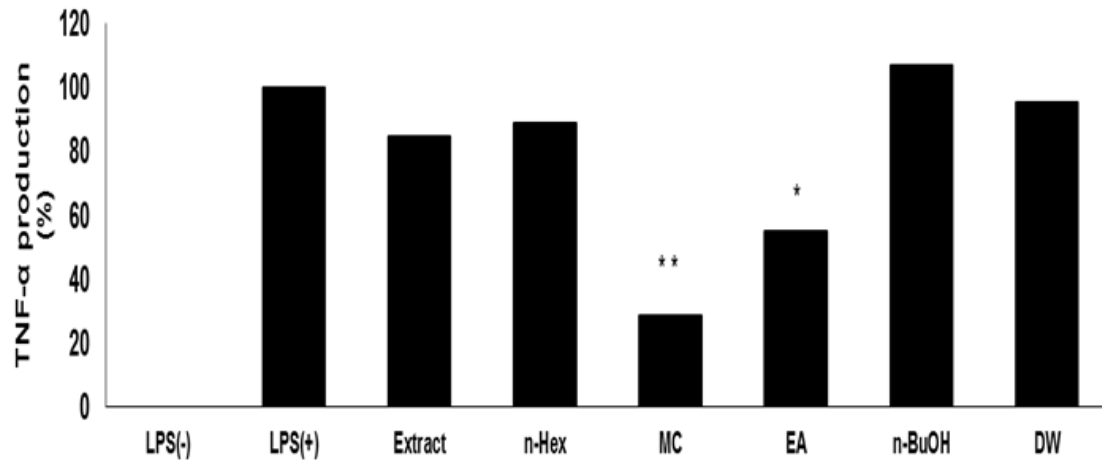


Figure 5-1. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on TNF- α production in RAW 264.7 cells. Cells(1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions($100 \mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the TNF- α concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

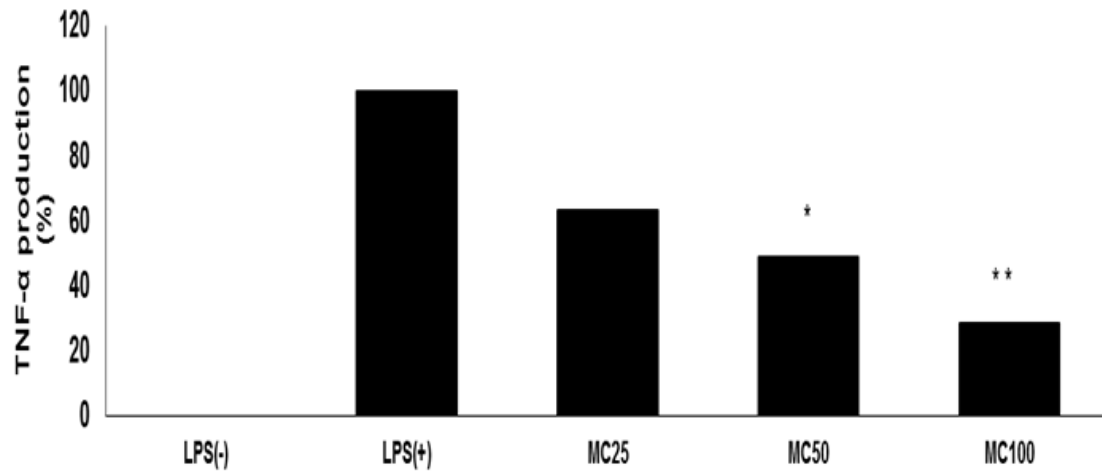


Figure 5-2. Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fractions on TNF- α production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of CH_2Cl_2 fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Supernatants were collected, and the TNF- α concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

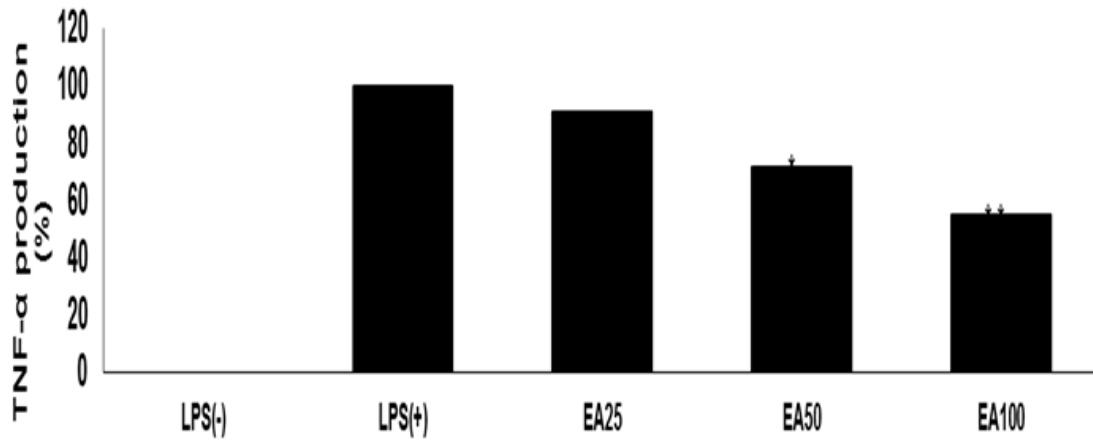


Figure 5-3. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on TNF- α production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the TNF- α concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

