

## 양마에서 분리한 Kaempferol 및 그 배당체의 항염증 효과에 관한 연구

이근하 · 조영룡 · 주철규 · 주연정 · 권순상 · 박 청<sup>†</sup>

(주)모아캠 기술연구소

### Study on the Anti-inflammatory Effect of Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides Isolated from *Hibiscus cannabinus* L.

Keun Ha Lee, Young Long Cho, Chul Gue Joo, Yeon Jeong Joo, Sun Sang Kwon and Chung Park<sup>†</sup>

R&D Center, Morechem Co., Ltd., Pyongtaek 450-818, Korea.

**ABSTRACT :** In this study, to evaluate the anti-inflammatory effects of kaempferol and its rhamnosides isolated from *Hibiscus cannabinus* L. leaves, we investigated UVB-induced inhibitory effects on inflammatory reaction by measuring the cytokine as the prostaglandin (PGE<sub>2</sub>), interleukine-6 (IL-6) and interleukine-8 (IL-8). We investigated the inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on TARC (thymus and activation-regulated chemokine) and PGE<sub>2</sub>. Kaempferol and  $\alpha$ -rhamnoisorobin showed inhibition activity of TARC generated to compared to positive control. Kaempferol,  $\alpha$ -rhamnoisorobin and afzelin Inhibited the release of PGE<sub>2</sub>. Also, only kaempferol significantly inhibited interleukine-6 (IL-6), interleukine-8 (IL-8) among UVB-induced inflammatory cytokine.

**Key Words :** Kaempferol, Kaempferol Rhamnosides, Anti-inflammatory Effect, *Hibiscus cannabinus* L., Cytokine

## 서 언

양마 (*Hibiscus cannabinus* L.)는 아욱목 아욱과에 속하는 쌍떡잎 식물로 상업적으로는 밭줄, 마대감으로 목질부가 많이 이용되며 인도, 아프리카에서 자생하는 한해살이풀이다. 잎에는 많은 양의 플라보노이드 (flavonoid)계의 물질이 존재하며 그 중 캠페리트린 이라고 명명되는 플라보노이드는 약 5~10%가 잎에 다량으로 존재하고 있다. 캠페리트린의 생리활성 작용에 대해서는 우수한 항산화 활성 (Jin *et al.*, 2009), 항염 효과 (Boller *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2005; Regasini *et al.*, 2008; De Melo *et al.*, 2009), 항당뇨효과 (Jorge *et al.*, 2004; Vishnu Prasad *et al.*, 2009; Tzeng *et al.*, 2009) 등이 연구, 보고되어 있다.

플라보노이드는 항바이러스 작용, 항산화 작용, 항염작용 외에도 암 발생을 낮추며 다양한 질병의 발생을 예방하는 것으로 알려져 있으며 (Tapiero *et al.*, 2002) 수용성, 지용성 또는 그 중간극성 등 다양한 용해성을 나타내기 때문에 인체에 섭취될 경우 세포의 여러부분에서 기능을 발휘한다는 것이 임상학적으로 많이 증명되고 있으며, (Rothwell *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 1998) 현재에는 플라보노이드의 분자구조와 활성

도의 관계 (Structure-activity relationship)가 밀접하게 관련이 있음이 이미 알려진 바 있어 이에 초점을 맞추어 개발되는 추세이다. 이러한 구조-활성 관계는 작용기 하나만으로 분자구조를 변형하여 더 우수한 효능을 기대할 수 있는 특성을 갖고 있기 때문이다. 또한 플라보노이드의 구조에 따른 생물학적인 활성관계에 관한 연구는 점차적으로 증가 추세에 있으며, 많은 임상학적인 실험을 통한 체내 활성기전의 연구 필요성이 대두되고 있다 (Zuo *et al.*, 2006; O'Leary *et al.*, 2001; Navarro-Nunez *et al.*, 2009).

염증은 인체의 상처를 주는 여러 요소인 자극으로부터 손상된 세포에 관여하는 인체내의 방어작용으로 일종의 자극반응이다. 이 반응에는 화학유인물질 (chemoattractants), 혈관활성 분자 (vasoactive molecule), 염증성 cytokine 등이 관여하고 면역세포가 활성화되어 인체의 항상성을 유지한다. 이러한 염증반응이 오래 지속되거나 과다분비를 하게 되면 만성 염증질환, 심근경색, 동맥경화증, 암 등 수많은 질병을 일으킨다 (Guha and Mackman, 2001; Lesslauer *et al.*, 1991). Cytokine은 신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 신호물질로 사용되는 당단백질로써 면역, 감염병, 조혈기능, 조직회복, 세포의 발전 및 성장에 중요한 기능을 하지만 interleukin-1 $\alpha$

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-31-658-7822 (E-mail) morechem08@korea.com

Received 2011 September 26 / 1st Revised 2011 November 8 / 2nd Revised 2011 November 29 / Accepted 2011 November 30

(IL-1 $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 염증 전구 cytokine (pro-inflammatory cytokines)은 염증 반응을 촉진시키는 주요 인자로 알려져 있다 (Cheon *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2002; Vowels *et al.*, 1995).

Prostaglandins (PGs)는 20개의 탄소로 구성된 불포화지방산으로부터 cyclooxygenase (COX) 경로를 거쳐 생성되는 물질로써 염증반응을 일으키는 중요한 인자로 알려지고 있다. COX-1은 인체에서 위장관 점막 보호작용, 신혈관 확장으로 인한 신기능 유지 및 PGs 형성에 관여하는 효소지만, COX-2는 염증 전구 cytokine (pro-inflammatory cytokines)에 의해 활성화 되어 염증을 매개하는 하는 효소로써 염증매개물질인 prostaglandins E2 (PGE<sub>2</sub>)를 형성시켜 신생혈관 형성과 암세포의 전이 및 증식을 도와 악성종양으로 발달시키는데 일조하는 것으로 알려져 있다 (Mandal *et al.*, 2011; Dogle *et al.*, 2011).

