

RAW 264.7 및 HaCaT Cell에서 당유자 미숙과의 염증억제 효과

이혜자¹ · 강경진¹ · 윤원종¹ · 강희경¹ · 김영석² · 김소미³ · 유은숙^{1*}

¹제주대학교 의과대학 약리학교실, ²이화여자대학교 식품영양학과, ³제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

Anti-inflammatory Effect of Unripe Fruit of *Citrus grandis Osbeck* in RAW264.7 and HaCaT Cells

Hye-Ja Lee¹, Gyeong-Jin Kang¹, Weon-Jong Yoon¹, Hee-Kyoung Kang¹,
Young-Suk Kim², So-Mi Kim³, and Eun-Sook Yoo^{1*}

¹Department of Pharmacology, College of Medicine, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea

²Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, 11-1 Daehyun-dong, Sodaemooon-gu, Seoul, Korea

³Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea

Abstract – We investigated the anti-inflammatory activities of unripe fruit of *Citrus grandis Osbeck* growing at Jeju Island, through the evaluation of their inhibitory effect on the production of inflammatory markers (IL-6, iNOS, COX, TARC and MDC) in RAW264.7 murine macrophage cells and HaCaT human keratinocyte cells. Among the sequential solvent fractions obtained from crude extract, hexane and chloroform (CHCl₃) fractions showed potential inhibitory activity on the mRNA expressions of IL-6, iNOS and COX-2 at the concentration of 100 µg/ml in RAW264.7 cells. Also, EtOAc fraction showed inhibitory activity on the thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 and macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 at the concentration of 50 µg/ml in HaCaT cells. These results suggest that the unripe fruit of *C. grandis* may have anti-inflammatory activity through the suppression of inflammatory markers (IL-6, iNOS, COX, TARC and MDC).

Key words – *Citrus grandis Osbeck*, IL-6, iNOS, COX, TARC, MDC

감귤류란 운향과 감귤아과에 속하는 식물을 말하며, 감귤로 취급하는 것은 감귤속 (*Citrus*), 금귤속 (*Fortunella*), 탕자나무속 (*Poncirus*) 및 클리메니아 (*Clymenia*)의 4속이 있다. 원산지는 인도로부터 중국 중남부에 이르는 아시아 대륙의 동남부와 그 주변으로 추정되고 있으며, 남쪽으로는 인도차이나, 말레이 반도를 거쳐 전파되었고 동쪽으로는 중국을 거쳐 우리나라와 일본에까지 전파되었으며, 국내에서는 제주도가 유일한 산지이다.

당유자는 제주에서 왕귤 또는 탕유지라고 불리우며, 인체에 기능성을 가지는 성분으로 limonene, obacunone, nomiline, naringin 등을 함유하고 있는데, 특히 limonoid 성분이 다량 함유되어 있어 암세포 증식 억제 및 예방에 효과가 있고, 임상실험 결과 간, 폐, 장, 피부암 억제에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 당유자 껍질은 두텁고 맛은 달며, 독이 없고 위 속에 약기를 없애며 술독을 풀어주고 입맛을 좋게 하는

것으로 알려져 있으며,¹⁾ 최근 당유자 추출물을 이용한 실험에서 항바이러스 효과 및 항산화 효과가 있는 것으로 보고되었다.²⁻³⁾

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다.⁴⁾ 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁹⁾ 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성으로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정

*교신저자(E-mail) : eunsyoo@cheju.ac.kr
(FAX) : 064-702-2687

으로 이어지게 된다.¹⁰⁻¹¹⁾ 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만,¹²⁾ 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁴⁾

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다.¹⁵⁾ COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하며,¹⁶⁾ COX-2는 염증매개물질인 PGE₂를 형성시킨다. Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾

케모카인은 다양한 종류의 백혈구의 이동과 활성화를 조절하는 사이토카인의 한 그룹으로 조직으로의 염증세포의 침윤을 조절한다.¹⁸⁾ 최근의 연구결과 Th1과 Th2 세포는 서로 다른 케모카인 수용체를 발현하는 것으로 나타났다. 이 중 Th2 세포는 CC케모카인 수용체-4(CCR4)를 발현하며, CCR4는 thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17과 macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22의 수용체이다.¹⁹⁾ TARC는 염증병변으로 Th2 세포의 이주 (migration)를 선택적으로 조절하는 케모카인으로 보고 되었으며, 흉선에서 기본구성 (constitutive)으로 발현되고 단핵구유래 (monocyte derived)-수지상세포와 내피세포, 수지상세포, 그리고 각질세포 등에서 생성되며, 특히 T 세포의 피부귀소에 중요한 케모카인으로 알려져 있다.²⁰⁻²¹⁾

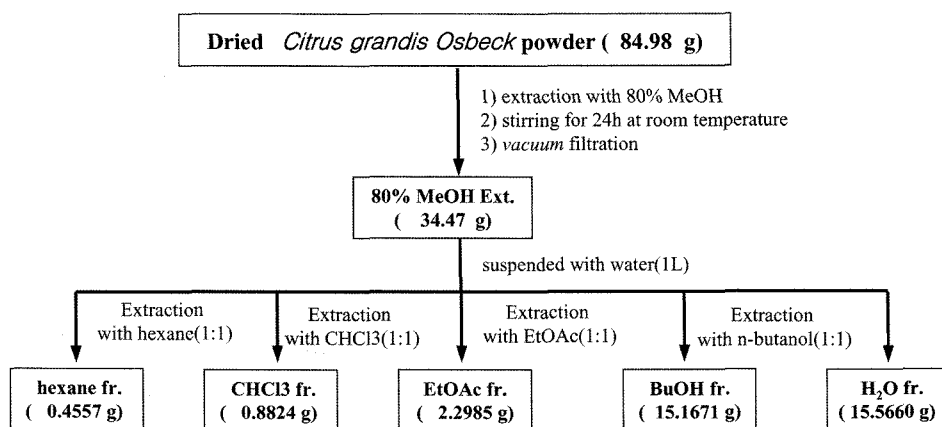
최근, TARC와 MDC의 아토피피부염과 관련된 연구에서는 아토피피부염 동물모형에서 TARC 와 MDC의 피부발현이 증가되었고, 아토피피부염 환자에서 혈청농도가 증가된 것이 보고되었다.²²⁾ 또한, 알레르기 천식이나 비염과 같은 호흡기 알레르기 질환에서도 중요한 역할을 함이 보고되었다.²³⁻²⁴⁾

당유자 미숙과에는 성숙되었을 때에 비하여 비타민 C 함량은 적지만, citric acid가 2배 이상 높아 상큼한 맛을 낼 수 있고, 항알러지작용 및 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 플라보노이드 성분인 naringin이 5배, hesperidin이 10배 더 많은 것으로 보고되었다.²⁵⁾ 민간에서는 과즙을 다려서 복용하면 위장장애, 천식 동맥경화 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 이러한 활성 및 그 기전에 대한 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제주에서 재배되는 당유자 미숙과 추출물에 대하여 RAW264.7 세포 및 HaCaT 세포에서 염증성 인자로 알려진 IL-6, iNOS, COX-2, TARC 및 MDC의 생성 및 활성 억제를 조사하여 기능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

시료추출 - 제주도에서 재배되고 있는 당유자 미숙과를 8월에 채집하여 동결건조 한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 미세말 시료 (84.98 g)를 80% methanol (MeOH)로 2회 교반 추출 후 여과하여 감압 농축하여 용매를 증발시켰다. 여기에서 얻은 MeOH 추출물 (34.47 g)을 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획 (0.46 g), chloroform 분획 (0.88 g), ethylacetate (EtOAc) 분획 (2.30 g), butanol (n-BuOH) 분획 (15.17 g), H₂O 분획 (15.57 g)을 얻어 실험시료로 사용하였다 (Scheme 1).

세포 및 시약 - Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포를 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양 받아 배양하였고, Dr. M. J. Cho (Cheju National University, Korea)로부터 변형된 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3~4일에 한번씩 계대 배양을 시행하였다. Lipopoly-saccharide (LPS, E. coli



Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from *Citrus grandis Osbeck*.

serotype 0111:B4)를 Sigma로부터 구입하여 사용하였으며, interferon- γ (mIFN- γ , recombinant E. coli)와 human interferon- γ (hIFN- γ , recombinant E. coli)를 Roche로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

세포독성평가 - RAW264.7 세포 (1.5×10^6 cells/ml)를 18 시간 전 배양하고 시험 약물과 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) $100 \mu\text{g}$ 을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) $150 \mu\text{l}$ 를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제정도를 조사하였다.

