Check for updates

Korean Journal of Human Ecology
2024. Vol. 33, No. 6, 995-1005

http://dx.doi.org/10.5934/kjhe.2024.33.6.995
ISSN 1226-0851(Print)/ISSN 2234-3768(Online)

RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 에탄올 추출물의 MAPK 경로 조절을 통한 항염증 효능

Anti-inflammatory efficacy of heat-treated Liriope platyphylla ethanol extract through MAPK pathway regulation in RAW264.7 cells

김예지[1] • 이현지[1] • 남유리[2] • 배은영[3] • 이선영[4] • 김경아[4],*
충남대학교 식품영양학과 석사과정[1] • 충남대학교 식품영양학과 박사과정[2] • 엘로힘연구소 소장[3] • 충남대학교 식품영양학과 교수[4],*

Kim, Yeji[1] • Lee, Hyeonji[1] • Nam, Youree[2] • Bae, Eunyoung[3] • Ly, Sunyung[4] • Kim, Kyungah[4],*
Department of Food & Nutrition, Chungnam National University[1),2),4)] • R&D Center, Elohim[3)]

Abstract

This study aimed to investigate the anti-inflammatory efficacy and mechanisms of heat-treated *Liriope platyphylla* (LP) ethanol extract. This was done by measuring nitric oxide (NO) levels, the gene expression of inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1β, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)-α, as well as chemokines like monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α), and inflammation-related proteins like cyclooxygenase (COX)-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Additionally, protein expression of COX-2 and iNOS was assessed, along with the modulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway involved in the inflammatory response, in lipopolysaccharide (LPS)-treated macrophages. Treatment with the heat-treated LP ethanol extract at concentrations of 12.5, 25, 50, and 100 μg/mL, which were not cytotoxic, resulted in a significant reduction in NO production. particularly at the 100 μg/mL concentration. The gene expression levels of inflammatory cytokines, chemokines, and inflammation-related proteins were measured using qRT-PCR. Notably, the gene expression levels of IL-1β, TNF-α, MCP-1, MIP-1α, and COX-2 showed a dose-dependent decrease upon treatment with the extract, while IL-6 and iNOS were significantly inhibited at a concentration of 100 μg/mL. Furthermore, the study found a reduction in the protein expression of COX-2 and iNOS, as well as in the MAPK signaling pathway, when cells were treated with the heat-treated LP ethanol extract. These results indicate that the heat-treated LP ethanol extract exerts an anti-inflammatory effect, mediated through the inhibition of inflammatory cytokines, chemokines levels, and MAPK activation.

Keywords: Liriope platyphylla, Anti-inflammation, Nitric oxide, MAPK pathway, RAW264.7 cell

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(육성 품종 활용 지역특화 약용작물 기능성 소재 이용 확대 연구, 과제번호: RS-2022-RD010228)의 지원에 의해 이루어진 것임

* Corresponding author: Kim, Kyungah
Tel: +82-42-821-6832, Fax: +82-42-821-8887
E-mail: kakim@cnu.ac.kr

ⓒ 2024, Korean Association of Human Ecology. All rights reserved.

Ⅰ. 서론

감염이나 유해한 물질의 인체 내부 및 외부 자극에 의해 발생하는 염증 반응(inflammation)은 신체에서 일어나는 방어적 반응으로 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 등의 몸을 보호하는 보호기전으로 작용하지만, 과도할 경우 류마티스 관절염, 천식과 같은 면역성 질환, 암, 돌연변이와 같은 병적인 상태를 야기할 수 있다(이하나 외, 2016). 염증 반응은 면역세포에 의해 일어나며 lipopolysaccharide (LPS)는 대표적으로 대식세포 또는 단핵구의 toll-like receptor 4 (TLR4)를 자극한다(장지훈 외, 2016). 활성화된 TLR4는 mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF-κB) 등의 염증 매개 신호 네트워크를 포함하는 여러 단계의 신호 전달 과정을 활성화 시킨다 (김선영 외, 2013). LPS에 의해 자극된 세포는 염증 매개성 물질들인 nitric oxide (NO), inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, prostaglandin E2, interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α 등을 생성한다(김경아 외, 2023).

MAPK pathway family에는 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38이 있다(함주리 외, 2020). 대식세포에서 MAPK의 인산화 증가는 전사와 번역 과정에서 염증 매개체 합성 조절에 관여하여 염증 반응을 증가시킨다고 보고되었으며, MAPK pathway 활성화는 NF-kB와 같은 전사 조절인자의 발현 조절을 통해 여러 염증 매개 물질의 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(최은영, 장서인, 2021). 따라서 만성 염증 매개인자들의 발현과 이들 유전자의 발현에 있어 주요 신호 전달 분자인 MAPK 활성 조절은 항염증제 개발을 위한 주요 핵심분자 타겟으로 인식되고 있다 (Park et al, 2018).

현재 사용 중인 염증 치료를 위한 약품에는 히드로코르티손, 베타메타손 등의 스테로이드계와 아스피린, 이부프로펜 등의 비스테로이드계가 있으며 이들 항염증제는 신장염, 위염, 심장 질환 등의 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다(Park et al, 2018). 이로 인해 의약품에 비해 부작용이 적은 식물성 천연 소재에 대한 관심이 증가하고 있으며, 천연 소재를 이용한 건강기능식품의 소비도 증가하고 있다 (황경아, 2020).

백합목(Liliales) 백합과(Liliaceae) 맥문동속(Liriope)에 속하는 맥문동(*Liriope platyphylla*)은 상록 다년생 초본으로 괴근을 주로 약재로 사용한다(송정화 외, 2011). 중국, 일본, 대만, 한국 등의 동아시아권에 분포하며, 마른기침, 기관지염, 가래, 목소리가 잠기는 증상에 쓰이고, 한방에서는 온경탕, 감초탕, 맥미지황탕, 생맥산 등에 활용되고 있다(김다희 외, 2019). 맥문동의 유효성분으로는 steroidal saponin인 spicatoside 및 ophiopogonin, 그 외에도 β-sitosterol, stigmasterol, β-sitosterol glucoside, oligosaccharides 등의 다양한 polysaccharides가 함유되어 있음이 보고되었다(이숙경 외, 2009). 맥문동은 혈당강하, 항염증 및 항당뇨, 항암 활성, 면역 조절 효과, 신경 보호 효능, 간 보호 효과, 항알레르기 효과 등의 효능이 있음이 보고되어 있다(강누리 외, 2021; 강영건, 이태희, 2006; 김다희 외, 2019; 김진주 외, 2002; 김호석 외, 2014; 이인자 외, 1998).