따라서 본 연구에서는 양마에서 분리한 flavonoid계의 일종인 kaempferol과 그 배당체인  $\alpha$ -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin의 parameter를 중심으로 항염 효능 연구를 수행함으로써 kaempferol과 그들의 rhamnoside 구조에 따른 생리활성의 상관관계 분석을 통해 기능성 식품, 의약품, 화장품 소재로의 응용가능성을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용된 양마 (*Hibiscus cannabinus* L.)는 전라북도 부안군에서 채취하였으며 실온에서 2주간 음건하고 세절하여 실험재료로 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

실험에 사용한 세포주인 HaCaT cell (Human Keratinocyte, HaCaT)과 HDF-N cell은 ACTT (USA)에서 구입하였으며, 흡광도 측정은 TECAN (Infinite M200, Switzerland)사의 제품을 사용하였고, TARC 양을 측정하기 위해 Human TARC Immunoassay kit (R&D system, DDN00)를 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Welgene (Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 분석을 위해 사용된 HPLC는 Agilent (1200series, USA)사의 제품을 사용하였고 FT-IR은 Bio-Rad(FTS)사의 제품을, NMR은 Varian (Mercury 400MHz, CP-MAS)사의 제품을 사용하였다.

### 3. 추출 및 분리

음건하고 세절된 양마잎을 70% EtOH에 1일간 침적시키고 추출된 여액을 감압, 농축하여 건조된 에탄올 추출물을 얻었

다. 이후 용매 분획을 통해 비극성 성분을 제거하고 재결정법을 이용하여 고순도의 kaempferitrin (kaempferol-3,7-O- $\alpha$ -dirhamnoside)을 분리하였으며, 이 후 효소 또는 미생물을 이용한 가수분해를 통한 선택적인 분리 공정을 거쳐 지표수준의 고순도  $\alpha$ -rhamnoisorobin (kaempferol-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside), afzelin (kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside) 및 kaempferol (4', 5, 7-trihydroxyflavonol)을 분리하였다. 상기의 방법으로 분리된 kaempferitrin은 HPLC, MS, FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등의 기기분석을 통한 정성분석으로 화학적 구조를 밝혔으며, 이후 가수분해를 통해 얻어진 3가지 화합물은 HPLC를 통해 표준물질과 비교하여 정성분석하였다.

Kaempferitrin; Pale yellow powder; MS m/z : 578 [M]<sup>+</sup>; UV  $\lambda_{max}$ : 265, 350 (MeOH); IR<sub>max</sub>: KBr cm<sup>-1</sup> 3369 (OH), 2984 (CH<sub>3</sub>), 1657 (C=O), 1603, 1493 (C=C), 1449 (cycloalkane), 1179 (phenol); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>)  $\delta$  7.77 (2H, d, *J*=8.8Hz, H-2' & 6'), 6.93 (2H, d, *J*=8.8Hz, H-3' & 5'), 6.69 (1H, d, *J*=2Hz, H-8), 6.43 (1H, d, *J*=2Hz, H-6), 5.84 (1H, d, H-1"), 5.39 (1H, d, H-1"), 1.27 (3H, d, H-6"), 0.94 (3H, d, H-6"); <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>)  $\delta$  179.7 (C-4), 163.5 (C-7), 162.9 (C-5), 161.7 (C-4'), 159.7 (C-2), 158.0 (C-9), 136.4 (C-3), 132.0 (C-2'), 132.0 (C-6'), 122.3 (C-1'), 116.5 (C-3'), 116.5 (C-5'), 107.5 (C-10), 103.5 (C-1"), 101.4 (C-1"), 99.8 (C-6), 95.6 (C-8), 73.6 (C-4"), 73.1 (C-4"), 72.1 (C-2"), 72.0 (C-2"), 71.9 (C-3"), 71.9 (C-3"), 71.7 (C-5"), 71.3 (C-5"), 18.1 (C-6"), 17.7 (C-6").

### 4. 세포주 및 배양

세포주는 시험항목에 따라 알맞게 선별하여 사용하였다. 항염증 실험에서 사용한 세포주는 human 각질세포인 HaCaT cell (Human Keratinocyte, HaCaT)이며, 배양접시 바닥에 접종한 후 페니실린 (100 IU/ml), 스트렙토마이신 (100  $\mu$ g/ml), 10% FBS를 함유하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)를 넣고 37 $^{\circ}$ C를 유지하며 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다.

### 5. 검액의 조제

본 연구에서 사용되는 검액은 kaempferol (1),  $\alpha$ -rhamnoisorobin (2), afzelin (3), kaempferitrin (4)이며 이들의 구조식 및 분자량은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 각 시료는 DMSO에 용해시켰으며 실험 시 농도는 WST-1 assay를 통하여 예비실험을 진행한 후 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택하였다. 실험 물질은 시험 항목에 맞는 세포주에 따라 세포 배양 배지에 희석하여 사용하였으며, 예비시험 후, 효력을 나타내는 농도를 찾아 3개를 선정 항염증 효능을 확인하였다. 각 실험

