

RAW264.7 세포에서 Heme Oxygenase-1 발현을 통한 파프리카 열매와 잎의 항염증 효과

최은영¹ · 김은숙² · 이영은^{1,2}

¹원광대학교 식품영양학과

²원광대학교 원광식품산업연구원

Anti-Inflammatory Effects of Paprika Fruit and Leaf through Heme Oxygenase-1 Induction in RAW264.7 Macrophages

Eun-Young Choi¹, Eun-Sook Kim², and Young-Eun Lee^{1,2}

¹Department of Food and Nutrition and

²Wonkwang Research Institute for Food Industry, Wonkwang University

ABSTRACT The antioxidant and anti-inflammatory effects of paprika were investigated by analyzing, a 70% ethanol (EtOH) extract of red, orange, and yellow paprika fruits and leaf that was sequentially fractionated into hexane, chloroform (CHCl₃), and ethyl acetate (EtOAc) fractions. The anti-oxidant and anti-inflammatory effects were in the order of EtOAc > CHCl₃ > 70% EtOH > hexane, and red > orange > yellow fruits; the effects of the leaf was as high as that of red fruit. No cytotoxicity was observed at levels under 100 µg/mL. Therefore, further anti-inflammatory experiments using RT-PCR and western blot analysis were conducted using red paprika and leaf EtOAc fractions under 100 µg/mL. The red paprika and leaf EtOAc fractions suppressed the expression of proteins, such as inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 and the expression of inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor-α and interleukin-6, and increased the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in a dose-dependent manner in a macrophage RAW264.7 stimulated by lipopolysaccharide using RT-PCR. According to western blot analysis, the expression of HO-1 was observed in a dose-dependent and time-dependent manner, which confirmed the anti-inflammatory effects of HO-1. Overall, the EtOAc fractions of red paprika fruit and leaf had anti-inflammatory and cytoprotective effects through the expression of HO-1 in a RAW264.7 cell. Moreover, they might be used as health food ingredients to prevent chronic diseases according to the inflammatory response.

Key words: paprika fruit, paprika leaf, anti-inflammatory, heme oxygenase-1

서 론

파프리카는 품종에 따라 색상, 모양, 크기, 맛, 매운 정도가 다르며, 식품뿐만 아니라 제약 및 화장품 산업에서도 활용되고 있다. 파프리카는 chlorophyll, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, β-cryptoxanthin 및 β-carotene 등 20개 이상의 색소를 함유하고 있으며(Lee, 2001), β-carotene은 눈 건강 및 암예방 효과(Colditz, 1987), lutein과 zeaxanthin에 의한 노인성 황반 변증과 초기 동맥경화 예방 효과(Seddon 등, 1994), capsanthin에 의한 동맥경화 및 심장질환의 위험 감소 효과(Aizawa와 Inakuma, 2009) 등이 보고되고 있다.

염증은 외부 자극에 대한 생체 조직의 방어반응으로 손상된 조직을 재생하려는 과정에서 nitric oxide(NO), prostaglandin(PG)E₂, tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin(IL)-1β, IL-6 등 염증매개체들을 방출한다(Lee 등, 2000; Higuchi 등, 1990). 그러나 매개 인자의 과도한 생산은 점막 손상을 촉진하고 일부는 동맥경화, 당뇨병, 관절염 및 암과 같은 각종 만성 염증성 질환을 유도한다(Choi와 Lee, 1976).

Heme oxygenase(HO)는 heme을 분해하는 효소로서(Maines, 1997) HO-1에 의해 생성된 일산화탄소와 bilirubin은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase(COX)-2의 발현 및 NO의 생성을 억제하며 bilirubin은 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 IL-1β의 생성을 억제시켜 염증반응을 예방한다고 알려져 있다(Ryter 등, 2002). 특히 lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 RAW264.7 대식세포에서 HO-1은 NO의 생성과 iNOS 유전자 발현을 억제함으로써 염증반응을 차단하는 것으로

Received 19 May 2020; Accepted 10 June 2020

Corresponding author: Young-Eun Lee, Department of Food and Nutrition, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 54538, Korea
E-mail: yelee@wku.ac.kr, Phone: +82-63-850-6896

Author information: Eun-Young Choi (Graduate student), Eun-Sook Kim (Researcher), Young-Eun Lee (Professor)

알려져 있다(Schipper, 2000).