본 연구실에서는 건조 맥문동과 열처리한 맥문동을 사용하여 NO 생성 및 macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)의 발현량 저해 효과를 조사하였고, 그 결과 열처리한 맥문동의 저해 활성이 더 우수한 것을 확인하였다(김경아 외, 2023). 생맥산은 인삼, 맥문동, 오미자를 1:2:1로 달여 만든 한방처방음료로, 맥문동은 생맥산에서 가장 많은 비율을 차지하는 주요 성분이다(허남윤, 백은경, 2005). 김경화 외(2018)의 연구에 의하면 맥문동을 덖음 처리하였을 때 생맥산의 일부 유효 성분과 항산화 활성이 증가함을 보고하였다. 또한 양미옥(2013)에 의하면 맥문동을 열처리한 시료가 생시료에 비해 전당과 환원당의 함량이 많았고, 항산화 활성도 높게 측정되었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 열처리한 맥문동의 염증 관련 사이토카인과 단백질 발현 수준에 미치는 영향 및 그 기전에 관한 연구를 진행하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 열처리한 맥문동 추출물 제조

맥문동(*Liriope platyphylla* root, LP)은 충청남도농업기술원 구기자연구소에서 재배하는 지역 특화 약용 작물 신품종인 청심(Cheongsim) 맥문동을 구입한 후 엘로힘 연구소에서 추출하여 실험에 사용하였다. 맥문동의 열처리는 로스팅기(Samsung food machine, Pocheon, Korea)를 이용하여 250°C에서 20분 동안 볶는 방법으로 진행하였다. 열처리한 맥문동은 60% 에탄올을 사용하여 70°C에서

6시간 동안 1회 추출하였고, 추출하는 동안 매 시간마다 추출 용기를 흔들며 교반하였다. 추출액은 여과지로 여과 후 농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 35°C에서 감압 농축하였다.

2. 세포 배양

실험에는 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포를 사용하였으며, 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 구매하였다. 배지는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, USA)에 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY., USA)과 10% fetal bovine serum (Hyclone, Victroia, Australia)을 섞은 배지를 사용하였다. 세포는 37°C로 온도가 맞춰진 incubator (BB15, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양되었고, 90 x 20 mm 크기의 cell culture dish (SPL Life Science Co., Pocheon, Korea)에서 배양되었으며, 세포의 계대배양은 density가 80% 이상일 때 진행하였다.

3. 세포 독성 평가 (water-soluble tetrazolium salts [WST] assay)

열처리한 맥문동 추출물의 세포 독성이 나타나는 농도를 찾기 위해 RAW264.7 세포를 96-well plate에 well당 1×10^4 cells로 분주한 후, 37°C로 맞춰진 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 추출물을 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL 농도로 처리한 후 24시간 배양하였다. EZ-Cytox WST assay reagent (Daeil lab service Co. Ltd., Seoul, Korea)를 10 μL씩 세포 배양액에 첨가하고 2시간과 3시간 경과 후에 ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 2시간과 3시간 측정값의 평균을 사용하였으며, 세포의 생존율은 무처리군의 세포 생존율을 기준으로 하여 상대 세포 생존율(%)로 계산하여 표시하였다.

4. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

생성된 NO의 양을 측정하기 위해 well당 1×10^5 cells 농도로 48-well plate에 300 μL씩 분주한 후 37°C로 맞춰진 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 추출물을 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도로 처리하고 1시간 후에 LPS (Sigma-Aldrich Co.)를 1 μg/mL 농도로 추가 처리한 후 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. NO 생성량 측정을 위해 세포 배양액 상층액을 따서 96-well plate에 배양액 100 μL를 넣고, Griess reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 μL를 첨가한 후 15분간 방치시켰다. 그 후 ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 아질산나트륨($NaNO_2$)을 기준으로 작성된 표준 검량곡선에 대입하여 산출하였다.

5. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α와 염증성 chemokine인 MCP-1, MIP-1α, 그리고 염증성 효소 단백질인 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위하여 6-well plate에 각 well 당 세포를 5×10^5 cells 농도로 2 mL씩 분주하였다. 추출물을 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도로 처리하고 1시간 후에 LPS를 1 μg/mL 농도로 추가 처리한 후 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. Trizol 시약으로 RNA를 추출하였고, 추출된 RNA를 이용해 cDNA를 합성하였다. 그 후 합성된 cDNA에 SYBR green qPCR mix (Biofact, Daejeon, Korea)와 각 유전자에 특이적인 primer를 혼합하여 PCR을 진행하였다. Real-time PCR의 실험 조건은 pre-denaturation을 50°C에서 2분, 95°C에서 15분 동안 진행하였고, 증폭 과정은 95°C에서 20초, 60°C에서 40초 동안 40 cycles 수행하였다. Internal standard로 GAPDH를 사용하여 분석하였다.

6. Western blot analysis

MAPK에 해당하는 단백질들인 p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38 및 COX-2와 iNOS의 발현 확인을 위하여 세포를 6-well plate에 각 well 당 5×10^5 cells 농도가 되도록 분주하였다. 추출물을 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도로 처리하고 1시간 뒤에 1 μg/mL 농도의 LPS를 추가 처리한 후 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. 배양이 완료된 plate를 PBS로 세척한 후 RIPA buffer를 사용하여 단백질을 추출하였다. Bradford reagent (Sigma-Aldrich Co.)로 단백질 농도를 정량하였고, 정량한 단백질을 10% SDS-PAGE (Polyacrylamide gel)를 이용해 전기영동으로 분리한 후 5% 탈지분유 용액에 1시간 동안 blocking 하였다. COX-2 및 iNOS와 p-ERK, ERK, p-JNK, JNK,

p-p38, p38의 발현량을 확인하기 위하여 Cell Signaling Technology Inc.의 항체를 사용하였다. 2차 항체로는 anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology Inc.)를 사용하였다. Membrane에 EzWestLumi-plus (ATTO CO., Tokyo, Japan)를 묻힌 후 ChemiDoc (LuminoGraph, ATTO Co.)으로 밴드 사진을 찍어 단백질 발현량을 측정하였다. Image J intensity (US Naional Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 밴드의 정량 분석을 하였다. COX-2와 iNOS의 밴드는 β-actin을 internal standard로 사용하였고, MAPK pathway에 해당하는 밴드의 phospho-form은 total-form을 internal standard로 사용하였다.