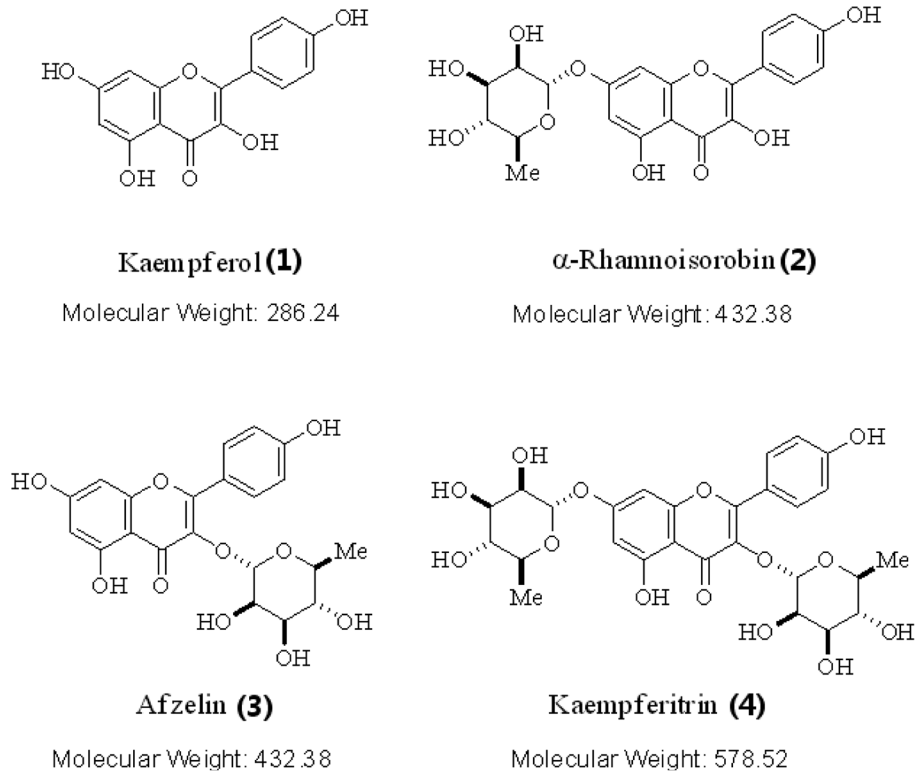


Fig. 1. Structure and molecular weight of kaempferol and its rhamnosides ( $\alpha$ -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin).

의 양성 대조군 역시 세포주에 따른 세포 배양 배지로 희석하여 처리하였다.

### 6. 세포독성평가

검액의 독성을 확인하기 위해, HaCaT cell과 HDF-N cell에서의 세포독성을 측정하였다. HaCaT cell은 96 well plate에 well 당  $5 \times 10^4$  cell의 농도로, HDF-N cell은 96 well plate에 well 당  $6 \times 10^3$  cell의 농도로 분주한 다음 세포 배양 조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, 12시간의 기아상태를 유지시킨 후 검액 및 새로운 배지(media supplement 제외)를 넣고, 24시간 배양하였다. 또 검액 및 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 WST-1 반응액을 supplement가 제외된 배지에 1/10로 희석하고 이를 각 well당  $100 \mu\text{l}$ 씩 처리하여 1시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 7. TARC (thymus and activation-regulated chemokine) assay

TARC는 chemokine receptor CCR4 (peripheral blood mononuclear cell과 human T-cell에서 발현)에 작용한다. Macrophage-Derived chemokine과 TARC는 CCR4에 대해 경쟁적 관계이다. TARC는 또한 CCR8에 결합하기도 한다.

CCR4와 CCR8 발현은 일시적으로 활성화된 T cell에 의해 up-regulate 된다. TARC는 TH2 세포의 trafficking을 위한 specific chemokine이다. 아토피 피부염의 경우 TARC의 증가가 일어남으로 세포에 각각의 시료 처리 후 TARC의 양을 측정하여 아토피의 완화를 간접적으로 측정할 수 있다.

본 실험에서는 HaCaT cell을 이용하여 TARC의 생성을 측정함으로써 검액의 항염증 개선 정도를 실험하고자 하였다. 각 질세포인 HaCaT cell을 48 well plate에  $7 \times 10^4$  cells/well로 분주한 다음 세포배양 조건에서 24시간 배양하였다. 24시간 이후 배지를 버리고 DPBS로 세척한 다음, FBS가 함유되지 않는 DMEM 배지로 교체하여 기아상태를 12시간 동안 유지시켰다. 12시간 후, 배지를 제거하고  $10 \text{ ng/ml}$ 의  $\text{INF-}\gamma$ 와  $10 \text{ ng/ml}$ 의  $\text{TNF-}\alpha$  및 검액을 적당한 농도로 배지에 희석한 후 처리하여 세포 배양 조건에서 72시간 배양하였다. 양성대조군은 dexamethasone을 사용하였으며, 농도는  $100 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하였다. 72시간 후 배양액을 취하여 human TARC immunoassay kit를 사용하여 TARC 양을 측정하였다. 측정된 TARC 양은 총 단백질 양으로 보정하였다.

### 8. 자외선에 유도된 inflammatory cytokine assay

본 시험은 HaCaT cell을 이용하여  $\text{PGE}_2$ , interleukine-6

(IL-6) 및 interleukine-8 (IL-8) 등과 같은 염증관련 cytokine 을 측정함으로써 UVB에 의해 일어나는 염증 억제 정도를 평가하고자 하였다. 먼저 각질세포인 HaCaT cell을 48 well plate에  $7 \times 10^4$  cells/well로 분주한 다음 세포배양 조건에서 24 시간 배양하였다. 24시간 이후 배지를 버리고 DPBS로 세척한 다음, 1%의 FBS가 함유된 DMEM 배지에서 18시간 배양하였다. 이후, DPBS로 세척한 다음, DPBS 400  $\mu$ l로 세포를 얇게 덮고 UV-B 30 mJ/cm<sup>2</sup> 를 조사하였다. 검액을 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 적당한 농도로 희석한 후 세포에 처리하여 세포 배양 조건에서 24시간 배양하였다. 양성대조군은 NAC을 사용하였으며, 농도는 20 mM로 처리하였다. 24시간 후 배양액을 취하여 염증관련 cytokine immunoassay kit을 사용하여 cytokine 및 PGE<sub>2</sub> 농도를 측정하였다. 측정된 cytokine의 양은 총 단백질 양으로 보정하였다.