따라서 본 연구는 파프리카 열매 및 잎 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 염증반응을 매개하는 NO 생성과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 대한 영향을 알아보고 HO-1 발현을 통한 항염증 효과를 조사한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약 및 세포주

용매 추출분획에 사용된 ethanol, hexane, chloroform, ethyl acetate는 SK Chemicals(Gyeonggi, Korea)의 LP Grade를 사용하였고 L-ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine, sulfanilamide, phosphoric acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), LPS, NaNO₂ 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Phosphate buffered saline(PBS), RPMI medium 1640, fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic, diethyl pyrocarbonate water(DEPC)는 Gibco(New York, NY, USA) 제품을, TRIzol[®] reagent는 Ambion(Texas, TX, USA) 제품을, Transcriptor First stand cDNA synthesis[®] kit은 Roche(Berlin, Germany) 제품을, western blot에 사용된 HO-1의 1차 항체와 이에 결합하는 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Mouse의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였고, RPMI 1640 배지에 10% inactivated FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

시료 추출 및 분획

전북 익산에서 재배된 파프리카(*Capsicum annuum* L.) 열매와 잎을 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 동결 건조된 적색, 주황색, 노란색 파프리카 열매와 잎을 각각 20배(w/v)의 70% 에탄올로 상온에서 24시간 추출한 후 유기 용매의

극성 정도에 따라 hexane, chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc), distilled water(DW) 등의 순서로 순차 분획하고 불순물을 제거하기 위해 Whatman No. 5(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과 후 감압 농축하여 시료를 얻었으며, 수율은 Table 1과 같다. 시료는 -20°C에서 냉동 보관하며 사용하였고, DMSO에 녹인 후 0.20 µm의 filter 장치(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 실험에 사용하였다.

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Faller와 Fialho(2010)의 방법을 이용하여 측정하였다. DPPH는 80% MeOH에 100 µM로 용해하여 파프리카 열매 및 잎의 에탄올 추출물과 분획별 시료 0.3 mL와 100 µM DPPH 11.7 mL를 혼합한 후 15분간 방치하고 ELISA reader(BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정한다 다음 아래 계산식을 이용해 DPPH 라디칼 소거 활성(scavenging activity)을 계산하였다. 1 M ascorbic acid를 대조구로 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Blank (Abs)} - \text{Sample (Abs)}}{\text{Blank (Abs)}} \times 100$$

ABTS 라디칼 소거 활성은 Re 등(1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. ABTS 용액은 5 mM의 phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 7 mM의 ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.45 mM이 되게 용해시킨 후 암실에서 16시간 동안 반응시켜 738 nm에서 흡광도 값이 약 0.70(±0.02)이 되도록 증류수로 조정하여 ABTS 용액을 만들었다. 파프리카 열매와 잎의 에탄올 추출물 및 분획별 시료 0.5 mL와 ABTS 용액 5 mL를 혼합하여 정확하게 5분 후에 738 nm에서 흡광도를 측정한다 다음 소거 활성을 계산하였다. 1 M ascorbic acid를 대조구로 사용하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Blank (Abs)} - \text{Sample (Abs)}}{\text{Blank (Abs)}} \times 100$$

세포 생존율

세포독성 여부를 확인하기 위해 RAW264.7 대식 세포로 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포수를 각각 5×10⁵ cell/well이 되도록 24-well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 20, 50, 100, 200 µg/mL 농도의 시료가 첨가된 배양액에서 24시간 배양한 다음 MTT 시약(1 mg/mL)으로 처리한 후 형성된 formazan을 DMSO로 용해한 뒤 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성량 측정

배양된 세포를 5×10⁵ cells/well 수준으로 24-well plate

Table 1. Yield (%) of 70% ethanol extract and serial solvent fractions of paprika fruits and leaf ethanol extract