7. 통계분석

결과의 통계 분석은 SPSS 26 (Statistical Package for the Social Science, IBM, Chicago, IL, USA)를 활용하여 실시하였고, 실험 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 무처리군과 LPS 처리군 간의 평균값 비교 및 LPS 처리군과 열처리한 맥문동 처리군의 농도별 평균값 차이의 유의성은 일원 배치 분산분석(one-way ANOVA)을 통해 확인하였으며, 사후 검증은 Tukey's multiple comparison test를 사용하여 α=0.05 수준에서 유의성을 평가하였다.

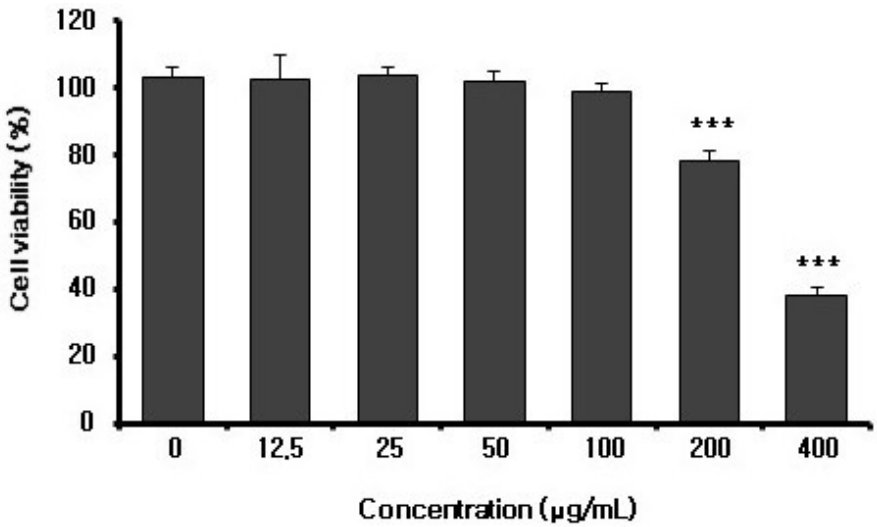
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 세포독성 평가

열처리한 맥문동 추출물이 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 추출물을 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL 농도로 처리한 후 측정한 결과는 [그림 1]과 같으며 열처리한 맥문동(LP) 추출물은 200 μg/mL에서부터 무처리군과 유의한 차이가 나는 것을 통해 세포독성을 나타내는 것을 확인하였다. 이를 토대로 향후 실험에서는 세포 독성을 나타내지 않는 100 μg/mL 농도까지를 실험에 사용하였다. 김경아 외(2023)의 연구에 의하면 마우스 대식세포인 J774 세포에서 열처리한 맥문동의 용매별 추출물들(20%, 40%, 60%, 80%, 100% 에탄올 추출물 및 100% 물 추출물)이 세포독성에 미치는 영향을 확인하였고, 그 결과 100 μg/mL의 농도까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다.

2. RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 Nitric oxide 생성량 측정

대식세포는 면역세포로서 손상된 부위의 회복을 위해 여러 자극에 의해 활성화되고, NO와 염증성 cytokine들의 생성 촉진을 통해 감염 초기 생체 방어에 중요한 역할을 한다(Snyder & Bredt, 1992). NO는 활성질소종(reactive nitrogen species) 중 하나로 L-Arginine/nitric oxide pathway를 통해 생성되며, 과도하게 분비되면 혈관 투과



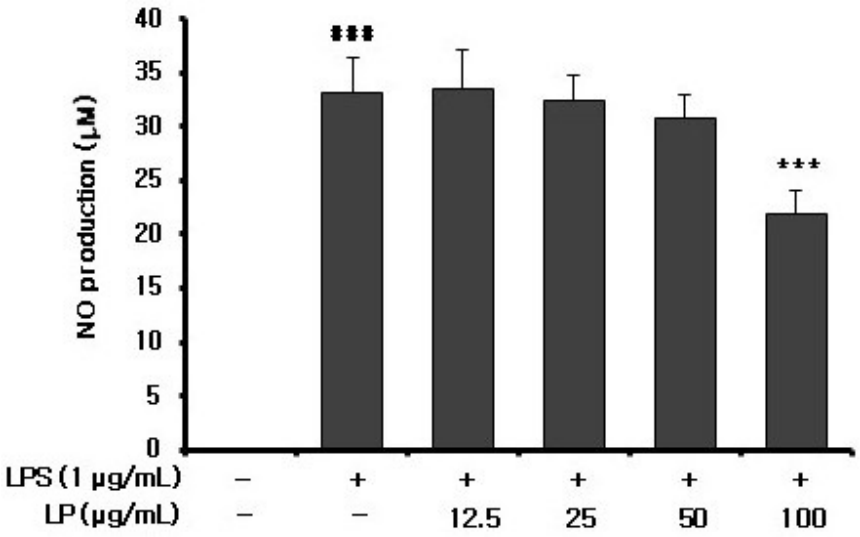
[그림 1] RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 세포 생존율
무처리군과 비교 ***p<.001.

성을 증가시켜 부종을 유발하고 병리적 상태를 초래하는 것으로 알려져 있다(고현서 외, 2024; 조영제, 안봉전, 2008). 열처리한 맥문동 추출물의 항염 효능 확인을 위해 LPS 자극으로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에서 생성된 NO양의 변화를 관찰한 결과는 [그림 2]와 같다. LPS 처리로 인한 NO의 생성이 유의성 있게 유도되었음을 확인하였고, 열처리한 맥문동 추출물은 100 μg/mL 농도에서 NO 생성을 유의하게 저해하였다. 김경아 외(2023)는 J774 세포에서 열처리한 맥문동 60% 에탄올 추출물이 100 μg/mL 농도에서 NO의 생성을 유의하게 저해하였음을 보고하였다. 강누리 외(2021)의 연구에 의하면 맥문동 열수 추출물은 80 μg/mL 농도에서부터 NO의 생성을 유의적으로 감소하였다고 보고하였다.

3. RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물이 염증성 cytokine과 chemokine 및 COX-2와 iNOS의 유전자 발현에 미치는 영향

염증성 사이토카인에 해당하는 IL-1β, IL-6, TNF-α는 초기 염증 반응에서 중요한 역할을 한다(Wautier & Wautier, 2023). TNF-α와 IL-6는 단핵구 등 면역세포 뿐만 아니라 내피세포, 상피세포 등에서도 물리적, 화학적 자극에 의해 분비되며, IL-6는 염증, 감염의 급성기에 혈장 단백질 생성을 자극하고, IL-6가 과잉 생성되었을 때 발열, 식욕부진, 피로 등의 증상이 나타날 수 있는 것으로 알려져 있다 (남호섭 외, 2017; 전동주 외, 2011; Grossman et al, 1989). 열처리한 맥문동 추출물이 염증성 cytokine의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS로 자극하여 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 열처리한 맥문동 추출물을 처리하고, 생성된 염증성 cytokine의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 능력을 확인한 결과는 [그림 3]의 (A), (B), (C)에서 본 바와 같이 LPS 처리에 의해 염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현 수준이 높아지는 것을 확인하였고, 열처리한 맥문동 추출물을 처리하였을 때 감소하는 경향을 확인하였다. TNF-α는 25 μg/mL, IL-1β는 50 μg/mL 농도에서부터, IL-6는 100 μg/mL 농도에서 유의하게 감소하였다. 김호석 외(2014)의 연구에 의하면 인간 비만세포주인 HMC-1 세포에서 맥문동 80% 에탄올 추출물이 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α의 분비를 감소시키는 것을 확인하였으며, IL-6은 1 μg/mL 농도에서부터, IL-1β는 10 μg/mL 농도에서부터, TNF-α는 100 μg/mL 농도에서 유의하게 감소시켰다고 보고하였다.

Chemokine은 일반적으로 IL-1, TNF-α, interferon (IFN)-c와 같은 염증성 사이토카인과 LPS 등에 의해 분비가 유도되며 백혈구의 화학적 주성을 나타내는 cytokine을 일컬어 부른다(유영민 외, 2001; Capelli et al, 1999). 만성기관지염 환자의 기관지 폐포 세척액에서 MCP-1 수치가 유의하게 증가하는 것이 보고되어 있으며, MCP-1, MIP-1α 모두 급성 호중구 염증을 유발할 수 있는 과립구를 활성

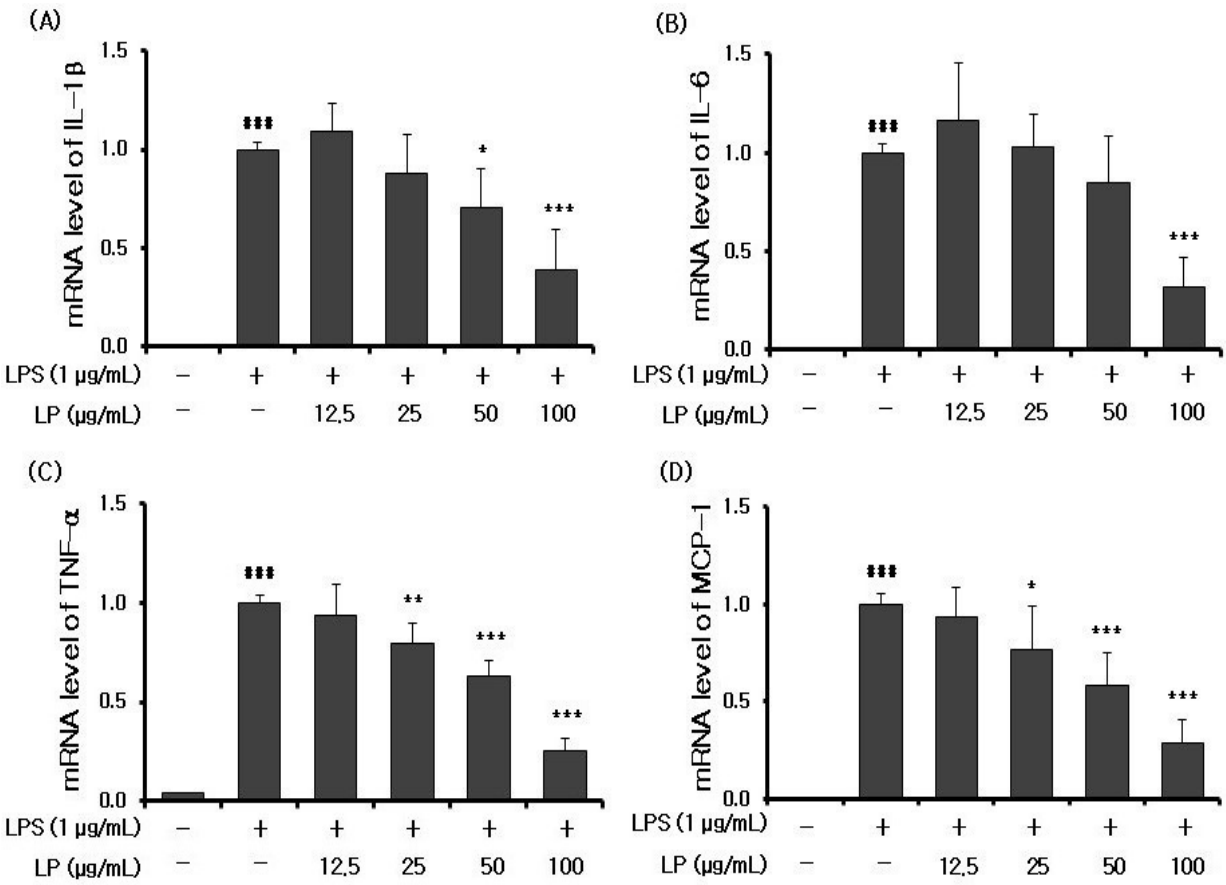


[그림 2] RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 NO 생성량

Control과 비교 ###p<.001, LPS 처리군과 비교 ***p<.001.