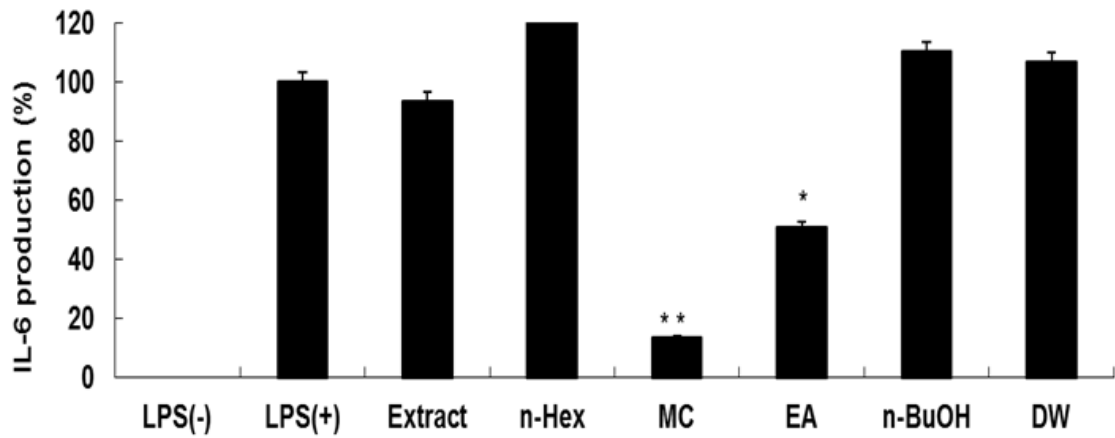


Figure 5-4. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on IL-6 production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions ($100 \mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the IL-6 concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

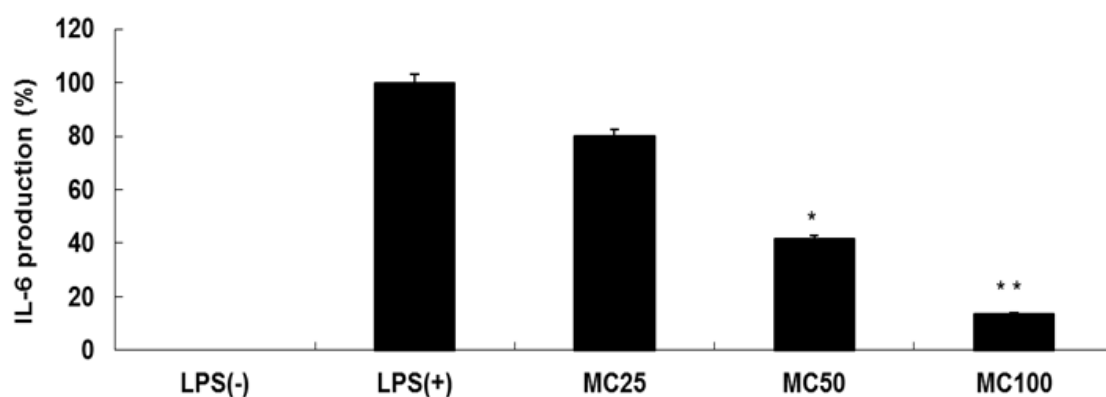


Figure 5-5. Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fractions on IL-6 production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of CH_2Cl_2 fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Supernatants were collected, and the IL-6 concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

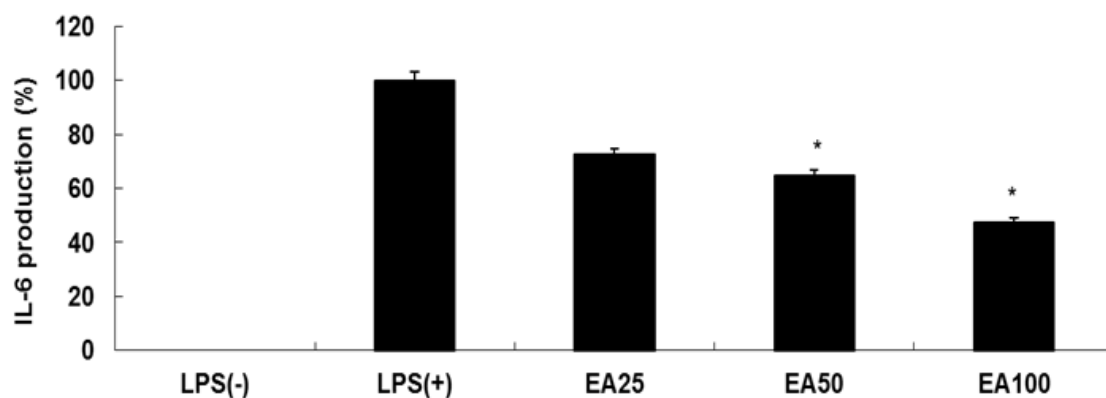


Figure 5-6. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on IL-6 production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Supernatants were collected, and the 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*