### 9. 통계

모든 자료는 mean  $\pm$  SD로 나타내었고, 통계처리는 Student's t-test를 사용하였으며 P < 0.005의 유의확률과 양측검정을 사용하였다.

## 결 과

### 1. Flavonol 화합물의 구조 동정

양미의 에탄올 추출물로부터 분리 정제한 flavonol 화합물의 IR 흡수 스펙트럼을 확인한 결과 OH, CH<sub>3</sub>, C=O, C=C에서 흡수대가 나타나며 1449 cm<sup>-1</sup> 부근에서 사이클로알케인 (cycloalkane)에 의한 흡수가 나타났고, 1179 cm<sup>-1</sup>에서 페

놀의 흡수대를 보여 특징적인 flavon 화합물의 배당체를 나타내었다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 메타-커플링 (meta coupling) 하고 있는 두 방향족 양자 (aromatic proton)의 신호 [6.69 (1H, d, J=2Hz, H-8), 6.43 (1H, d, J=2Hz, H-6), 또 다른 2개의 메타-커플링 신호 [7.77(2H, d, J=8.8Hz, H-2' & 6'), 6.93 (2H, d, J=8.8Hz, H-3' & 5')] 및 아노머 양자 신호 (anomeric proton signal)[5.84 (1H, d, H-1''), 5.39 (1H, d, H-1'')]가 보이며, 2개의 람노스 메틸 (rhamnose methyl)기로 추정되는 1.27 (3H, d, H-6''), 0.94 (3H, d, H-6''') 신호가 관측되었다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼의 d 179.7, 163.5에서 4번과 7번의 탄소 신호가 관측되었고 162.9, 159.7에서 5번과 2번의 탄소 신호를 확인하였으며, 103.5 (C-1''), 101.4 (C-1''), 73.6 (C-4''), 73.1 (C-4''), 72.1 (C-2''), 72.0 (C-2''), 71.9 (C-3''), 71.9 (C-3''), 71.7 (C-5''), 71.3 (C-5''), 18.1 (C-6''), 17.7 (C-6''')은 L-람노스 유래 신호로서, 람노스가 2몰 존재함을 확인하여 이 화합물이 kaempferitrin (kaempferol-3,7-O- $\alpha$ -dirhamnoside)임을 확인하였다. 이후 가수분해를 통해 두 개의 당을 순차적으로 제거하여 이를 표준물질과 비교하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 kaempferitrin에서 당을 제거함에 따라 구조적으로 chromatographic적인 특성을 HPLC를 통하여 확인할 수 있다.

### 2. 세포독성 평가

시료 4종에 대한 *in vitro* 세포독성은 HaCaT cell과 HDF-N cell에서 수행하였으며, 세포의 미토콘드리아 활성에 의존하여, 세포의 생존을 결정할 수 있는 WST-1 반응액에 의해 측정되었다. 세포 생존율은 시료를 제외한 배양배지만 처리한 값