HaCaT 세포 (5.0×10^5 cells/ml)를 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지에 시험 약물과 IFN- γ (10 ng/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분 원심분리 하였다. LDH 활성을 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (promega, USA)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심분리하여 얻은 배양 배지 $50 \mu\text{l}$ 와 reconstituted substrate mix를 $50 \mu\text{l}$ 를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 $50 \mu\text{l}$ 의 stop solution을 넣어 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포 독성을 평가하였다.

Nitric oxide 측정 - RAW264.7 세포에 대하여 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 시험물질과 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 $100 \mu\text{l}$ 와 Griess시약 [1% (w/v) sulfani-lamide, 0.1% (w/v) naphyl-ethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] $100 \mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 serial dilution(연속 희석)하여 얻었다 ($1-100 \mu\text{M}$).

Immunoblotting - RAW264.7 세포 (1.0×10^6 cells/ml)를 18시간 전 배양을 하고, LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)/IFN- γ (50 U/ml)로 자극을 주고 시료 ($50 \mu\text{g/ml}$)를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 2~3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 $300 \mu\text{l}$ 의 lysis buffer을 첨가, 30분~1시간동안 lysis 시킨 후 원심분리 ($15,000 \text{ rpm}$, 15 min)하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표

준화하여 Bio-Rad Protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μg 의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skin milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-mouse iNOS (Santa-Cruz)를 TTBS 용액에서 희석(1:1000)하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Co.)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TTBS로 4회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR - RAW264.7 세포 (1.5×10^6 cells/ml)를 18 시간 전 배양하고 시험 약물과 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)를 동시 처리하여 24시간 배양하고, HaCaT 세포 (5.0×10^5 cells/ml)를 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지에 시험 약물과 IFN- γ (10 ng/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 이용하여 분리하였으며, 모든 실험은 RNase-free한 조건 하에서 이루어졌다.

cDNA 합성을 Improm-II™ cDNA kit (Promega)를 이용하여, $1 \mu\text{g}$ 의 total RNA를 oligo(dT)₁₈ primer, dNTP ($0.5 \mu\text{M}$), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70°C 5 min, 25°C 5 min, 37°C 60 min, 그리고 70°C에서 15 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)을 $2 \mu\text{l}$ cDNA, $4 \mu\text{M}$ 의 5'과 3' primer, 10× buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 최종 $25 \mu\text{l}$ 로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94/45초, 55~58/45초, 72/60초 30회이며, PCR에 의하여 생성된 산물을 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

세포 독성에 미치는 영향 - RAW264.7 세포 (1.5×10^6 cells/ml)에 시험 약물과 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)를 동시 처리하여 24 시간 배양한 후, MTT assay 방법을 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, 모든 분획물에서 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1-a).

LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중

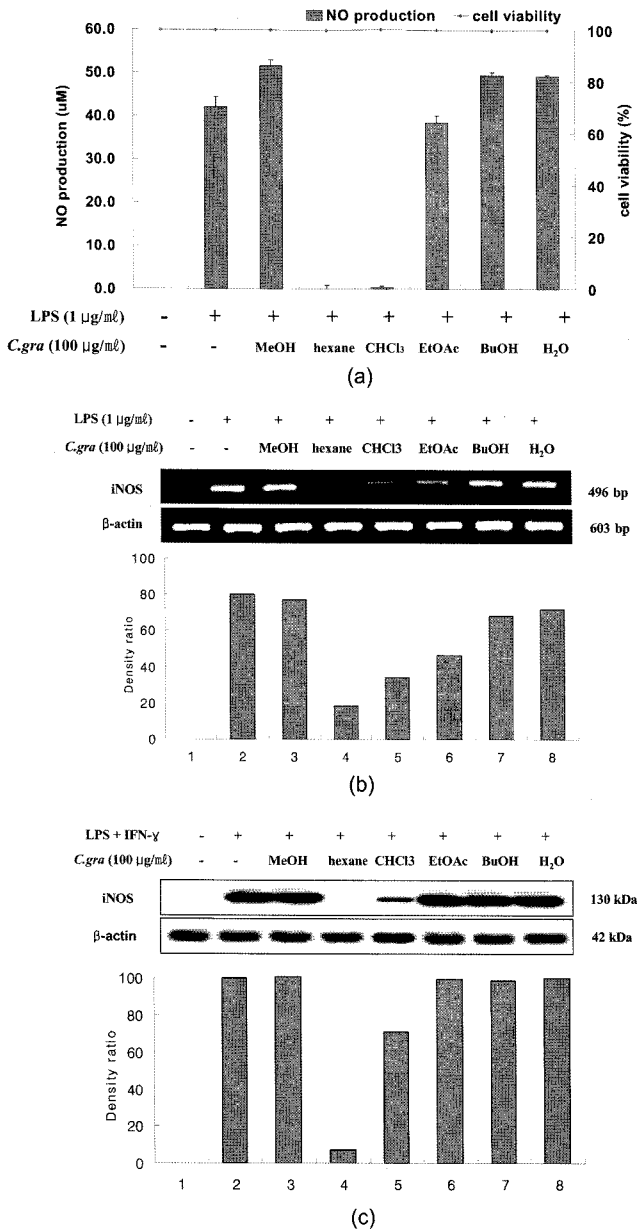


Fig. 1. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the nitric oxide production and iNOS expression in RAW264.7 cells. (a) The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/ml) in the presence of *C. grandis* (100 µg/ml). Cell viability was determined using MTT method. (b) The mRNA expression of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/ml) in the presence of *C. grandis* (100 µg/ml). (c) The protein level of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/ml) in the presence of *C. grandis* (100 µg/ml).

으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. 변형된 인간각질형성 세포인 HaCaT 세포에 IFN-γ (10 ng/ml)로 케모카인을 유도하고, 당유자 미숙과 추출물을 처리한 결과, 모든 분획

물에서 대조군 흡광도와 대비하여 30% 이하로 독성을 나타내지는 않았다 (Fig. 5).

Nitric oxide 생성억제 효과 - 활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 당유자 미숙과 추출물의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 실험결과 hexane 분획물 및 chloroform 분획물에서 대조군인 LPS 단독처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1-a).

iNOS 발현에 미치는 영향 - iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간동안 다량의 nitric oxide (NO)를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.²⁶⁻²⁸⁾

RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 당유자 미숙과에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS에 의해 iNOS는 현저히 증가하였으며, 당유자 분획물을 처리한 결과 hexane 분획물과 chloroform 분획물이 iNOS의 mRNA 발현을 강하게 억제하였다 (Fig. 1-b). 또한, LPS (1 µg/ml) 및 INF-γ (50 U/ml)를 사용하여 단백질 발현에 대한 억제정도를 immunoblotting을 통해 알아보았다. 그 결과 단백질 수준에서도 hexane 및 chloroform 분획물이 LPS 및 INF-γ 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 1-c). 이러한 결과는 NO의 생성 억제가 iNOS 발현 억제를 통한 것으로 여겨진다.

COX-2 발현에 미치는 영향 - 다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것이다. COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘어 지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin의 합성에 작용하며, 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다.²⁹⁻³⁰⁾ 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다. RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)로 자극을 주고 당유자 추출물을 처리하여 확인한 결과, hexane 분획물에서 강한 억제 효과를 보였으며, chloroform 분획물에서는 약한 억제 활성을 보였다 (Fig. 2).