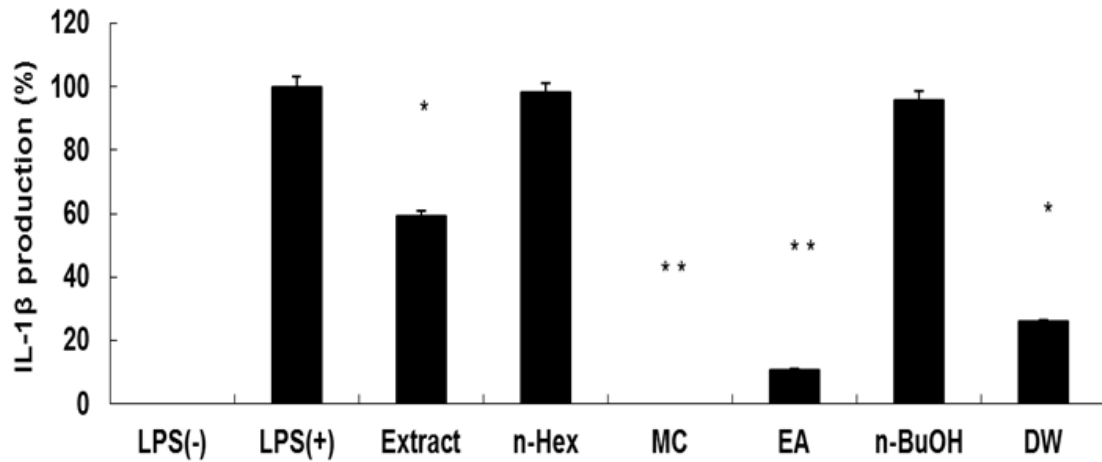


Figure 5-7. Inhibitory effect on 70% EtOH extract and solvent fractions on IL- β production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions ($100 \mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the IL- β concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

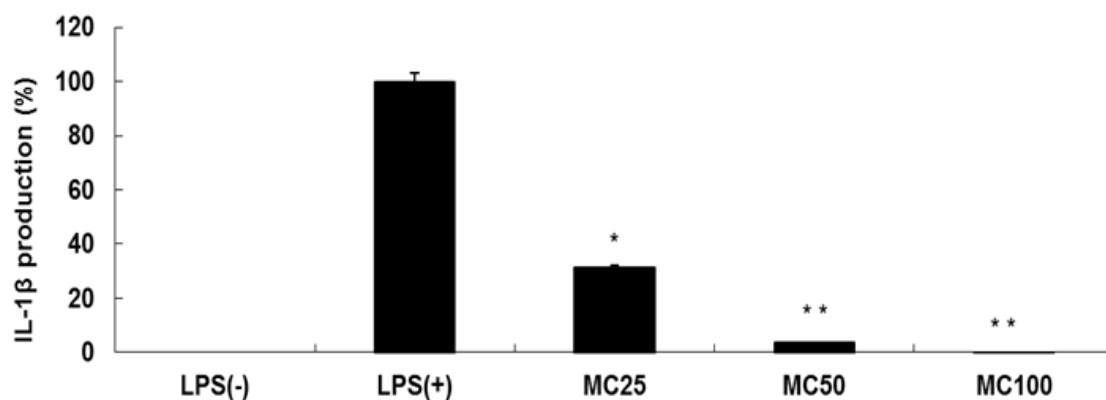


Figure 5-8. Inhibitory effect of fractions CH_2Cl_2 on IL-1 β production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of CH_2Cl_2 fractions (25, 50 and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Supernatants were collected, and the IL-1 β concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

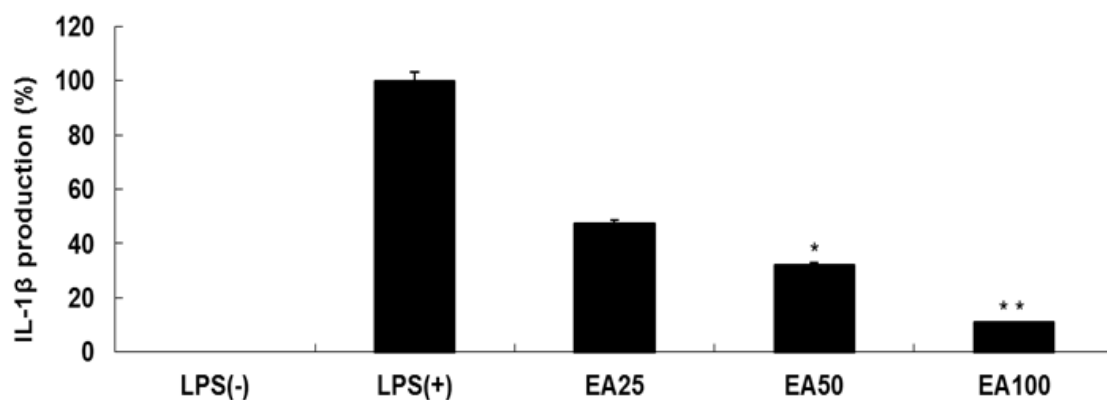


Figure 5-9. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on IL-1 β production in RAW 264.7 cells. Cells (1.8×10^5 cells/mL) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). Supernatants were collected, and the IL-1 β concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

2. 신서란 추출물과 분획물의 아토피 유발 인자 억제 효과

2.1 신서란 추출물과 분획물의 Chemokine 생성 변화에 미치는 영향

신서란 추출물과 분획물의 hIFN- γ (10 ng/mL)로 자극한 HaCaT 세포에서 생성되는 chemokines (MDC와 TARC)에 대한 억제활성을 조사하기 위하여 ELISA assay 방법을 활용하여 조사하였다. HaCaT 세포에 hIFN- γ 10 ng/mL를 처리하여 MDC와 TARC의 생성을 유도하였고 여기에 신서란 추출물과 분획물을 100 μ g/mL 농도로 처리하여 MDC와 TARC의 생성 억제를 확인하였다. (Figure 6-1, 6-4). hIFN- γ 무처리군의 chemokine 생성율을 0%, hIFN- γ 처리군의 chemokine 생성율을 100%으로 하여 각 시료 처리군과 비교하였다.