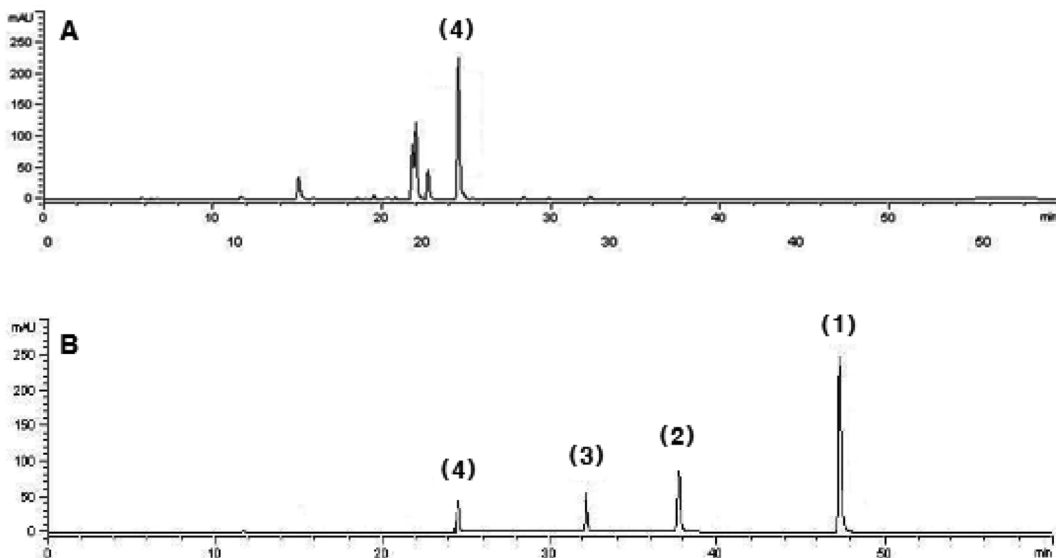
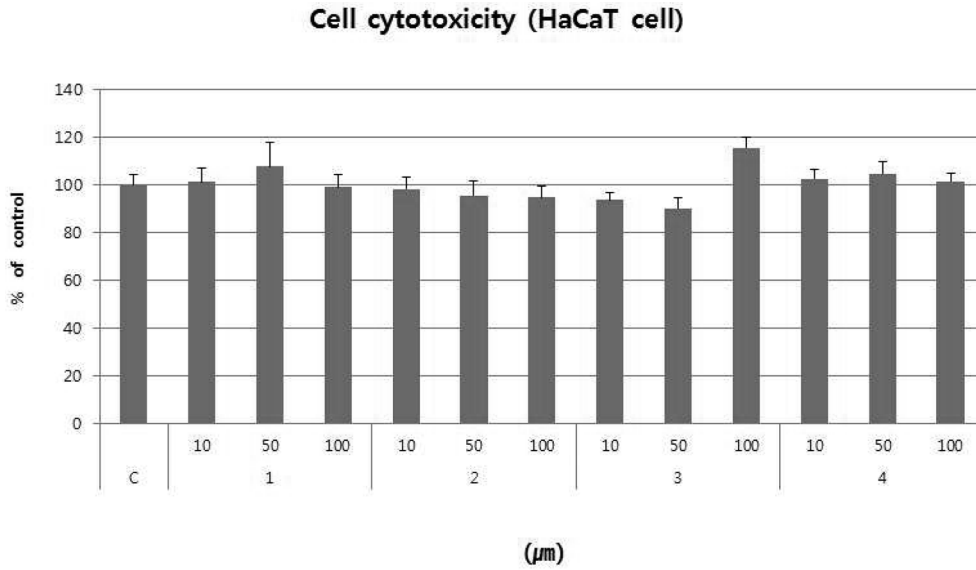
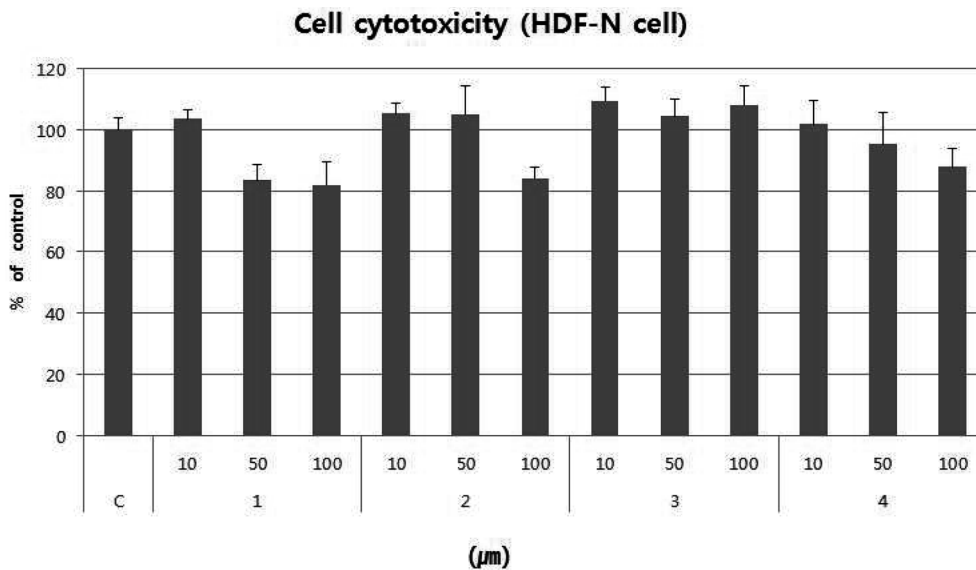


Fig. 2. HPLC chromatogram of from *Hibiscus cannabinus* L. leaves. (A) 70% EtOH extract, (B) isolated by hydrolysis, (1) kaempferol (2)  $\alpha$ -rhamnoisorobin (3) afzelin (4) kaempferitrin).



**Fig. 3. Cell cytotoxicity of kaempferol and its rhamnosides on HaCaT cell.** 1 : kaempferol, 2 : α-rhamnoisorobin, 3 : afzelin, 4 : kaempferitrin.



**Fig. 4. Cell cytotoxicity of kaempferol and its rhamnosides on HDF-N cell.** 1 : kaempferol, 2 : α-rhamnoisorobin, 3 : afzelin, 4 : kaempferitrin.

(control)에 대한 백분율로 나타내었다. 그 결과, HaCaT cell에 대한 시료 독성은 4종 시료 모두 100 uM 농도까지 90.0% 이상의 생존율을 보였다 (Fig. 3). 또한, HDF-N cell에 대한 세포독성은 4종 시료 모두 100 uM 농도까지 80.0% 이상의 생존율을 보여 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 4). 그러므로 추후 실험에 사용할 시료의 최고 농도는 4종 시료 모두 100 uM 농도로 선택하였다.

**3. TARC (thymus and activation-regulated chemokine) 생성 억제능 시험**

본 실험은 시료의 항염증 효능을 평가하기 위해 식품의약품 안전청에서 발간한 아토피피부염 효력시험 가이드라인 (1-019-2010-0000)을 참조하였다. 가이드라인 중 *in vitro* parameter 중의 하나인 TARC를 immunoassay ELISA로 측정함으로써 시료의 항염증 효능을 연구하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여, IFN-γ