Interleukin-6 생성에 미치는 영향 - Pro-inflammatory cytokine인 IL-6는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다. RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)과 당유

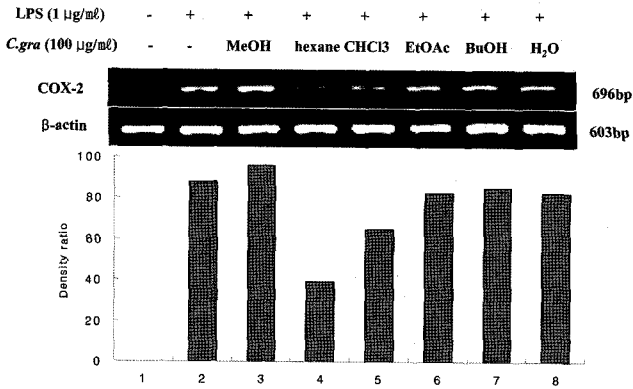


Fig. 2. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the mRNA expression of COX-2 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of COX-2 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/ml) in the presence of *C. grandis* (100 µg/ml).

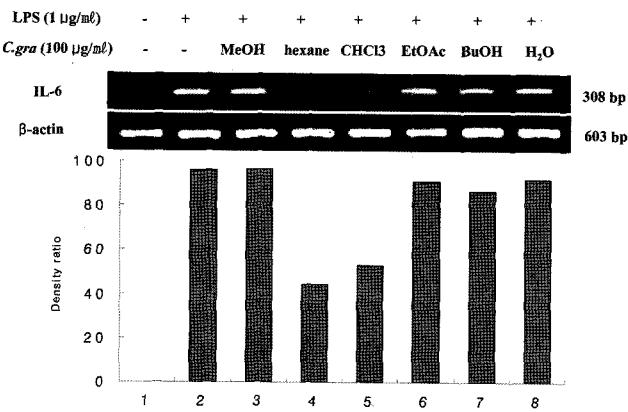


Fig. 3. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the mRNA expression of IL-6 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of IL-6 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/ml) in the presence of *C. grandis* (100 µg/ml).

자 추출물을 처리하여 IL-6 생성에 대한 억제 효과를 조사하였다. 당유자 추출물을 처리한 결과 hexane 분획물과 chloroform 분획물에서 강한 억제 효과를 보였다 (Fig. 3).

TARC 및 MDC 생성에 미치는 영향 - 각질형성세포는 다양한 사이토카인 (cytokine)과 세포 유착분자 (cell adhesion molecule : CAM)를 통해서 T 림프구와 상호 작용을 통하여 여러 가지 피부 질환의 면역 반응에 관여하게 된다.³¹⁾ 이러한 반응은 T 림프구에서 분비하는 IFN-γ 등의 염증성 사이토카인에 의해서 활성화되며, 최근 IFN-γ가 각질형성세포에서 면역활성 인자로 알려진 TARC 및 MDC 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다.³²⁻³³⁾ 변형된 각질형성 세포인 HaCaT 세포에 IFN-γ (10 ng/ml)로 케모카인을 유도하고, 당유자 미숙과 추출물을 처리한 결과, EtOAc 분획물에서 TARC 발현을 현저히 억제시켰으며 (Fig. 4-a), MDC 발현

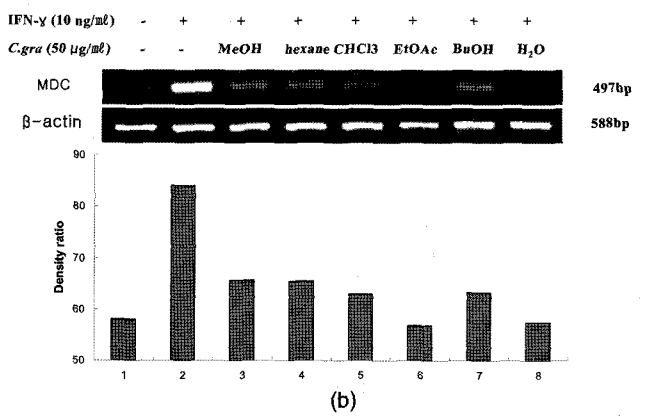
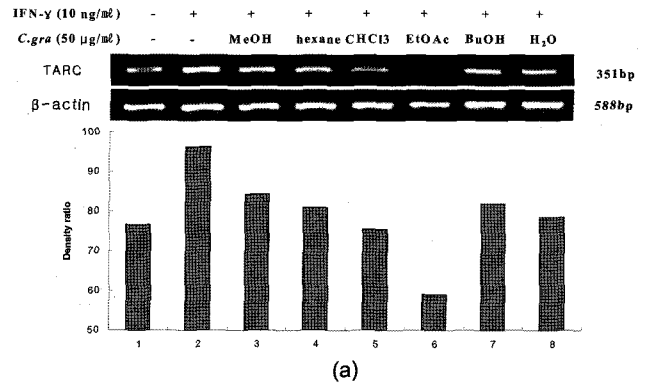


Fig. 4. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the mRNA expression of TARC and MDC in HaCaT cells. The mRNA expression of TARC and MDC were determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN-γ (10 ng/ml) in the presence of *C. grandis* (50 µg/ml).