MDC 생성억제효과를 확인한 바 Figure 6-1에서 보는 바와 같이 methylene chloride 분획물에서 35%, ethyl acetate 분획물에서 7%의 MDC 생성율을 보여 MDC 생성억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이에 두 분획물을 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 처리하여 MDC 생성 억제를 확인하여 본 결과 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 6-2, 6-3).

TARC 생성억제효과를 확인한 바 Figure 6-4에서 보는 바와 같이 추출물, methylene chloride 분획물 48%, ethyl acetate 분획물 16%의 TARC 생성율을 보여 TARC 생성억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이에 두 분획물을 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 처리하여 TARC 생성 억제를 확인하여 본 결과 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 6-5, 6-6).

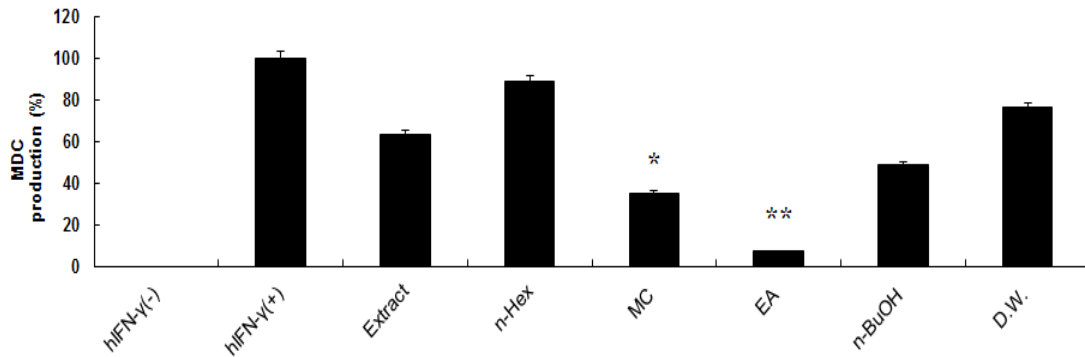


Figure 6-1. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on MDC production in HaCaT cells. MDC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^6 cells/mL) stimulated with hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions (100 μ g/mL). Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

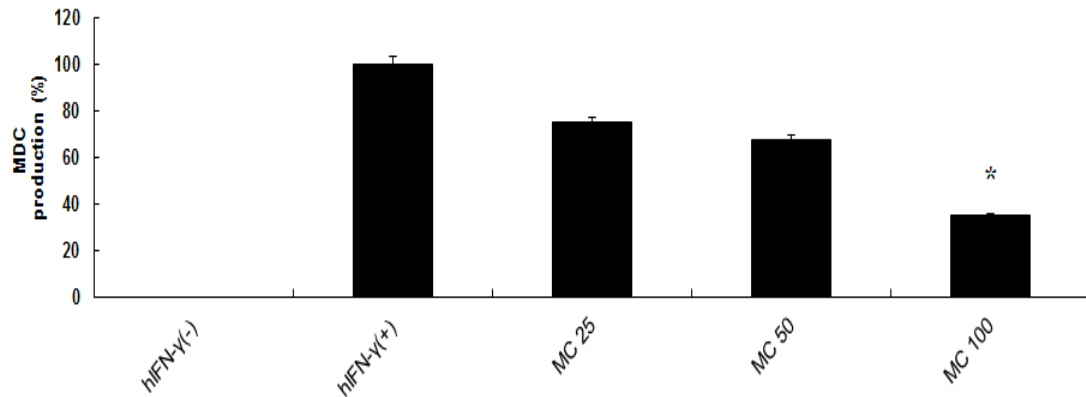


Figure 6-2. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on MDC production in HaCaT human keratinocytes. MDC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^6 cells/mL) stimulated with hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of CH₂Cl₂ fractions (25, 50 and 100 μ g/mL). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

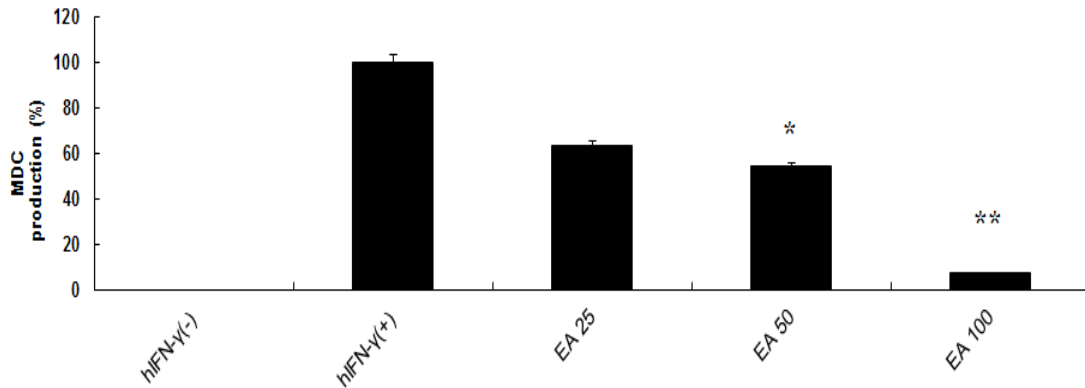


Figure 6-3. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on MDC production in HaCaT human keratinocytes. MDC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^6 cells/mL) stimulated with hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and 100 μ g/mL). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