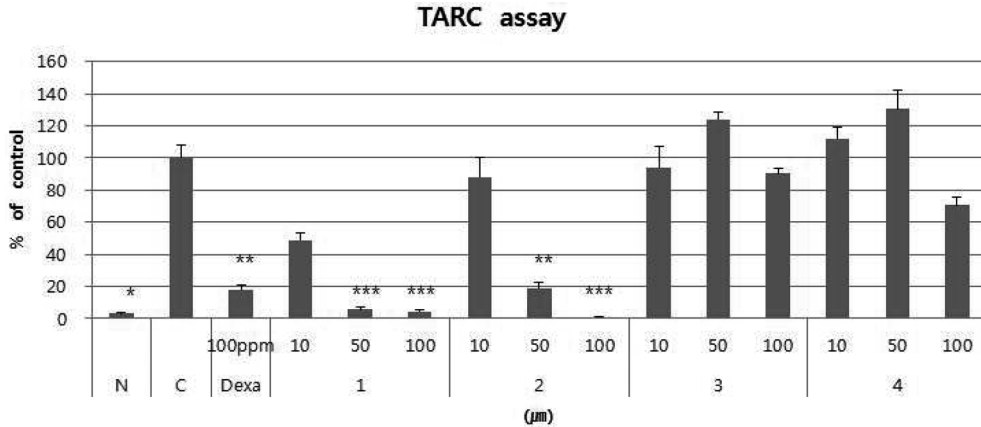


Fig. 5. Inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on TARC generated in HaCaT cell at 72 h after IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  treatment. 1 : kaempferol, 2 :  $\alpha$ -rhamnoisorobin, 3 : afzelin, 4 : kaempferitrin. (\*P < 0.001, \*\*P < 0.0001, \*\*\*P < 0.00005).

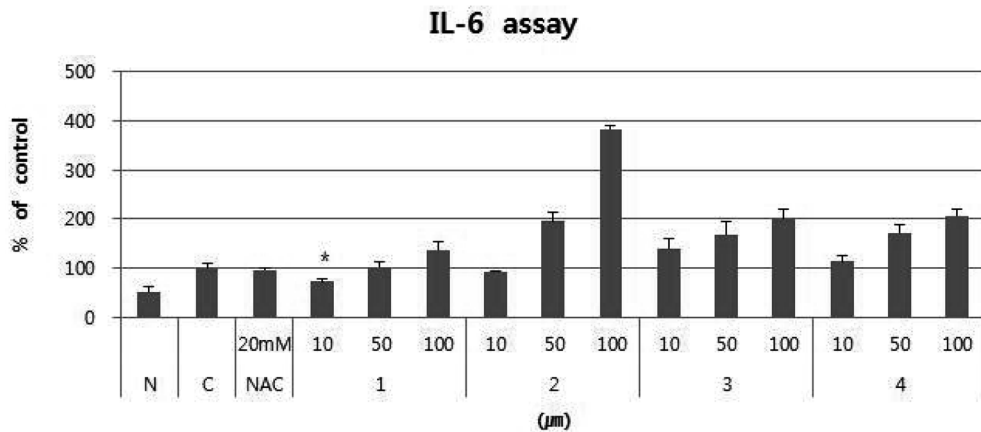


Fig. 6. Inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on IL-6 secretion in HaCaT cell at 24 h after irradiated with 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. 1 : kaempferol, 2 :  $\alpha$ -rhamnoisorobin, 3 : afzelin, 4 : kaempferitrin. (\*P < 0.05).

및 TNF- $\alpha$ 를 처리한 실험군에서 유의성 있는 TARC 생성의 증가를 보였다. 이로써 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 처리가 HaCaT 세포의 염증을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. 또한, 시료 4종 모두 10, 50, 100  $\mu$ M를 처리한 후 상등액으로 TARC를 측정된 결과, kaempferol (1)의 경우 대조군 (100%)에 대비하여 각각 48.8, 5.5, 4.4%로 농도 의존적으로 감소한 경향을 보였다. 또한  $\alpha$ -rhamnoisorobin (2)의 경우 역시 대조군에 대비하여 각각 88.1, 19.0, 1.0%로 TARC 생성이 농도 의존적으로 감소한 경향을 확인하였다. 그러나 afzelin (3)과 kaempferitrin (4)의 경우는 농도와 상관없이 TARC 생성 감소 효능을 보이지 않았다.

한편, 양성 대조군으로 사용한 dexamethasone을 100  $\mu$ g/ml를 처리하였을 경우는 대조군과 대비하여 TARC 생성이 17.8%로 감소하였다.

#### 4. IL-6 억제능 평가

HaCaT cell에 UVB를 30 mJ/cm<sup>2</sup> 조사하여 염증을 유발시키고 염증관련 cytokine인 IL-6을 ELISA로 측정하였다. 그 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 UVB를 조사하지 않은 정상군에 비하여 UVB를 조사한 대조군의 IL-6 농도가 2배가량 증가한 것으로 보아 UVB에 의해 염증이 유발됐음을 알 수 있다. 한편, 시료 4종을 10, 50, 100  $\mu$ M 농도로 처리하였을 경우, cytokine IL-6을 억제하는 물질은 관찰되지 않았다. 다만, Kaempferol (1)을 10  $\mu$ M로 처리하였을 경우, 대조군과 대비하여 cytokine IL-6 농도를 72.3% 감소하여 유의적인 결과차를 확인할 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 NAC 20 mM을 처리하였을 경우는 대조군과 대비하여 IL-6 농도가 95.5% 감소하였다.