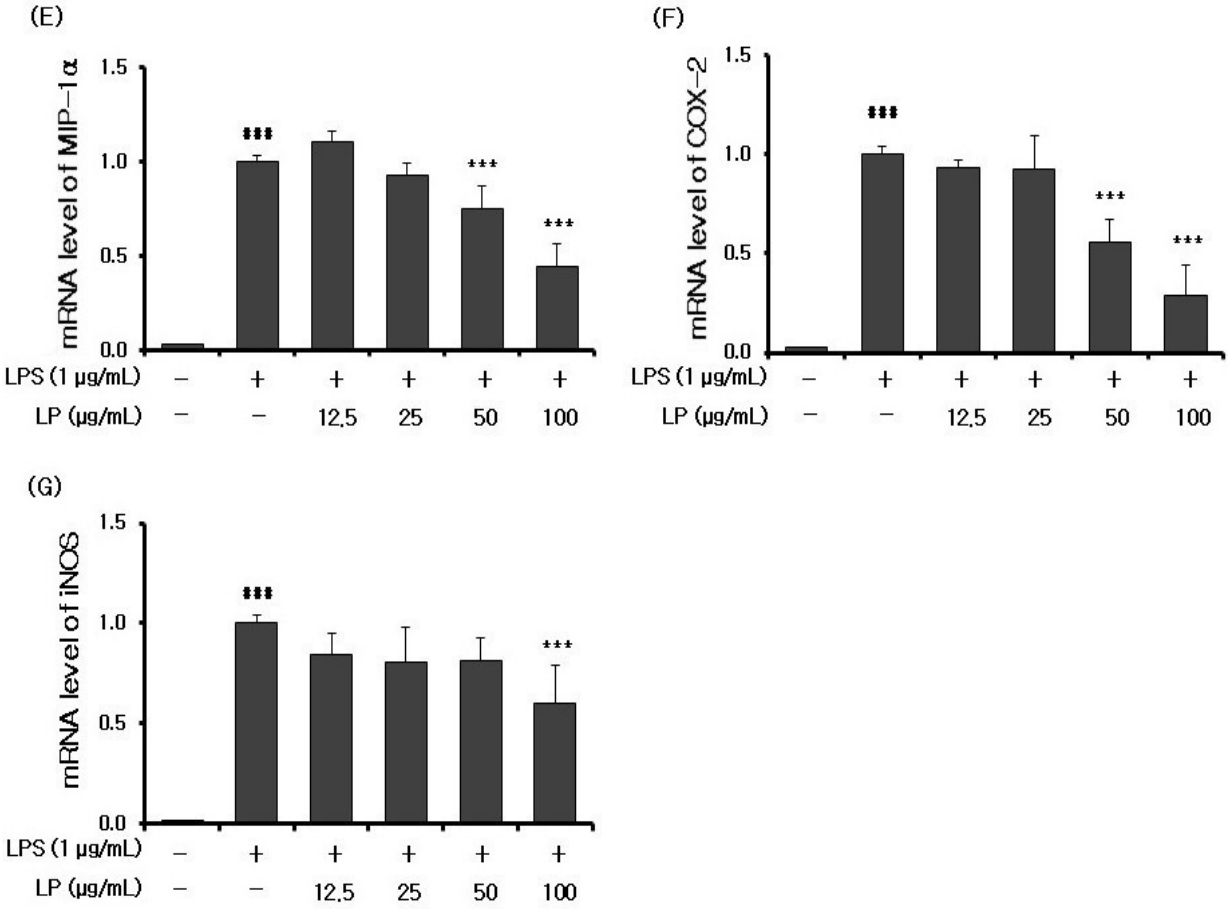
화 시킨다(이용현, 임은미, 2013; Capelli et al, 1999). 열처리한 맥문동 추출물이 염증성 chemokine의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향을 확인한 결과는 [그림 3]의 (D), (E)에서 본 바와 같이 LPS 처리에 의해 염증성 chemokine인 MCP-1, MIP-1α의 mRNA 발현 수준이 높아지는 것을 확인하였고, 열처리한 맥문동 추출물을 처리하였을 때 감소하는 경향을 확인하였다. MCP-1은 25 μg/mL, MIP-1α는 50 μg/mL 농도에서부터 유의하게 감소하였다. Kim et al.(2012)의 연구에 의하면 RAW264.7 세포에서 맥문동 열수 추출물이 25 μg/mL 농도에서부터 MCP-1의 생성을 유의하게 저해하였음을 보고하였다.

COX는 arachidonic acid를 prostanoid로 전환시키는 효소로, COX-1과 COX-2 에 의해 생성된 소량의 prostanoid는 항상성 유지에 필요하나 과량의 prostanoid는 면역 반응에 관여하여 여러 염증성 질환을 초래할 수 있다(목지예 외, 2011).COX-2의 경우 발현이 증가되면 세포의 부착성을 강화시킴으로써 여러 염증성 질환의 발병 및 진행에 중요한 작용을 한다(박영숙, 2007). iNOS는 다양한 조직에서 염증 유발 물질인 LPS 등에 의해 활성화되어 많은 양의 NO 생성을 통해 세포 독성, 조직 손상 등의 유해한 작용을 한다(Förstermann & Sessa, 2012). 열처리한 맥문동 추출물이 염증성 효소 단백질의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS로 자극하여 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 열처리한 맥문동 추출물을 처리하고, COX-2와 iNOS의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 능력을 확인한 결과는 [그림 3]의 (F), (G)에서 본 바와 같이 LPS 처리에 의해 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현 수준이 높아지는 것을 확인하였고, 열처리한 맥문동 추출물을 처리하였을 때 감소하는 경향을 확인하였다. COX-2는 50 μg/mL 농도에서부터, iNOS는 100 μg/mL 농도에서 유의하게 감소하였다. Park et al.(2005)의 연구에 의하면 LPS로 염증이 유도된 mouse BV2 microglial cell에서 맥문동



[그림 3] RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 염증성 cytokine과 chemokine 및 COX-2와 iNOS의 유전자 발현
(A) IL-1β, (B) IL-6, (C) TNF-α, (D) MCP-1

>> 뒤에 계속



[그림 3] RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 염증성 cytokine과 chemokine 및 COX-2와 iNOS의 유전자 발현

