KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 39, No. 3, pp. 342~347 (2007)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

토종 복분자와 외래종 복분자 추출물의 항염증효과 비교

양현모 · 임순성 · 이연실 · 신현경 · 오양석[1] · 김진경*
한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터, [1]한림대학교 의학유전학교실

Comparison of the Anti-inflammatory Effects of the Extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*

Hyun Mo Yang, Soon Sung Lim, Yeon Sil Lee, Hyun-Kyung Shin, Yang-Seok Oh[1], and Jin-Kyung Kim*
Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University
[1]Department of Medical Genetics, Hallym University

Abstract The dried fruit of the *Rubus coreanus*, which is well-known in Korea and referred to as "Bokbunja," has been employed as a traditional medicine for centuries. This crude drug has been utilized in Korea for the management of impotence, spermatorrhea, enuresis, asthma, and allergic diseases. Our previous study demonstrated that the ethanol extracts of *R. coreanus* have anti-inflammatory effects. The principal objective of the present study was to conduct a comparison of the anti-inflammatory effects of the ethanol extracts of *R. coreanus* and *R. occidentalis*; here, we tested the unripe (URCE), half-ripened (HRCE), and ripened fruits (RCE) of *R. coreanus*, and the unripe (UROE), half-ripened (HROE), and ripened fruits (ROE) of *R. occidentalis*. We found that URCE, UROE, HRCE, and HROE reduced the production of nitric oxide and prostaglandin E_2 as well as pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 murine macrophages. Interestingly, the *R. coreanus* extracts showed stronger inhibitory effects on the production of these inflammatory mediators than the *R. occidentalis* extracts.

Key words: *Rubus coreanus*, nitric oxide, prostaglandin E_2, pro-inflammatory cytokines, macrophages

서 론

복분자는(*Rubus coreanus*) 장미과에 속하고 우리나라 중부 이남의 산기슭 양지에 자라는 식물로 높이가 2~3 m 정도이며, 줄기는 흰 분이 덮여 있고 갈고리 모양의 가시가 있는 것이 특징이다. 5~6월에 꽃이 피며 7~8월에 열매가 성숙되어 둥글고 붉은색으로 익다가 나중에 흑색으로 완숙된다(1). 일본의 경우 복분자를 70여종으로 분류하고 있고, 유럽과 미국 등에서도 *Rubus*속에 속하는 식물을 red raspberry, purple raspberry, black raspberry 류로 분류하여 사용하고 있을 정도로 그 종류가 다양하다(2). 복분자의 생리활성성분은 열매, 잎, 줄기에서 다르게 나타난다. 열매의 생리활성성분으로는 sanguiin H-4, sanguiin H-6와 gallic acid가 보고 되었으며(3), 잎의 생리활성성분으로는 2종의 가수성 tannin(ellagic acid, sanguiin H-5)과 4종의 flavonoids(kaempferol, quercetin, quercetin 3-*O*-β-D-glucuronide-sodium salt, quercetin 3-*O*-β-D-glucuronide-sodium carboxylate)가 보고되었다(4). 줄기에서는 epicatechin, catechin, procyanidin B-4 및 sanguiin H-4가 생리활성성분으로 보고되었다(5). 같은 복분자라는 이름을 가지고 있어도 품종이 다르면 나타나는 효과도 다르며, 재배지, 성숙도 및 추출방법에 따라 유효성분 함유량에 차이를 보인다(6-8). 토종 복분자인 *R. coreanus*는 한방에서 당뇨병(diabetes mellitus), 성욕감퇴(sexual disinclination), 정액루(spermatorrhea), 유뇨증(enuresis), 천식(asthma) 및 알레르기 관련 질병의 치료에 사용하고 있다(9). 이와 비교해, 외래종 복분자로 알려져 있는 *R. occidentalis*는 항산화(antioxidation), 혈관신생억제(anti-angiogenesis) 및 식도암(esophageal cancer)에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(10-12).