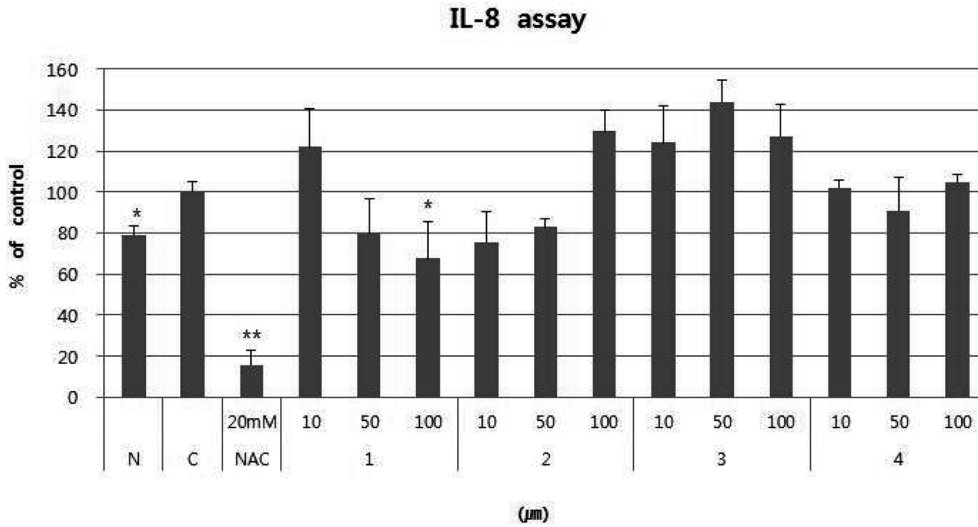


Fig. 7. Inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on IL-8 secretion in HaCaT cell at 24 h after irradiated with 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. 1 : kaempferol, 2 : α-rhamnoisorobin, 3 : afzelin, 4 : kaempferitrin. (\*P < 0.05).

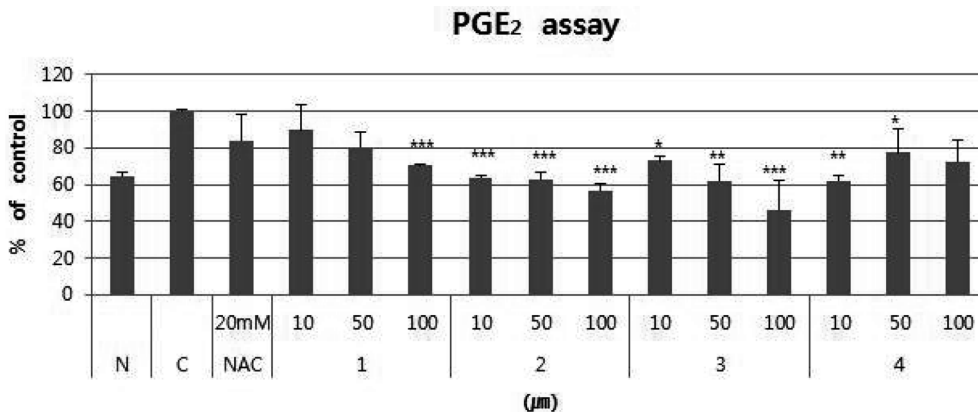


Fig. 8. Inhibitory effects of kaempferol and its rhamnosides on PGE<sub>2</sub> secretion in HaCaT cell at 24 h after irradiated with 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. 1 : kaempferol, 2 : α-rhamnoisorobin, 3 : afzelin, 4 : kaempferitrin. (\*P < 0.005, \*\*P < 0.0001, \*\*\*P < 0.00005).

### 5. IL-8 억제능 평가

HaCaT cell에 UVB를 30 mJ/cm<sup>2</sup> 조사하여 염증을 유발시키고 염증관련 cytokine인 IL-8을 ELISA로 측정하였다. 그 결과, Fig. 7에서 보는 바와 같이 UVB를 조사하지 않은 정상군에 비하여 UVB를 조사한 대조군의 IL-8 농도가 유의적으로 증가한 것으로 보아 UVB에 의해 염증이 유발됐음을 알 수 있다. 한편, 시료 4종을 10, 50, 100 uM 농도로 처리하였을 경우, cytokine IL-8을 억제하는 물질은 관찰되지 않았다. 다만, kaempferol (1)을 10, 50, 100 uM 농도로 처리한 결과 각각 121.9, 79.8, 67.6%로 IL-8의 농도가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 양성대조군으로 사용한 NAC 20 mM을 처리하였을 경우는 대조군과 대비하여 IL-8 농도가 15.6%로 감소하였다.

### 6. PGE<sub>2</sub>(Prostaglandin E<sub>2</sub>) 억제능 시험

HaCaT cell에 UVB를 30 mJ/cm<sup>2</sup> 조사하여 염증을 유발시키고 PGE<sub>2</sub>를 ELISA로 측정하여 시료 물질의 항염증 효능을 평가하였다. 그 결과, Fig. 8에서 보는 바와 같이 UVB를 조사하지 않은 정상군에 비하여 UVB를 조사한 대조군의 PGE<sub>2</sub> 농도가 유의적으로 증가한 것으로 보아 UVB에 의해 염증이 유발됐음을 알 수 있다. 한편, 시험물질 4종을 10, 50, 100 uM 농도로 처리하였을 경우, kaempferol (1), α-rhamnoisorobin (2), afzelin (3)에서 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub> 농도가 감소함을 알 수 있었다. 실제로, Kaempferol (1)을 10, 50, 100 uM 농도로 처리하였을 때 대조군에 대비하여 각각 89.6, 80.7, 70.3%로 감소하였으며, α-rhamnoisorobin (2)를 10, 50, 100 uM 농도로 처리하였을 때 대조군에 대비하여 각각 64.0,

62.8, 56.7%로 감소하였다. 또한, afzelin (3)을 10, 50, 100  $\mu$ M 농도로 처리하였을 때 대조군에 대비하여 각각 73.1, 62.2, 46.3%로 감소하여 유의적인 결과차를 확인 할 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 NAC 20 mM을 처리하였을 경우는 대조군과 대비하여 PGE<sub>2</sub> 농도가 84.0% 감소하였다.

## 고 찰

본 연구에서는 양미로부터 분리한 플라보노이드 종류인 시료 4종(kaempferol,  $\alpha$ -rhamnoisorobin, afzelin, kaempferitrin)을 대상으로 항염증 효능을 평가함으로써 kaempferol과 그들의 rhamnoside의 구조적 활성 상관관계를 조사하였다. 그 결과 4종의 시료는 최고 농도 100  $\mu$ M까지 HaCaT cell과 HDF-N cell에서 80% 이상의 세포 생존률을 보여 세포 독성은 없는 것으로 판단되었다.