(E) MIP-1α, (F) COX-2, (G) iNOS

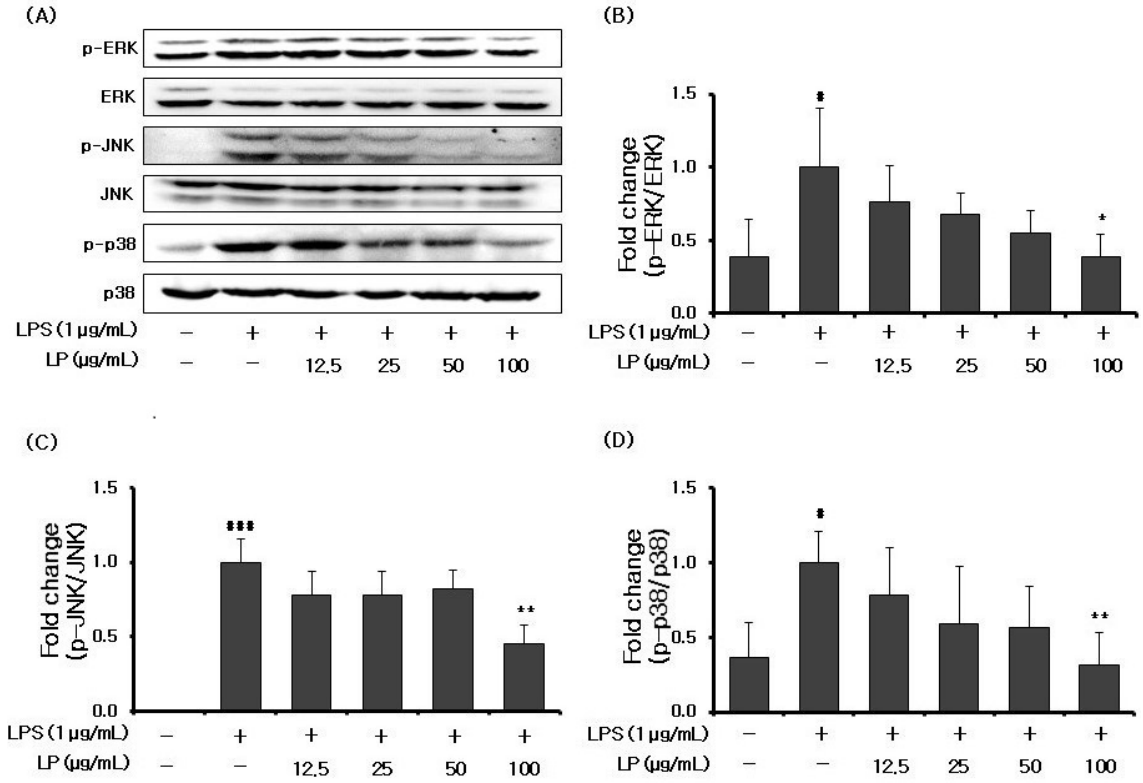
Control과 비교 ###p<.001, LPS 처리군과 비교 *p<.05, **p<.01, ***p<.001.

열수 추출물이 5 mg/mL 농도에서 COX-2와 iNOS의 유전자 발현을 유의하게 저해하였음을 보고하였다. Han et al. (2013)은 맥문동 뿌리에서 분리된 성분인 prosapogenin Ⅲ를 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 처리하였을 때 COX-2는 10 uM 농도에서부터, iNOS는 50 uM 농도에서부터 유전자 발현 수준이 유의하게 억제되었음을 보고하였다.

4. RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물이 MAPK family와 COX-2 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

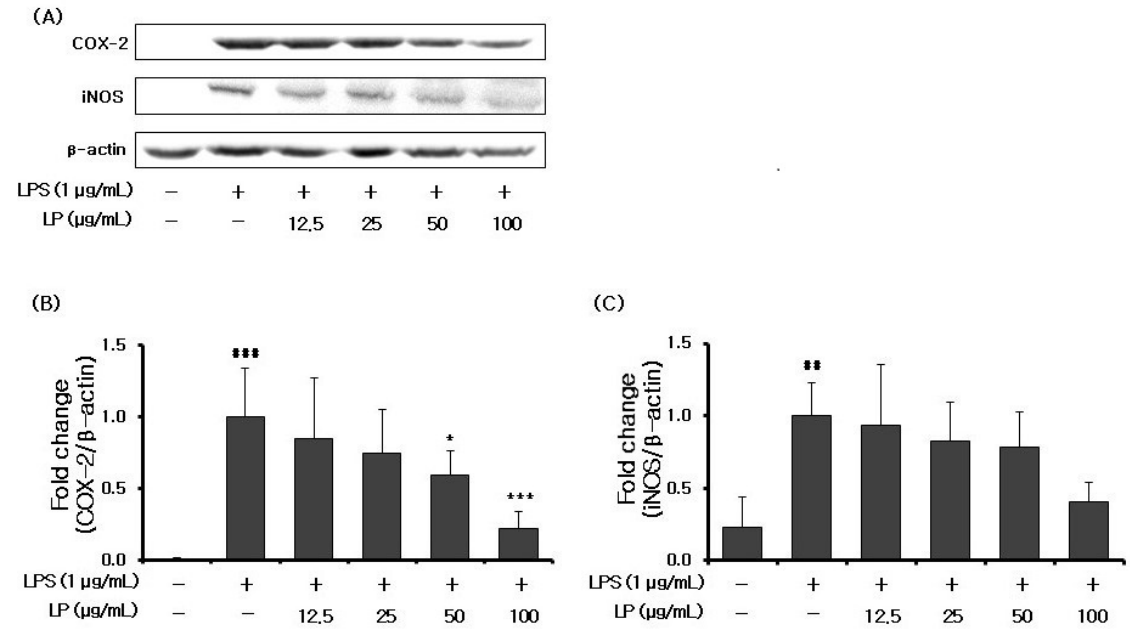
MAPK는 다양한 생리적 과정을 조절하고 제어하는 중요한 역할을 수행함에 따라, 생리학적 기능 및 인간 질환에서의 역할을 규명하기 위해 광범위한 연구의 대상이 되어 왔다(Johnson & Lapadat, 2002). MAPK는 염증 전사인자인 NF-κB의 상위신호전달체계로 MAPK에 해당하는 ERK는 세포 외부 자극에 대해 반응하여 전사인자를 활성화하는 반면 JNK와 p38은 세포 내 스트레스를 유발하는 물질이나 LPS와 같은 염증 유발 물질에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다(박충무, 윤현서, 2023). 열처리한 맥문동 추출물이 염증 관련된 효소 단백질인 COX-2와 iNOS 및 염증 신호경로인 MAPK 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과는 [그림 4]와 [그림 5]에서 본 바와 같이 LPS에 의해 COX-2와 iNOS 및 인산화된 ERK, JNK, p38 단백질 발현이 증가하였고, 열처리한 맥문동 추출물 시료의 농도가 증가함에 따라 COX-2는 50 μg/mL 농도에서부터, p-ERK, p-JNK, 그리고 p-p38은 100 μg/mL 농도에서 유의하게 감소하였고, iNOS는 감소하는 경향을 보였다.