염증반응은 우리 몸의 감염 또는 조직의 손상을 통해 일어나게 되며, 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 자가면역질환(autoimmune disease) 등의 원인이 된다. 이러한 반응은 macrophage, neutrophil 등과 같은 면역관련 세포들이 염증성 cytokine, prostaglandin(PG) E_2, nitric oxide(NO) 등의 염증매개물질들을 분비하여 발생하게 된다(13-17). NO는 cytokine의 자극 또는 미생물의 침입으로 인해 세포가 활성화 되어 생성되는 것으로, nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NOS는 neuronal NOS(nNOS, NOS1), inducible NOS(iNOS, NOS2) 그리고 endothelial NOS (eNOS, NOS3)의 3종류가 존재한다. 이중 iNOS는 염증반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있으며, iNOS에 의해 증가된 NO는 패혈성 쇼크(septic shock), 조직 손상, 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) 등과 같은 질병을 유발하는 원인물질의 하나이다(16-18). PG는 다양한 세포로부터 cyclooxygenase(COX)라는 효소에 의해 생성된다. COX는 두 종류가 존재한다. COX-1은 대부분의 조직에서 존재하며, PG생성에 관여한다. 반면, COX-2는 growth factors, mitogens, cytokines 등과 같은 요인에 의해 발현이 증가되어 다량의 PG를 생성함으로써, 염증관련 질병을 유

*Corresponding author: Jin-Kyung Kim, Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do 200-702, Korea
Tel: 82-33-248-3106
Fax: 82-33-248-3103
E-mail: kimjin@hallym.ac.kr
Received February 21, 2007; accepted May 3, 2007

발하는 것으로 밝혀져 있다(19-21).

본 연구진에 의한 연구결과 미성숙한 복분자 추출물이 성숙한 복분자 추출물에 비해 탁월한 항염증효과를 보였으며, 물 추출물보다는 에탄올 추출물에서 뛰어난 효과를 보이는 것으로 밝혀졌다(22). 이에, 본 실험에서는 토종 복분자(*R. coreanus*) 추출물과 외래종 복분자(*R. occidentalis*) 추출물의 항염증효과 차이를 비교하였다.

재료 및 방법

시약

Lipopolysaccharide(LPS), ellagic acid를 포함한 모든 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입을 하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin 그리고 streptomycin은 Hyclone사(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution과 Griess reagent system은 Promega사(Madison, WI, USA)에서 구입하였고, PGE_2 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)에서 구입 하였다. Tumor necrosis factor-α(TNF-α)와 interleukin-6(IL-6) ELISA kit는 eBioscience사(San Diego, CA, USA), cell extraction buffer는 Biosource International사(Camarillo, CA, USA), 그리고 iNOS와 COX-2 항체는 BD Biosciences사(San Jose, CA, USA)로부터 구입하였다.

복분자 추출물 제조방법

토종 복분자(*R. coreanus*)와 외래종 복분자(*R. occidentalis*)는 강원도 횡성에 소재한 농장에서 구입하여 사용하였다. 식물의 동정은 서울대학교의 지형준 명예교수로부터 도움을 받았다. 에탄올을 이용하여 추출물을 만들었으며, 본 연구에 사용된 추출물은 토종 미성숙 복분자(unripe fruits of *R. coreanus*, URCE), 토종 중간성숙 복분자(half-ripened fruits of *R. coreanus*, HRCE), 토종 성숙 복분자(ripened fruits of *R. coreanus*, RCE), 외래종 미성숙 복분자(unripe fruits of *R. occidentalis*, UROE), 외래종 중간성숙 복분자(half-ripened of *R. occidentalis*, HROE) 그리고 외래종 성숙 복분자(ripened fruits of *R. occidentalis*, ROE)이다. 추출방법은, 각 복분자 50 g에 95% 에탄올을 1 L를 가하여 환류 추출 하였고, 이 과정을 3회 반복하고 얻은 추출물을 감압 농축하고, 마지막 남은 잔사를 물로 치환하여 동결건조하였다. 각 추출물의 수득률은 URCE 13.98%, HRCE 37.72%, RCE 42.92%, UROE 16.76%, HROE 25.38% 그리고 ROE 41.86%이었다.

HPLC 분석조건

각 복분자 에탄올 추출물을 10 mg/mL 농도로 용해시킨 후 0.4 μm로 여과하여 HPLC 분석시료로 사용하였다. HPLC는 Agilent 1100 system(Palo Alto, CA, USA)을 사용하였으며, Eclipse XDB-C18 column(4.6×250 mm, 5 μm, Agilent)을 사용, 유속은 1 mL/min로 유지하였고, water : methanol : acetate = 5 : 2 : 93(A, v/v/v)와 8 : 2 : 90(B, v/v/v)을 이동상으로 하여 4/14/25/37 min, 5/35/60/100% B gradient로 분석하였으며, 검출은 자외선 파장 254 nm에서 이루어졌다.