항염증 효능평가는 TARC 농도, PGE<sub>2</sub> 농도 및 자외선으로 유도된 염증관련 cytokine의 농도를 측정함으로써 효능을 연구하였다. 그 결과, TARC 농도를 immunoassay로 측정할 결과 kaempferol과  $\alpha$ -rhamnoisorobin은 농도 의존적으로 감소시킴으로써 항염증 효능을 보였으며, PGE<sub>2</sub> 농도를 immunoassay로 측정한 결과 kaempferol과  $\alpha$ -rhamnoisorobin 및 afzelin이 농도 의존적으로 감소시킴으로써 항염증의 효능을 보이는 것으로 판단된다. 또한, 자외선으로 유도된 염증관련 cytokine 중 IL-6, IL-8을 immunoassay로 측정한 결과, kaempferol만 통계적으로 유의하게 감소시키는 것으로 보아 IL-6과 IL-8 pathway에 관여하는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 시행한 "2010년도 중소기업기술혁신개발사업(과제번호 : S1075444)"의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## LITERATURE CITED

**Jin CW, Eom SH, Park HJ, Ghimeray AK, Yu CY and Cho DH.** (2009). Antioxidant activity of *Hibiscus cannabinus* L. leaves in different growth time. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:21-25.

**Boller S, Soldi C, Marques MC, Santos EP, Cabrini DA, Pizzolatti MG, Zampronio AR and Otuki MF.** (2009). Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. Journal of Ethnopharmacology. 130:262-266.

**Fang SH, Rao YK and Tzeng YM.** (2005). Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmopholeum* inflammatory mediators in LPS/IFN- $\gamma$ -activated murine macrophages. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 13:2381-2388.

**Regasini LO, Velloso JC, Silva DH, Furlan M, de Oliveira OM, Khalil NM, Brunetti IL, Young MC, Barreiro EJ and Bolzani VS.** (2008). Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. Phytochemistry. 69: 1739-1744.

**De Melo GO, Malvar Ddo C, Vanderlinde FA, Rocha FF, Pires PA, Costa EA, de Matos LG, Kaiser CR and Costa SS.** (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. Journal of Ethnopharmacology. 12:4228-4232.

**Jorge AP, Horst H, de Sousa E, Pizzolatti MG and Silva FR.** (2004). Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rats oleus muscle. Chmico-Biological Interactions. 14:989-996.

**Vishnu Prasad CN, Suma Mohan S, Banerji A and Gopalakrishnapillai A.** (2009). Kaempferitrin inhibits GLUT4 translocation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 380:39-43.

**Tzeng YM, Chen K, Rao YK and Lee MJ.** (2009). Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. European Journal of Pharmacologica Neerlandica. 60:727-734.

**Tapiero H, Tew KD, Ba GN and Mathe G.** (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomedicine and Pharmacotherapy. 56:200-207.

**Rothwell JA, Day AJ and Morgan MR.** (2005). Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53:4355-4360.

**Ross D, Mendiratta S, Qu ZC, Cobb CE and May JM.** (1998). Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. Free Radical Biology & Medicine. 26:81-89.

**Zuo Z, Zhang L, Zhou L, Chang Q and Chow M.** (2006). Intestinal absorption of hawthorn flavonoids - *in vitro*, *in situ* and *in vivo* correlations. Life Science. 79:2455-2462.

**O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM and Williamson G.** (2001). Flavonoid glucuronides are substrates for human liver  $\beta$ -glucuronidase. FEBS Letters. 503:103-106.

**Navarro-Nunez L, Castillo J, Lozano ML, Martinez C, Benavente-Garcia O, Vicente V and Rivera J.** (2009). Thromboxane A<sup>2</sup> receptor antagonism by flavonoids: structure-activity relationships. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57:1589-1594.

**Guha M and Mackman N.** (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signalling. 13:85-94.

**Lesslauer W, Tabuchi H, Gentz R, Brockhaus M, Schlaeger EJ and Grau G.** (1991). Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide-induced lethality. European Journal of Immunology. 21:2883-2886.

**Cheon MS, Yoon TS, Choi GY, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Choo BK and Kim HK.** (2009). Comparative study of extracts from rhubarb on inflammatory activity in raw 264.7 cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:109-114.

**Yoon TS, Cheon MS, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Chun JM, Choo BK and Kim HK.** (2010). Evaluation of solvent



- extraction on the anti-inflammatory efficacy of *Glycyrrhiza uralensis*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:28-33.
- Jin HI, Lee BR, Lim KJ, Trishna D, Shin HM and Lim BO.** (2011). Anti-inflammatory effects of *Prunus mune* mixture in colitis induced by dextran sodium sulfate. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19: 16-23.
- Chen Q, Koga T, Uchi H, Hara H, Terao H, Moroi Y, Urabe K and Furue M.** (2002). Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF-kB activation in human monocytes, Journal of Dermatological Science. 29:97-103.
- Vowels BR, Yang S and Leyden JJ.** (1995). Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: Implications for chronic inflammatory acne. Infection and Immunity. 63:3158-3165.
- Mandal PK, Freiter EM, Baqsy AL, Robertson FM and McMurray JS.** (2011). Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. Bioorganic & Medical Chemistry Letters. 21:6071-6073.
- Dovle T, Chen Z, Muscoli C, Obeid LM and Salvemini D.** (2011). Intraplantar-injected ceramide in rats induces hyperalgesia through an NF-kB and p38 kinase-dependent cyclooxygenase 2/ prostaglandin E2 pathway. The FASEB Journal. 25:2782-2791.