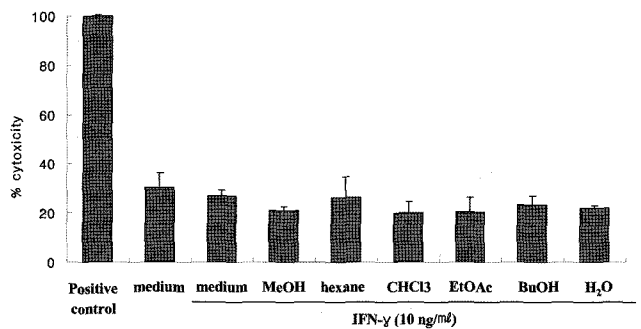


Fig. 5. Cytotoxicity effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the LDH release in HaCaT cells. The activity of LDH in the medium was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN-γ (10 ng/ml) in the presence of *C. grandis* (50 µg/ml). Values are the mean ± SEM of triplicate experiments.

에도 강한 억제 활성을 보였다 (Fig. 4-b).

위의 결과에서 조 추출물 (MeOH ext.)에서 염증성 인자에 대한 억제 활성은 없었으나, 조 추출물로부터 얻은 hexane, chloroform 분획물에서 IL-6, iNOS 그리고 COX-2에 대한

활성을 나타내었으며, EtOAc 분획물에서는 TARC 및 MDC에 활성을 나타내어 활성이 특정 분획으로 집중됨을 확인하였다.

결 론

당유자는 제주에서 왕굴 또는 탕유지라고 불리우며, 식용이나 약용으로 용도가 많아 비교적 잘 보존되어 왔으며, 특히 간장병 등에 효과가 있다 하여 한약재로도 사용되어 왔다.

RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 당유자 미숙과 추출물을 처리하여 확인해 본 결과, hexane 분획물과 chloroform 분획물에서 IL-6, iNOS 그리고 COX-2 발현을 억제함을 확인하였다. 그리고 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포에 IFN- γ 로 자극을 주고, 당유자 미숙과 추출물을 처리한 결과 EtOAc 분획물에서 TARC 및 MDC 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 당유자 미숙과로부터 염증을 억제하거나 치료할 수 있는 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다. 또한 당유자 미숙과로부터 염증 억제 성분을 도출하고자 활성분획인 hexane, chloroform 및 EtOAc 분획에 대하여 분리를 진행 중에 있다.