세포배양

RAW264.7 murine macrophages는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 구입하였고, 세포배양은 DMEM에 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 그리고 100 μg/mL streptomycin을 첨가한 것을 사용하였으며, 배양기를 이용하여 37°C와 5% CO_2를 유지하였다.

세포 독성여부 확인

각 복분자 추출물의 세포 독성여부 확인은 CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Assay를 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate에 2×10^4/well이 되도록 분주하고 12시간 배양하였다. 각 복분자 추출물을 0, 50, 100, 200 또는 400 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 후 세포독성을 측정하였다.

Nitrite 측정

RAW264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5/well이 되도록 분주하고 12시간 배양하였다. 각 복분자 추출물을 0, 50 100, 200 또는 400 μg/mL과 Lipopolysaccharidee(LPS) 1 μg/mL의 농도로 동시 처리 또는 LPS를 단독 처리하여 18시간 배양하였다. Nitrite양의 측정은 Griess reagent system(Promega)을 이용하여 측정하였다.

PGE_2의 측정

RAW264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5/well이 되도록 분주하고 12시간 배양하였다. 각 복분자 추출물을 400 μg/mL과 LPS 1 μg/mL의 농도로 동시 처리 또는 LPS를 단독 처리하여 18시간 배양하였다. PGE_2의 측정은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

iNOS와 COX-2 단백질 발현 양 측정

RAW264.7 세포를 60 mm 배양접시에 2×10^6/well이 되도록 분주하고 12시간 배양하였다. 각 복분자 추출물 400 μg/mL과 LPS 1 μg/mL의 농도로 동시 처리 또는 LPS를 단독 처리하여 18시간 배양하였다. 배양 후 세포는 냉각 PBS로 씻은 후, 세포를 100 μL의 세포 용해액(200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 100 μM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, 10 μg/mL leupeptin, 10 μg/mL aprotinin)에 넣어, 4°C에서 20분간 방치 후 원심 분리하여 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 7%(iNOS)와 10%(COX-2) SDS-아크릴아마이드 겔상에서 전기영동 후, nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 membrane을 5% 탈지 분유액이 포함된 TBST(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 1시간 실온에서 배양하였다. 그 후, iNOS와 COX-2의 specific antibodies를 이용하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. iNOS와 COX-2 발현 양은 horseradish peroxidase(HRP)가 붙어있는 secondary antibodies로 실온에서 2시간 반응 후 chemiluminescence reagents(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 확인하였다.

염증성 cytokine의 측정

RAW264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5/well이 되도록 분주하고 12시간 배양하였다. 각 복분자 추출물을 400 μg/mL과 LPS 1 μg/mL의 농도로 동시 처리 또는 LPS를 단독 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 이용하여 TNF-α와 IL-6를 ELISA kit로 측정하였다.

통계분석

실험결과의 통계처리는 3회 이상 실험을 반복하여 얻은 자료를 GraphPad Prism 4.0 software(GraphPad software, San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고, 각 시료간의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range tests로 검증하였다. $p<0.05$ 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

Table 1. Changes of ellagic acid contents in *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis* during the fruit ripening

Species	Origin	Sample[1)]	Ellagic acid (mg/g EtOH extract)
R. coranus	Korea	URCE	4.09
R. coranus	Korea	HRCE	1.18
R. coranus	Korea	RCE	0.63
R. occidentalis	Canada	UROE	1.68
R. occidentalis	Canada	HROE	1.81
R. occidentalis	Canada	ROE	0.52

[1)]URCE: unripe *R. coreanus* ethanol extract, UROE: unripe *R. occidentalis* ethanol extract, HRCE: half-ripened *R. coreanus* ethanol extract, HROE: half-ripened *R. occidentalis* ethanol extract, RCE: ripened *R. coreanus* ethanol extract, ROE: ripened *R. occidentalis* ethanol extract.