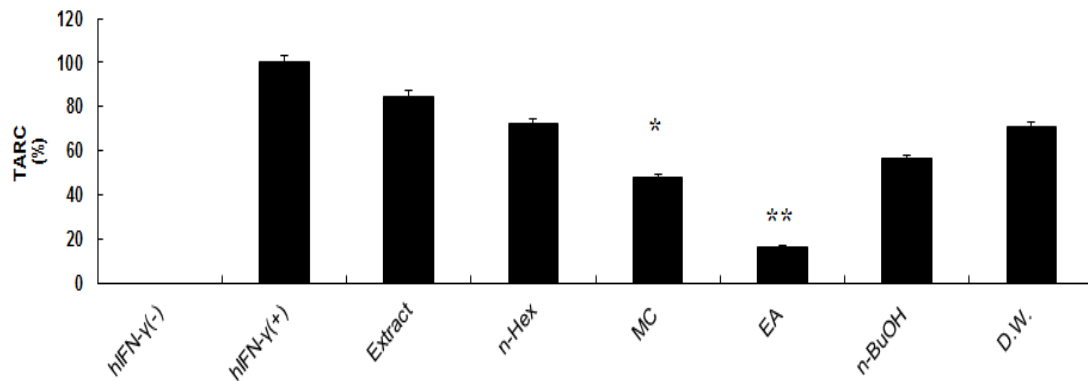


Figure 6-4. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions on TARC production in HaCaT human keratinocytes. TARC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^6 cells/mL) stimulated with hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of 70% EtOH extract and solvent fractions(100 μ g/mL). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

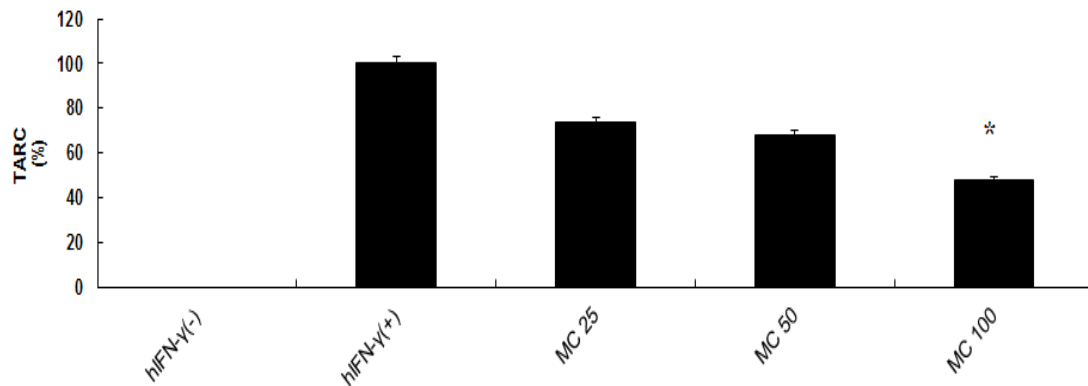


Figure 6-5. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fractions on TARC production in HaCaT human keratinocytes. TARC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^6 cells/mL) stimulated with hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of CH₂Cl₂ fractions (25, 50 and 100 μ g/mL). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

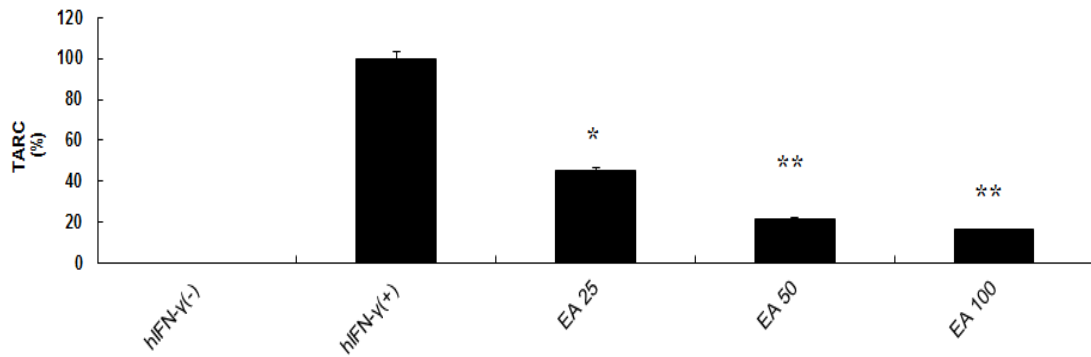


Figure 6-6. Inhibitory effect of ethyl acetate fractions on TARC production in HaCaT human keratinocytes. TARC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^6 cells/mL) stimulated with hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of ethyl acetate fractions (25, 50 and 100 μ g/mL). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

IV. 고 찰

신서란 (*Phormium Tenax*)은 뉴질랜드가 원산지인 용설란과 다년생 상록 초본식물 제주도의 해안지방에 자생하고 있다 (김봉용 등, 2002). 신서란은 일반적으로 각종 끈으로 사용되어졌다. 일부 (뉴질랜드 마오리오족)에서는 화상, 자상 및 설사 치료 용으로 사용되어 졌으며, 신서란 추출물이 미백에 효과가 있다고 보고된 바 있으나 항염증 활성 연구 보고는 아직까지 없다. 이에 본 연구에서는 신서란의 활용가능성 평가를 위하여 신서란 추출물 및 분획물을 이용하여 항산화, 항염증, 아토피 억제 연구하였다. 연구에 필요한 재료는 일반적으로 실험에 사용되고 있는 용매 (70%에탄올)를 이용한 추출물과 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol을 이용하여 분획물을 얻었다.