사 사

본 논문은 농림기술관리센터의 지원을 받아 (ARPC 2005073) 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 고정삼 (2001) 감귤산업. 104. 제주문화. 제주.
- Oh, H. S., Park, W. B., An, Y. S., Oh, M. C., Oh, C. K. and Kim, S. H. (2003) Antimicrobial Activity of Extracts from Citrus Seeds. *한국조리학회지*. **9**: 69-80.
- Mokbel, M. S. and Hashinaga, F. (2006) Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food chemistry*. **94**: 529-534.
- Willoughby, D. A. (1975) Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis*. **34**: 471-478.
- Axtelle, T. and Pribble, J. (2001) IC14, a CD14 specific monoclonal antibody is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J. Endotoxin. Res*. **7**: 310-314.
- Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. (2004) Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull*. **27**: 617-620.
- MukIS, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S. and Kuno, K. (1996) Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock; biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kapperB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J. Leukoc. Biol*. **59**: 145-151.
- Lazarov, S., Balutsov, M. and Ianev, E. (2000) The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic(endotoxin) shock. *Vitr. Boles*. **32**: 33-40.
- Scott, M. G. and Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol*. **20**: 407-431.
- Vane, J. A. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like durgs. *Nat. New. Biol*. **23**: 232-235.
- Funk, C. D., Frunk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J*. **5**: 2304-2312.
- Weis, Z. A., Cicatiello, L. and Esumi, H. (1996) Regulation of the mouse inducible -type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and N^G-monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. **316**: 209-215.
- Ryu, J. H. Ahn, H. Kim, J. Y. and Kim, Y. K. (2003) Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res*. **17**: 485-489.
- Mu, M. M., Chakravorty, D., Sugiyama, T., Koide, N., Takahashi, K., Mori, I., Yoshida, T. and Yokochi, T. (2001) The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res*. **7**: 431-438.
- Kim, R. G., Shin, K. M., Chun, S. K., Ji, S. Y. Seo, S. H., Park, H. J., Choi, J. W. and Lee, K. T. (2002) *In vitro* anti-inflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji*. **46**: 343-347.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S, Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 12013-12017.
- Kim, J. Y., Jung, K. S. and Jeong, H. G. (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Letters*. **569**: 321-326.
- Yoshie, O., Imai, T. and Nomiyama, H. (2001) Chemokines in immunity. *Adv. Immunol*. **78**: 57-110.
- Rha, Y. H. (2005) Role of chemokines in the pathogenesis of atopic. *Pediatr Allergy Respir Dis*. **15**: 238-241.
- Fujii-Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Shinazawa, M., Yu, B., Koga, T., Furue, M. and Yanagihara, Y. (2004) Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin

- (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J. Invest. Dermatol.* **122**: 20-28.
21. Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S. and Ponath, P. (1999) The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* **400**: 776-780.
 22. Vestergaard, C., Bang, K., Gesser, B., Yoneyama, H., Matsushima, K. and Larsen, C. C. (2000) A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+ CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 640-646.
 23. Leung, T. F., Wong, C. K., Chan, I. H., Lam, C. W. and Wong, G. W. (2002) Plasma concentration of thymus and activation-regulated chemokine is elevated in childhood asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* **110**: 404-409.
 24. Sugawara, N., Yamashita, T., Ote, Y., Miura, M., Terada, N. and Kurosawa, M. (2002) TARC in allergic disease. *Allergy* **57**: 180-181.
 25. 김승화 (2000) 유자 기능성 물질을 이용한 가공적성 향상 방안. 제주농업시험장. 제주.
 26. Dorman, H. J., Bachmayer, O., Kosar, M. and Hiltunen, R. (2004) Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric Food Chem* **25**: 762-770.
 27. Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes-Ferreira, M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.* **160**: 1025-1032.
 28. Tesuka, Y., Irikawa, S., Kaneko, T., Banskota, A.H., Nagaoka, T., Xiong, Q., Hase, K. and Kadota, S. (2001) Screening of chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *Journal of Ethnopharmacology* **77**: 209-217.
 29. Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 3228-3232.
 30. Hyun, E. A., Lee, H. J., Yoon, W. J., Park, S. Y., Kang, H. K., Kim, S. J. and Yoo, E. S. (2004) Inhibitory Effect of *Salvia officinalis* on the Inflammatory Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthesis in Murine Macrophage RAW264.7. *YAKHAK HOEJI.* **48**: 159-164.
 31. Kim, S. D., Lee, J. Y., Lee, W. J. and Koo, D. W. (2001) Comparative study on the expression of ICAM-1 of pre-immune state keratinocytes induced by trichophyton antigen. *Korean J. Dermatol.* **39**: 39-42.
 32. Horikawa, T., Nakayama, T., Hikita, I., Yamada, H., Fujisawa, R., Bito, T., Harada, S., Fukunaga, A., Chantry, D., Gray, P. W., Morita, A., Suzuki, R., Tezuka, T., Ichihashi, M. and Yoshie, O. (2002) IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int. Immunol.* **14**: 767-773.
 33. Yu, B., Koga, T., Urabe, K., Moroi, Y., Maeda, S., Yanagihara, Y. and Furue, M. (2002) Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF-alpha and IFN-gamma in human keratinocyte and fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* **30**: 29-36.

(2006년 3월 20일 접수)