결과 및 고찰

복분자 종류 및 성숙도별 유효성분물질, ellagic acid의 함량의 변화

토종 복분자와 외래종 복분자의 성숙도에 따른 ellagic acid 함량을 비교해 보았다(Table 1). Table 1에 나타나 있듯이 토종 복분자의 에탄올추출물에서 URCE가 g당 4.09 mg의 함량을 보였으며, HRCE는 g당 1.18 mg, RCE g당 0.63 mg으로 성숙도에 따라 그 함량이 감소함을 보였다. 외래종 복분자의 경우에는 UROE가 g당 1.68 mg이었으며, HROE는 g당 1.81 mg으로 대동소이한 차이를 나타냈으나, 완전 성숙된 ROE과 같은 경우는 g당 0.52 mg으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. *Rubus*종의 주 유효성분인 ellagic acid의 함량이 토종 및 외래종의 복분자의 성숙도에 따라 크게 감소 하는 것으로 나타났으나, ellagic acid 이외의 성숙도에 따른 주 유효성분의 함량 변화는 향후 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

토종 복분자와 외래종 복분자 추출물의 세포독성 확인

URCE, UROE, HRCE, HROE, RCE 및 ROE의 세포독성 여부를 확인하였다. 각 복분자 추출물을 50, 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 마우스 macrophage 세포주인 RAW264.7 세포에 24시간 처리 후 세포독성 여부를 확인하였으나 각 복분자 추출물의 세포독성은 400 μg/mL의 고농도에서도 관찰되지 않았다(Fig. 1).

토종 복분자와 외래종 복분자 추출물의 NO 및 PGE_2 생성억제효과

세균 내독소로 알려진 LPS를 macrophage에 처리하게 되면 염증성 cytokine, NO, PG와 같은 염증반응의 매개물질들이 생성되어 병리학적 반응이 일어나게 된다(13-17,19,20). RAW264.7 세포에 LPS(1 μg/mL) 단독처리 혹은 LPS와 각 복분자 추출물을 50, 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 동시에 처리한 후, 각 복분자 추출물에 의한 NO 생성억제효과를 확인하였다. LPS에 의한 NO 생성 저해 효과는 토종과 외래종 복분자의 미성숙 및 중간성숙 추출물에서 확인할 수 있었다(Fig. 2). URCE, HRCE, UROE, HORE 모두에서 농도 의존적인 NO 생성억제효과가 확인되었으나, 토종 복분자 추출물인 URCE와 HRCE가 외래종 복분자 추출물에 비해 유의적인 NO 생성 저해 효과를 나타내었다. 성숙 복분자 추출물은 토종 복분자와 외래종 복분자 모두에서 LPS에 의한 NO 생성억제효과를 관찰할 수 없어, 이후 실험에서는 RCE와 ROE를 제외하고 진행 하였다. 위의 실험결과 토종 복분자의 경우 외래종 복분자와 달리 저농도(50, 100 μg/mL)에서도 유의성 있는($p < 0.05$) NO 생성억제효과를 보여 외래종 복분자보다 항염증효과가 뛰어난 것으로 추측할 수 있다.

다음으로, 염증반응의 또 다른 체내 매개물질 중 하나인 PGE_2 생성에 대한 각 복분자 추출물의 효과를 검토하였다. 고농도(400 μg/mL)의 각 복분자 추출물을 LPS와 함께 RAW264.7 세포에 처리 후, 배지중의 PGE_2의 농도를 측정한 결과 URCE, UROE, HRCE, HROE 모두에서 유의적인 PGE_2 생성억제효과를 관찰할 수 있었으며, 토종 복분자와 외래종 복분자의 PGE_2 생성억제효과에 대한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