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성라디칼 (free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다 (Ak and Gülçin, 2008). 신서란의 에탄올 추출물 및 분획물의 항산화 활성은 항산화 표준물질과 비교하여 DPPH의 활성라디칼 (free radical) 소거활성과 Xanthine oxidase/ Superoxide의 소거활성을 확인 하였으며, 그 결과 DPPH 활성라디칼 소거활성에서 높은 농도에서 효과가 있음을 알 수 있었다.

신서란 추출물과 분획물의 세포독성을 확인하기 위하여 LDH 분석을 하였으며 그 결과 10%이내의 세포 독성이 있음을 알 수 있었다.

신서란 추출물과 분획물에 대한 항염증 반응을 확인하기 위하여 LPS 무처리군, LPS 처리군과 추출물 및 분획물 처리군을 비교하여 염증 생성 억제 활성을 조사하였다. LPS 무처리군의 염증발생률을 0%, 처리군의 염증발생률을 100%으로 하여 각 각의 추출물과 분획물 처리군을 비교한 결과 methylene chloride 분획물 처리군에서 항염증 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히 PGE₂ 와 IL- β 의 생성억제활성에서 그 효과가 매우 우수함을 알 수 있었다 (PGE₂ 0%수준, IL- β 1.5% 수준). 이 외의 염증인자에서도 20~30% 수준에서 염증생성을 억제하여 추출물과 타 분획물에 비하여 염증억제효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 신서란 추출물 및 분획물에 의한 NO, PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2의 발현 억제에 의한 것인지 확인하기

위하여 이들 단백질 수준을 Western blot analysis로 확인한 바 LPS 처리군에서 iNOS와 COX-2가 발현되었으며, methylene chloride, ethyl acetate 분획물에서 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 신서란 추출물과 분획물에 의한 NO, PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2의 발현 억제에 의한 것임을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 신서란 분획물의 염증 억제 효과가 확인 되었으며, 이로 인하여 항염증 소재 개발을 위한 기초자료로 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

아토피 피부염에서 MDC와 TARC의 관련성을 연구한 보고에 의하면 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga 쥐의 피부병변에서 MDC와 TARC의 발현이 증가하였고 (Vestergaard et al, 1999), 아토피 피부염 환자에서 혈청 농도가 증가 하였으며, 또한 human keratinocytes인 HaCaT 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 로 자극 했을 때, MDC와 TARC의 발현이 증가한다는 보고가 있다 (Vestergaard, 2001; Yu, 2002; Xiao, 2003). 아토피활성 억제를 확인하기 위하여 HaCaT세포에 hIFN- γ 로 자극하여 chemokine (MDC, TARC) 생성을 유도하여 신서란 추출물과 분획물을 처리하여 그 억제효과를 확인하였다. hIFN- γ 무처리군의 chemokine 생성을 0%, hIFN- γ 처리군의 chemokine 생성을 100%으로 하여 추출물과 분획물의 chemokine 생성억제활성을 조사 하였다. 그 결과 methylene chloride 분획물에서 농도 의존적으로 chemokine 생성을 억제함을 알 수 있었다.

현재 섬유소재, 펄프소재 개발에 국한되어 있는 신서란의 연구가 본 조사의 결과 향후 항염증 및 아토피 억제 효능을 갖는 기능성향장품 개발에 기초자료가 될 것으로 사료된다.

V. 참 고 문 헌

- 김민진, LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 개민들레 (*Hypochoeris radicata* L.) 꽃 에틸아세테이트 분획물의 염증 억제 효과. 제주대학교. (2012).
- 김봉용, 배도규, 김정호, 이현철, 정상진, 정양숙. 미이용 농산자원인 신서란의 고기능 섬유화 기술 및 이 섬유를 이용한 초경량 인쇄용지 개발. 농림축산식품부 보고서. (2002).
- 송상목, RAW 264.7 cell에서 까마귀쪽나무 (*Litsea japonica*) 종자 초임계 추출물의 염증 억제 효과. 제주대학교. (2015).
- 송홍선, 한국농작물백과도감. 풀꽃나무. 1998.
- 윤평섭, 한국원예식물도감. 지식산업사. 1989.
- Baik Y. H., *Salviae miltiorrhizae* root inhibits atopic dermatitis in the DNCB-induced atopic dermatitis NC/Nga mice. *Kyung Won Univ.* (2005)
- Baumer W., Seegers U., Braun M., Tschernig T. and Kietzmann M. TARC and RANTES, but not CTACK, are induced in two models of allergic contact dermatitis. Effects of cilomilast and diflorasone diacetate on T-cell-attracting chemokines. *British Journal of Dermatology.* (2004) 151:823-830.
- Belperio J.A., M. Dy, Murray L., Burdick M.D., Xue Y.Y., Strieter R.M. and Keane M.P. The role of the Th2 CC Chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. *The journal of immunology.* (2004) 173:4692-4698.
- Best S. M., Morris K. L., Shannon J. G., Robertson S. J., Mitzel D. N., Park G.