COX-2와 iNOS의 발현 감소는 NF-kB 신호전달 경로의 활성 변화와 관련이 있을 가능성을 시사하며, 이에 대



[그림 4] RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 MAPK family의 단백질 발현

(A) 열처리한 맥문동 추출물의 MAPK 밴드 사진, (B~D) Image J로 정량화한 MAPK 밴드 값 (n≥3)
Control과 비교 #p<.05, ###p<.001, LPS 처리군과 비교 *p<.05, **p<.01



[그림 5] RAW264.7 세포에서 열처리한 맥문동 추출물의 COX-2와 iNOS의 단백질 발현

(A) 열처리한 맥문동 추출물의 COX-2와 iNOS 밴드 사진, (B~C) Image J로 정량화한 COX-2와 iNOS 밴드 값 (n≥3)
Control과 비교 ##p<.01, ###p<.001, LPS 처리군과 비교 *p<.05, ***p<.001.

한 추가적인 분석이 필요할 것으로 판단된다. 김호석 외 (2014)는 HMC-1 세포에 맥문동 80% 에탄올 추출물을 처리하였을 때 10 μg/mL 농도에서부터 ERK의 인산화를 억제하였음을 보고하였다. Lee et al.(2019)의 연구에 의하면 Epidermal Growth Factor recombinant로 기관지 천식 상태가 유도된 인간 폐암 세포주인 A549 세포에 맥문동 물 추출물을 처리하였을 때 JNK는 300 μg/mL 농도에서, ERK는 500 μg/mL 농도에서부터 인산화가 유의하게 억제되었음을 보고하였다.

Ⅳ. 요약 및 결론

본 연구는 열처리한 맥문동 에탄올 추출물의 항염 효능 및 기전 연구를 통해 건강기능성 소재 개발 가능성을 확인하고자 진행되었다. 항염 효능 확인을 위해 NO 생성, 염증성 cytokine, chemokine, 염증성 효소 단백질의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하였으며, 염증성 효소 단백질과 염증 관련 신호전달에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향도 확인하였다. LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 열처리한 맥문동이 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도로 처리한 후 NO 생성을 확인한 결과, 100 μg/mL 농도에서 NO의 생성이 유의하게 저해됨을 확인하였다. 염증성 cytokine과 chemokine, 그리고 염증성 효소 단백질의 유전자 발현 수준도 열처리한 맥문동 추출물 처리 농도가 높아짐에 따라 감소하는 경향을 확인하였고, IL-1β, TNF-α, MCP-1는 25 μg/mL 농도에서부터, MIP-1α, COX-2는 50 μg/mL 농도에서부터, IL-6와 iNOS는 100 μg/mL 농도에서 유전자 발현 수준을 유의적으로 감소시킴을 확인하였다. 염증성 효소 단백질인 COX-2, iNOS의 발현 감소와 염증 관련 신호전달 단백질인 MAPK의 인산화 억제 효능도 관찰하였으며, COX-2는 50 μg/mL 농도에서부터, p-ERK, p-JNK, 그리고 p-p38은 100 μg/mL 농도에서 단백질 발현이 유의하게 감소함을 확인하였다. 본 연구를 통해 열처리한 맥문동 에탄올 추출물은 항염 효능이 있으며 이는 MAPK의 인산화 억제에 따른 염증성 사이토카인과 케모카인의 발현 수준 저해를 통해 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 열처리한 맥문동 추출물이 건강기능식품 개발에 있어 항염 관련 천연 소재로서의 활용 가능성이 있음을 시사한다.

주제어: 맥문동, 항염, 산화질소, MAPK pathway, RAW264.7 세포

REFERENCES

강누리, 황덕상, 이진무, 이창훈, 장준복(2021). 맥문동 물 추출물의 선천면역 활성과 염증억제 효과. *대한한방부인과학회지, 34(3)*, 15-28.

강영건, 이태희(2006). 구속 스트레스로 유발된 기억 손상에 대한 맥문동 (麥門冬) 의 신경보호 효능. *대한본초학회지, 21(2)*, 63-75.

고현서, 황혜정, 방경원, 황경아(2024). NF-κB/MAPK 신호전달 경로 조절을 통한 비파잎 (Eriobotrya japonica Lindl.) 의 항염증 효능. *한국식품영양과학회지, 53(8)*, 771-779.

김경아, 남유리, 배은영, 이선영(2023). TNF-α/IFN-γ 로 유도된 각질형성세포 및 LPS 로 유도된 대식세포에서 열처리 맥문동 에탄올 추출물의 CCL22 및 NO 생성 억제 효능. *한국생활과학회지, 32(6)*, 857-867.

김경화, 강민정, 강재란, 신정혜(2018). 덖음 처리 시간을 달리한 맥문동을 첨가한 생맥산의 이화학적 특성. *한국식품저장유통학회지, 25(1)*, 62-70.

김다희, 오다래, 백승연, 김미리(2019). 숙성 흑 맥문동의 품질특성 및 항산화능. *한국식품저장유통학회지, 26(5)*, 505-512.

김선영, 조미정, 황보민, 백영두, ... 지선영(2013). NF-κB 와 MAPK 억제를 통한 스테비아 잎의 항염증효과. *한방안이비인후피부과학회지, 26(3)*, 54-64.