토종 복분자와 외래종 복분자 추출물의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현억제효과

염증반응 매개물질인 NO와 PGE_2는 각각 NOS와 COX라는 효

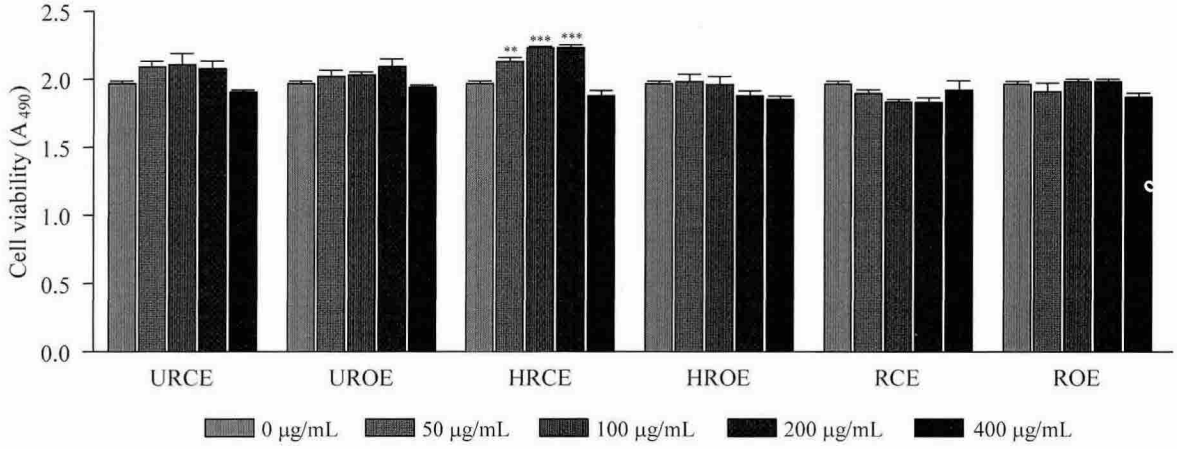

Fig. 1. Cytotoxicity of the ethanol extracts of *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis* against RAW264.7 cells. Cells were treated with 0, 50, 100, 200, or 400 μg/mL of various extracts for 24 hr. Cell viability was determined using the CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Assay. The results are expressed as mean ± SEM from four independent experiments. Significantly different from 0 μg/ml extracts; $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$. URCE: unripe *R. coreanus* ethanol extract, UROE: unripe *R. occidentalis* ethanol extract, HRCE: half-ripened *R. coreanus* ethanol extract, HROE: half-ripened *R. occidentalis* ethanol extract, RCE: ripened *R. coreanus* ethanol extract, ROE: ripened *R. occidentalis* ethanol extract.

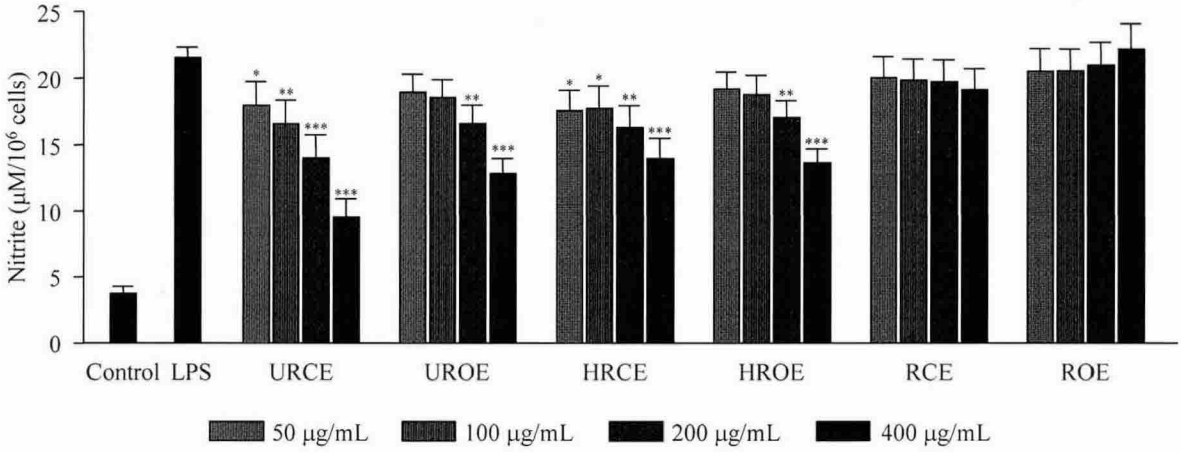

Fig. 2. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitrite production in RAW264.7 cells by the ethanol extracts of *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. Cells were treated with 50, 100, 200, or 400 μg/mL of various extracts in the presence or absence of 1 μg/mL LPS for 18 hr. The concentrations of nitrite are indicated in Materials and Methods. Significantly different from LPS-stimulated cells; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$.