- S., Boer E., J. Wolfenbarger B. and Bloom M. E. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-born flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of virology*. (2005) 12828-12839.
- 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
- Chang K. Y., Cho S. Y., Kang H. J. and Hahm J. H.. Clinical and laboratory relevance of atopic dermatitis to its degree of severity. *Ewha Med J*. (1998) Vol. 21, No. 3. 181-187
- Chen L., Martinez O., Overbergh L., Mathieu C., B. Prabhakar S. and Chan L. S. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin exp immunol*. (2004) 138:375-387.
- 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
- Esche C., De Benedetto A. and Beck L. A.. Keratinocytes in atopic dermatitis: Inflammatory signals. *Current allergy and asthma reports*. (2004) 4:276-284
- 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
- Han S. K., Yun J. Y., Yi S. Y. Gamma irradiation-reduced IFN- γ expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity. *Journal of Biochemistry and*

Molecular Biology.(2002) Vol. 35, No. 6. 583-589.

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

Ivashkiv L .B. and Hu X. Singaling by STATs. *Arthritis research*.(2004) 6: 159-168

Jakubzick C., Wen H., Matsukawa A., Keller M., Kunkel S.L and Hogaboam C.M.. Role of CCL4 ligands, CCL17 and CCL22, during schistosoma mansoni egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. *American journal of pathology*.(2004) Vol. 165, No. 4. 165:1244-1221

Ji-Young Kim, Weon-Jong Yoon, Eun-Young Yim, Soo-Yeong Park, Young-Ju Kim and Gwanpil Song, Antioxidative and antimicrobial activities of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* extracts. *Korean J. Palnt Res.* (2011) 24(2):200-207

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

Kang G. J. Inhibitory effect of organic extracts from *Prunus yedoensis* Matsum barks on the atopic dermatitis-like inflammation. *Cheju National Univ.* (2006.)

Kim JH, Kim DH, Baek SH, Lee HJ, Kim MR, Kwon HJ and Lee CH, Rengylolone 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.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 S. S., Hyun C. G., Lee J., Lee J., J. Kim Y., Park D., In vitro screening of Jeju medicinal plants for cosmeceutical materials. *J. Appl. Biol. Chem.* (2007) 50(4):215-220

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/Ectracellar signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a hyman ovarian cancer cell line. *Cancer Res.* (1999) 59:5133-5142

Komine M., Kakinuma T., Kagami S., Hanakawa Y., Hashimoto K and Tamaki K. Mechanism of thymus and activation-regulated chemokine(TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin. *J invest dermatol.* (2005) 125:491-498

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

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 H. T. A Study on Scouring of Phormium Tenax Fiber of Jeju Island. *Cheju National Univ.*(2004)
- Lee I. J.. Epidermal cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis. *Yonsei Univ.*(2002)
- Maeda S., Fujiwara S., Omori K., Kawano K., Kurata K., Masuda K., Ohno K. and Tsujimoto H. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* (2002) 88:79-87
- 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.
- Min Y. G.. Effects of Sopoongsangagambang administration along with external spray teratment on atopic dermatitis development in NC/Nga mice. *Dongshin*

Univ. (2004).

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

Na Y. H. Role of chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Pediatric allergy and respiratory disease.*(2005) Vol 15, No. 3. 238-241

Ngoc L. P., Gold D. R., Tzianabos A. O., Weiss S. T. and Celedon. C. Cytokines, allergy, and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology.* (2005) 5:161-166

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

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

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

- Rozyk K. J., Targowski T., Paluchowska E., Owczarek W. and Kucharczyk. A.. Serum thymus and activation-regulated chemokine, Macrophage-derived chemokine and eotaxin as marker of severity of atopic dermatitis. *Allergy*. (2005) 60:685-688
- Shinada Y., Takehara K. and Sato S.. Both Th2 and Th1 chemokines(TARC/CCL17, MDC/CCL22, And Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological science*. (2004) 24:201-208
- 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
- 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
- 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
- Strobl B., Arulampalam V., Is'harc H., Newman S.J, Schlaak J.F., Watling D., A.P. Costa-pereira, SchaperF., Behrman I., K. Sheehan C.F., .Schreiber R.D, Horn F., Heinrich P.C. and Kerr I.M. A completely foreign receptor can mediate an interferon- γ -like response. *The EMBO journal*. (2001) Vol. 20 No.19. 5431-5542

- Willeaume V, Kryus V, Mijatovic T, Huez G. Tumour necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *Journal of Inflammation*. (1996) 46: 1-13
- Priscilla M. Wehi & Bruce D. Clarkson. 2007. Biological flora of New Zealand 10. *Phormium tenax*, harakeke, New Zealand flax. *New Zealand Journal of Botany*, 45:4, 521-544
- Stephen E.K. Tauwhare, Roger H. Newman, Suzanne Scheele & Rangi TE Kanawa. 2006. Chemotaxonomy of *Phormium* based on sugar-residue analyses of the leaf exudates. *New Zealand Journal of Botany*, 44:2, 129-133
- McIlroy RJ 1951. Phormium gum. *Journal of the Chemical Society*: 1372-1373
- Riley M. 1994. Maori healing and herbal. An ethnobotanical sourcebook. *paraparaumu*, New Zealand, Viking Sevenses.