김진주, 정희재, 정승기, 이형구(2002). 맥문동탕과 정천화담항기탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF 내 면역세포 및 혈청 IgE 에 미치는 영향. *대한한의학회지, 23(1)*, 37-49.

김호석, 박지혜, 김현갑, 김재현, ... 손영주(2014). 麥門冬 에탄올 추출물이 알레르기 염증 반응에 미치는 영향. *동의생리병리학회지, 28(5)*, 512-519.

남호섭, 정지욱, 김도완, 하효철(2017). 곰취 열수 추출물의 항산화 및 항염증 활성. *한국식품저장유통학회지, 24(6)*, 834-841.

목지예, 강현주, 조정근, 전인화, ... 장선일(2011). 엉겅퀴 (Cirsium japonicum var. ussuriense) 부위별 추출물의 항산화 및 항염증 효과. *대한본초학회지, 26(4)*, 39-47.

박영숙(2007). 염증성 장질환에서 COX-2 억제제의 역할:

이로운가? 해로운가?. *대한소화기학회지, 50(6)*, 350-355.

박충무, 윤현서(2023). RAW 264.7 세포에 대한 NF-κB 와 MAPK 활성 억제를 통한 개다래 열매 에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한통합의학회지, 11(2)*, 119-128.

송정화, 강민구, 김나미, 이종수(2011). 맥문동 (청심, 맥문동 1 호) 의 영양특성 및 생리 기능성. *한국약용작물학회지, 19(6)*, 478-483.

양미옥(2013). 전처리방법에 따른 맥문동 열수 추출물의 항산화성과 관능 특성. *동아시아식생활학회지, 23(5)*, 645-653.

유영민, 김종우, 조정제, 임강현(2001). 사람 비만세포주에서 Clozapine 과 Fluoxetine 에 의한 케모카인 및 케모카인 수용체의 상이한 발현. *생물치료정신의학회지, 7(2)*, 237-243.

이숙경, 박종호, 김연태(2009). 맥문동 열수추출물의 항산화력과 항균력에 관한 연구. *한국식품영양학회지, 22(2)*, 279-285.

이용현, 임은미(2013). 女貞實이 LPS 로 유발된 RAW 264.7 cell 의 염증에 미치는 영향. *대한산부인과학회지, 26(4)*, 066-081.

이인자, 백남인, 조성지, 방면호, ... 김금숙(1998). 맥문동 (Liriope platyphylla WT) 스테로이드 사포닌의 항암활성. *한국응용생명화학회지, 41(5)*, 390-394.

이하나, 차동석, 전훈(2016). 히어리의 항염증 효능. *생약학회지, 47(2)*, 165-171.

장지훈, 조현우, 이보영, 유강열, 윤지영(2016). Lipopolysaccharide 로 유도한 대식세포의 염증반응에서 미나리 에탄올 추출물 및 분획물의 항염증 효과. *한국식품영양과학회지, 45(11)*, 1595-1603.

전동주, 차윤엽, 이은(2011). 대황추출물의 염증반응 제어효과. *한방재활의학과학회지, 21(1)*, 35-46.

조영제, 안봉전(2008). 청목노상 (Morus alba L.) 추출물에 의한 Lipopolysaccharide 로 유도된 Raw 246.7 cell 에서 염증 억제효과. *한국응용생명화학회지, 51(1)*, 44-48.

최은영, 장서인(2021). Lipopolysaccharide 로 유도된 RAW 264.7 에서 수국차 추출물의 항염증 효과. *한국식품영양과학회지, 50(3)*, 236-245.

함주리, 이미자, 최라영, 이해인, ... 이미경(2020). 베타원 쌀보리 주정추출물의 MAPK 경로조절을 통한 항염증 작용. *한국식품영양과학회지, 49(10)*, 1061-1068.

허남윤, 백은경(2005). 생맥산의 처방을 응용한 전통음료의 개발. *한국조리학회지, 11(3)*, 166-178.

황경아(2020). 건강기능식품 국산 기능성원료 (농촌진흥청 연구 중심으로). *식품과학과 산업, 53(4)*, 366-373.

Capelli, A., Di Stefano, A., Gnemmi, I., Balbo, P., ... & Donner, C. (1999). Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *European Respiratory Journal, 14(1)*, 160-165.

Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal, 33(7)*, 829-837.

Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., ... & Gottlieb, A. B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(16)*, 6367-6371.

Han, Y., Jung, H. W., Lee, D. H., Kwon, S. Y., ... & Park, Y.-K. (2013). Anti-inflammatory effects of prosapogenin III from the dried roots of Liriope platyphylla in LPS-stimulated RAW264. 7 cells. *Journal of Asian natural products research, 15(9)*, 1038-1049.

Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science, 298(5600)*, 1911-1912.

Kim, H. K., Lee, J. Y., Han, H. S., Kim, Y. J., ... & Lee, Y. J. (2012). Immunomodulatory effects of Liriope platyphylla water extract on lipopolysaccharide-activated mouse macrophage. *Nutrients, 4(12)*, 1887-1897.

Lee, I. S., Kim, D. H., Kim, K. H., Park, J., ... & Jang, H. J. (2019). Prevention and relaxation effects of Liriope platyphylla on bronchial asthma in vitro model by suppressing the activities of mapk/NF-κB pathway. *Molecular & Cellular Toxicology, 15*, 325-334.

Park, S. H., Kim, E. H., Park, S. K., Jang, M. H., ... & Lee, E. Y. (2005). Effects of Liriope platyphylla

on LPS-stimulated expression of Cox-2 and iNOS in mouse BV2 microglial cells. *Journal of Acupuncture Research, 22(2)*, 147-154.

Park, S. B., Song, H. M., Kim, H. N., Park, G. H., ... & Jeong, J. B. (2018). Anti-inflammatory effect of Biji (Soybean curd residue) on LPS-stimulated RAW264. 7 cells. *Korean Journal of Plant Resources, 31(2)*, 117-123.

Snyder, S. H., & Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. Scientific American, 266(5), 68-77.

Wautier, J. L., & Wautier, M. P. (2023). Pro-and anti-inflammatory prostaglandins and cytokines in humans: a mini review. *International Journal of Molecular Sciences, 24(11)*, 9647.

Received 08 November 2024;
Accepted 28 November 2024