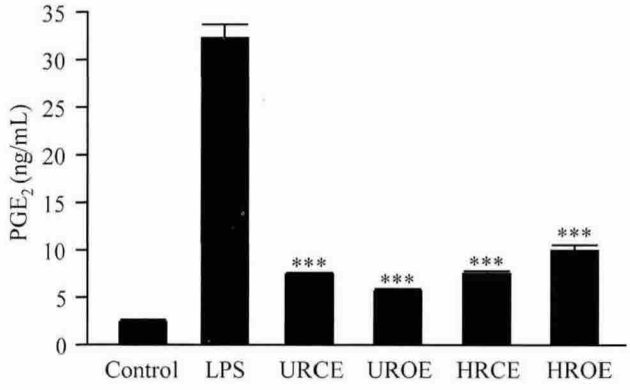

Fig. 3. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced prostaglandin E_2 (PGE_2) production in RAW264.7 cells by the ethanol extracts of *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. Cells were treated with 400 μg/mL of various extracts in the presence or absence of 1 μg/mL LPS for 18 hr. The concentrations of PGE_2 are indicated in Materials and Methods. Significantly different from LPS-stimulated cells; $***p < 0.001$.

소에 의해 생합성 된다. 위에서 관찰된 복분자 추출물에 의한 NO와 PGE_2의 생성억제효과가 이들을 생성하는 iNOS와 COX-2의 단백질 발현억제에 기인하는가의 여부를 이들 단백질에 대한 western blot 방법으로 조사하였다. RAW264.7 세포에 LPS(1 μg/mL) 단독처리 또는 LPS와 각 복분자 추출물을 400 μg/mL의 농도로 동시에 처리한 후 18시간 동안 배양하였다. 그 결과 LPS 처리에 의해 증가된 iNOS 단백질의 발현을 각 복분자 추출물(URCE 80.1%, UROE 75.6%, HRCE 57.3%, HROE 25.3%)이 억제시키는 것을 확인하였다. 이 결과로부터 토종 복분자가 외래종 복분자에 비해 iNOS 단백질 발현억제효과가 탁월함을 알 수 있었으며, iNOS의 발현억제가 NO의 생성억제를 유도함을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 염증반응을 직접 유발하는 효소 단백질인 COX-2 단백질 발현 양의 변화도 iNOS 실험과 동일하게, LPS 처리에 의해 증가된 단백질을 각 복분자 추출물(URCE 49.8%, UROE 28.4%, HRCE 32.3%, HROE 26.6%)이 감소시키는 결과를 얻었으며, 토종 복분자가 외래종 복분자에 비해 LPS에 의해 유도된 COX-2 단백질 발현 양의 감소효과가 우위임을 확인하였다(Fig. 4B). 이상의 결과들을 종합하여 보면, 토종 복분자 추출물이 LPS에 의한 염증반응 유발 시, iNOS와 COX-2 단백질 발현 양을 감소 시켜 NO 및 PGE_2 생성을 억제함으로써 항염증효과를 나타내며, 이러한 항염증활성은 외래종 복분자에 비해 토종 복분자가 탁월한 것으로 판단되었다.

토종 복분자와 외래종 복분자 추출물의 TNF-α와 IL-6 생성억제 효과

TNF-α와 IL-6 같은 염증성 cytokine도 염증반응을 매개하는 물질로, 특히 초기 염증반응에 깊이 관여하고 있다. 각 복분자 추출물이 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해, RAW264.7 세포에 LPS(1 μg/mL) 단독처리 혹은 LPS와 각 복분자 추출물을 400 μg/mL의 농도로 24시간 처리 후, 배지로 분비된 TNF-α와 IL-6의 농도를 ELISA방법으로 측정하였다. URCE와 UROE의 LPS에 의한 TNF-α의 생성억제율은 각각 57.3%, 37.4%로 토종 복분자 추출물이 우위였으나($p < 0.001$), HRCE(28.1%)와 HROE(32.15%)간의 차이는 확인 할 수 없었다(Fig. 5A). 각 복분자 추출물에 의한 IL-6의 생성억제효과도 TNF-α와 유사하여 URCE(65.6%)가 UROE(35.7%)에 비해 IL-6의 생성억제효과가 유의적으로 탁월하였다(Fig. 5B).

본 실험을 통해 복분자 추출물이 염증반응을 매개하는 다양한 인자(NO, PGE_2, 염증성 cytokine)의 생성을 억제하는 효과가 있으며, 이러한 항염증효과는 복분자의 성숙도에 따라 복분자에 함유되어 있는 ellagic acid를 포함한 2차 대사산물의 함량에 기인하는 것으로 판단되며, 토종 복분자가 외래종 복분자에 비해 항염증효과가 월등함을 확인하였다.