6. 요 약

본 연구에서는 신서란 잎의 추출물과 분획물에 대한 항산화, 염증 및 아토피의 개선소재로써 활용 가능성을 확인코자 연구하였다. 항염증 효능을 확인하기 위하여 RAW 264.7 cell에서 신서란 잎 추출물 및 분획물을 활용하여 실험하였다. 아토피 개선 효능을 확인하기 위하여 hIFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 신서란 잎 추출물 및 분획물을 활용하여 실험하였다. 우선 신서란을 70% 에탄올에서 추출물을 제작하였으며, *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol을 이용하여 분획물을 제작하였다. 70% 에탄올을 이용한 추출물과 분획물의 항산화 활성, 염증 억제, 아토피 억제를 확인하였다. 그 결과 항산화 효과는 표준물질과 비교하여 그 효과가 미미하였다. 염증인자 생성 억제 활성은 LPS 무처리군 (0%), LPS 처리군 (100%)과 각 시료를 처리하여 비교분석 하였다. 특히 분획물 중 methylene chloride 분획물과 ethyl acetate 분획물이 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 염증성 매개인자인 prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 nitric oxide (NO)와 pro-inflammatory cytokines (interleukin-6 (IL-6), interleukin- β (IL- β), tumour necrosis factor- α (TNF- α))의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. 또한 신서란 추출물 및 분획물에 의한 NO, PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2의 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 이들 단백질 수준을 Western blot analysis로 확인한 바 LPS 처리군에서 iNOS와 COX-2가 발현되었으며, methylene chloride, ethyl acetate 분획물에서 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었다.

아토피 억제효과를 확인하기 위하여 HaCaT 세포에 interferon γ (INF- γ)로 자극을 주어 유도되는 chemokines (MDC와 TARC)의 활성억제를 조사하였다. 그 결과 MDC, TARC 생성억제에 methylene chloride, ethyl acetate 분획물이 농도 의존적으로 효과가 있었다. 한바 효능이 있음을 알 수 있었다.

위의 결과들을 통해 신서란 추출물과 분획물은 항산화효과는 미미한 것을 알 수 있으며, 항산화효과는 methylene chloride 분획물에서 농도 의존적으로 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 아토피 억제 효과는 분획물에서 효능이 있음을 알 수 있다. 이 조사 결과를 통하여 신서란을 활용한 기능성 향장소재로의 개발을 위한 기초자료로서 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

호기 있게 처음 대학원을 등록 한 것이 엇그제 같은데 긴 시간이 주마등 같이 흘렀습니다. 주마등처럼 시간이 흐를수록 ‘대학원을 졸업 할 수 있을까?’란 막연함과 불안감에 잠 못 이룬 적도 있었지만 주변 분들의 동력을 통해 한걸음 더 나아갈 수 있었습니다. 제가 이렇게 논문을 쓰는 과정에서 많은 분들의 도움이 있었기에 이렇게 글로나마 감사의 마음을 전하고자 합니다.

대학 새내기 시절부터 저에게 항상 많은 관심과 격려를 해주시고 과학자의 길을 추천 해주신 김찬식 교수님 감사합니다. 실험실을 그만두고 졸업을 한 후에 찾아가 대학원진학을 의논하였을 때 흔쾌히 허락을 해 주셨기에 자신감을 갖고 대학원도 다닐 수 있었고 많은 것을 배울 수 있었습니다. 그리고 이제 이렇게 졸업을 하게 되었습니다. 앞으로 더 발전하는 저의 모습을 보여 드리는 것이 조금이나마 보답할 수 있는 방법이라는 것을 알기에 더 열심히 하겠습니다. 그리고 바쁘신 와중에도 많이 부족했던 저의 논문을 심사해주시고 수정 할 수 있게 도움을 주신 김인중 교수님과 김소미 교수님께 진심으로 감사드립니다. 대학원 생활을 하면서 많은 배움을 주신 교수님들과 학교선배님들께도 감사합니다.

제가 생물종다양성연구소에 근무하면서도 졸업을 할 수 있게 많은 도움과 배려를 해 주신 김창숙 소장님과 박수영 팀장님, 윤원종 팀장님을 비롯한 연구소 식구들에게 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 바쁜 와중에도 많이 신경써준 상목이, 용범이, 학교선배이자 인생선배로서 많은 가르침은 준 도승 형, 옆자리에서 많은 도움을 준 김윤순 선생님 감사합니다. 때론 친구로 때론 선배로 많은 도움을 준 경식이, 대주와 경후, 종철형, 현철선생님 등 모든 연구소 식구들에게 감사함을 전합니다.

끝으로 언제나 힘이 되어 주고 많은 걱정과 사랑을 보내주신 어머니와 형, 누나들 죄송하고 감사합니다. 시작할 때는 혼자였으나 이제 영원한 나의 사람이 되어준 은아에게도 미안하고 고마운 마음을 전합니다. 그리고 하늘에서 막내아들이 항상 행복하고 건강하게 잘 되길 응원하고 계실 아버지께 이 논문을 바칩니다.