요 약

본 연구의 목적은 수세기에 걸쳐 발기부전(impotence), 정액루(spermatorrhea), 유뇨증(enuresis), 천식(asthma) 및 알레르기 관련 질병의 치료제로 사용되고 있는 토종 복분자(*R. coreanus*)와 외래종 복분자(*R. occidentalis*)의 항염증활성을 비교, 분석해 보고자 했다. 그 결과 토종 복분자의 에탄올 추출물이 외래종 복분자의 에탄올 추출물에 비교해 LPS 처리에 의한 NO의 생성을 현저히

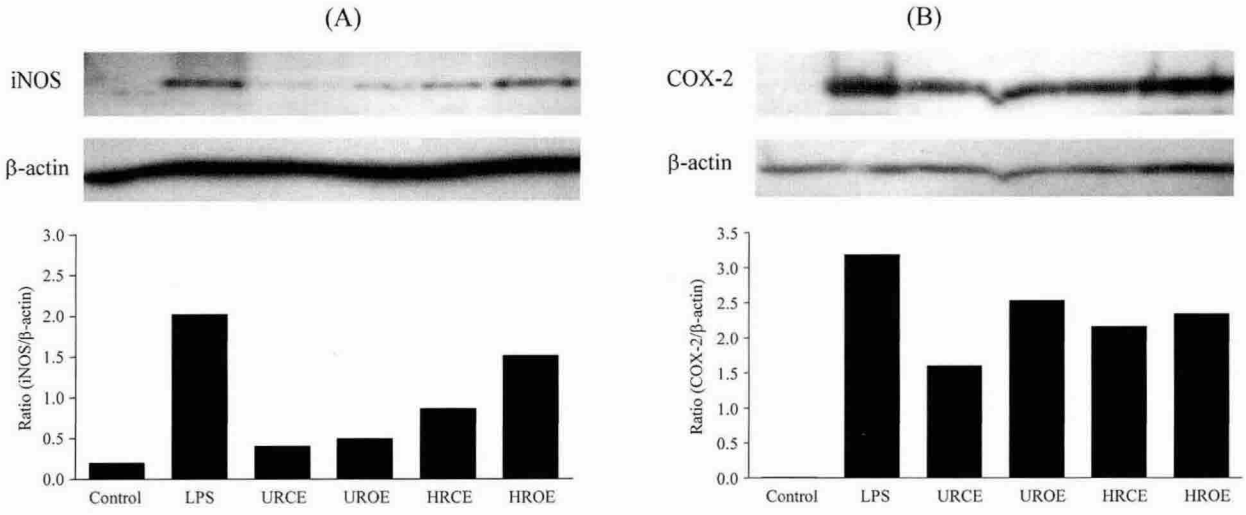

Fig. 4. Suppressive expression of inducible NOS (iNOS) (A) and cyclooxygenase 2 (COX-2) (B) in RAW264.7 cells by the ethanol extracts of *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. RAW264.7 cells were treated with 400 μg/mL of various extracts in the presence of 1 μg/mL LPS or with LPS alone for 18 hr. The 50 μg of protein obtained from each cell lysates was resolved on 7% and 10% SDS-PAGE for iNOS and COX-2, respectively. Western blot analysis was performed as described in Materials and Methods. The expression of iNOS and COX-2 was measured by densitometry.

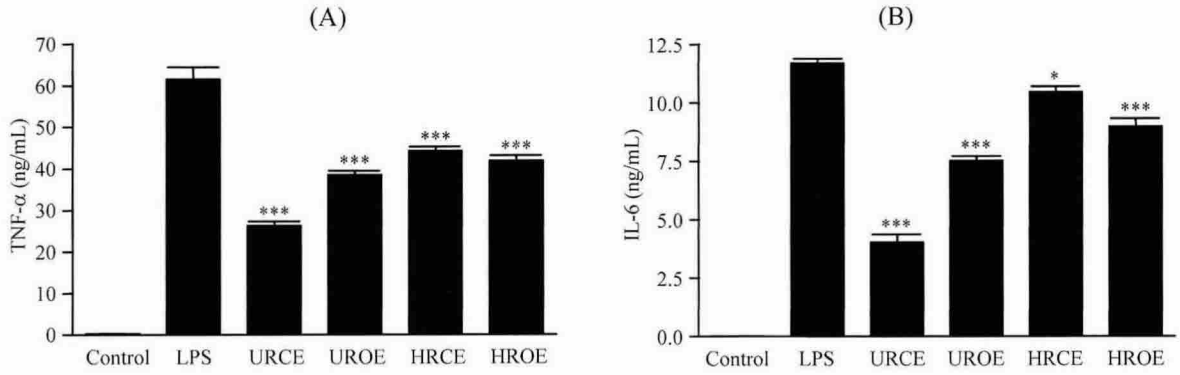

Fig. 5. Suppression of lipopolysaccharide (LPS)-induced tumor necrosis factor-α (TNF-α) (A) and interleukin-6 (IL-6) (B) production in RAW264.7 cells by the ethanol extracts of *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. RAW264.7 cells were treated with 400 μg/mL of various extracts in the presence of 1 μg/mL LPS or with LPS alone for 24 h. The cell culture media were then collected, and the amount of TNF-α and IL-6 released within them was measured as described in the Materials and Methods. The results are expressed as mean ± SEM from four independent experiments. Significantly different from the cells treated with LPS-stimulated cells; $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$.

억제시키는 것을 관찰 할 수 있었으며, NO와 PGE_2 생합성효소인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 또한 억제시킴을 확인할 수 있었다. LPS 유도에 의한 TNF-α와 IL-6의 생성억제 효과도 토종 복분자 에탄올 추출물이 외래종 복분자 추출물에 비해 탁월함이 관찰 되었다. 이러한 연구결과로 볼 때 토종 복분자 에탄올 추출물이 macrophage에 의해 생성되는 염증반응의 매개물질인 NO, PGE_2, 염증성 cytokine 등의 생성을 억제함으로 염증반응을 완화시켜 줄 것으로 판단된다. 차후 항염증활성을 갖는 복분자 추출물의 성분을 동정하는 연구가 더욱더 필요할 것으로 사료되며, 토종 복분자가 천연 항염증활성을 갖는 제품 개발에 있어 유용한 식물자원 원료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구논문은 2006년도 산업자원부 지역혁신센터사업(한림대 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. Bae GH. The Medicinal Plants of Korea, Kyohak Publishing Co., Seoul, Korea. p. 231 (2000)
2. Cha HS, Lee MK, Hwang JB, Park MS, Park KM. Physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 1021-1025 (2001)
3. Pang KC, Kim MS, Lee MW. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. Korean J. Pharmacogn. 27: 366-370 (1996)
4. Lee MW. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. Yakhak Hoeji 39: 200-204 (1995)
5. Lee YA, Lee MW. Tannins from *Rubus coreanum*. Korean J. Pharmacogn. 26: 27-30 (1995)
6. Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. Plant Physiol. 139: 652-663 (2005)
7. Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y, van Leeuwen C. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.).

Effects on wine phenolic and aroma components. J. Agr. Food Chem. 54: 5077-5086 (2006)
8. Watson R, Wright CJ, McBurney T, Taylor AJ, Linforth RS. Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds. J. Exp. Bot. 53: 2121-2129 (2002)
9. Moon GS. Constituents and Uses of Medicinal Herbs. Ilweolseogak, Seoul, Korea. pp. 310-311 (1991)
10. Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agr. Food Chem. 48: 140-146 (2000)
11. Liu Z, Schwimer J, Liu D, Greenway FL, Anthony CT, Woltering EA. Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. J. Agr. Food Chem. 53: 3909-3915 (2005)
12. Stoner GD, Chen T, Kresty LA, Aziz RM, Reinemann T, Nines R. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms. Nutr. Cancer 54: 33-46 (2006)
13. Chang YH, Lee ST, Lin WW. Effects of cannabinoids on LPS stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. J. Cell Biochem. 81: 715-723 (2001)
14. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation, Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 4: 471-479 (2005)
15. Raison LC, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. Trends Immunol. 27: 24-31 (2006)
16. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nat. Immunol. 2: 2907-2916 (2001)
17. Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. Annu. Rev. Pharmacol. 35: 655-677 (1995)
18. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem. J. 336: 1-17 (1998)
19. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 23: 144-150 (2002)
20. Smith WL, Meade EA, DeWitt EL. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes 1 and 2. Ann. NY. Acad. Sci. 714: 136-142 (1994)
21. DuBois RN, Tsujii M, Bishop P. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol. 266: G822-827 (1994)
22. Park JH, Oh SM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Choe NH, Yoon PJH, Kim JK. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. Biochem. Bioph. Res. Co. 351: 146-152 (2006)