Extract & fractions	Paprika fruit			Paprika leaf (PL)
	Red (RP)	Orange (OP)	Yellow (YP)	
70% EtOH extract	68.00	73.51	52.24	35.44
Hexane fraction	0.66	0.57	0.85	5.37
CHCl ₃ fraction	1.09	0.69	1.48	0.73
EtOAc fraction	1.01	0.79	1.32	0.69
DW fraction	67.33	62.96	87.97	58.14

Table 2. PCR primer sets used in the experiment

Primer		Sequence (5'→3')
COX-2	Forward	GGA GAG ATC ATC AAG ATA GT
	Reverse	ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA
HO-1	Forward	CAC GCA TAT ACC CGC TAC CT
	Reverse	CCA GAG TGT TCA TTC GAG CA
IL-6	Forward	GAG GAT ACC CCC AAC AGA
	Reverse	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
INOS	Forward	AGA CTG GAT TTG GCT GGT CCC TCC
	Reverse	AGA ACT GAG GGT ACA TGC TGG AGC
TNF- α	Forward	GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C
	Reverse	ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G
GAPDH	Forward	CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA
	Reverse	TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC

에 1 mL씩 배양한 후 EtOAc 분획물 시료를 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하고 여기에 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO의 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액과 Griess 시약을 혼합하여 96-well plate에 5~10분간 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO 양은 NaNO_2 를 표준물질로 비교하였다.

mRNA 분리

RAW264.7 세포를 5×10^5 cells/well로 분주하고 6시간 배양 후 EtOAc 분획물 시료를 농도별(20, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ 를 넣어 24시간 배양한 다음 Easy Blue(iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 mRNA로 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하고, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다. 사용한 primer 염기 서열은 아래 Table 2와 같다.

Western blot 분석

RAW264.7 세포를 5×10^5 cells/mL로 12시간 배양 후 EtOAc 분획물 시료를 농도별(20, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하고 1시간 뒤에 LPS(50 $\mu\text{g/mL}$)로 자극하였다. PBS로 3회 세척한 후 원심분리(5,000 rpm, 5분) 하여 그 상층액을 버리고 세포 pellet을 수거하였다. Lysis buffer를 넣어 단백질을 용해시킨 후 5,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동 한 후 nitrocellulose(NC) membrane(Schleicher and Schuell Inc., Keene, NH, USA)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% skim milk로 1시간 blocking 한 후 HO-1 antibody를 1:1,000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T(TBS+0.05% Tween 20) 용액으로

3회 15분씩 세척하고, 다시 2차 antibody를 1:1,000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, TBS-T로 3회 15분씩 세척한 뒤 ECL 용액을 1:1로 잘 섞어 반응시킨 후 단백질 발현량을 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하였고 실험값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계분석은 SPSS(Statistical Package for Social Science, Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 ANOVA test를 실시한 후, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

결과 및 고찰

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

파프리카 열매와 잎 70% EtOH 추출물과 각 분획물 시료가 DPPH 라디칼 소거 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 항산화제인 ascorbic acid와 비교하였다. 그 결과 모든 분획에서 항산화 활성은 적색 파프리카 열매와 잎의 소거 활성이 가장 높은 편이었다. Fig. 1과 같이 분획별로 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 21~83%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였으며, EtOAc 분획물에서 가장 높은 활성을 보였다. Ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거 활성을 100%로 보았을 때 EtOAc 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 잎 > 적색 > 주황색 > 노란색 순으로 각각 83, 78, 73, 72%를 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성은 ascorbic acid와 비교하여 분획별로 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 10~67%의 소거 활성을 보였으며, EtOAc 분획물에서 적색 > 잎 > 주황색 > 노란색 순으로 각각 67, 65, 62, 60%의 라디칼 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

DPPH와 ABTS 라디칼 소거능이 가장 우수한 분획 용매는 EtOAc로 이는 수용성 물질보다는 카로티노이드와 cap-santhin을 포함한 지용성 물질의 항산화 활성이 더 높은 것에 기인하는 것으로 생각된다. 이는 Bae와 Bae(2012)의 다

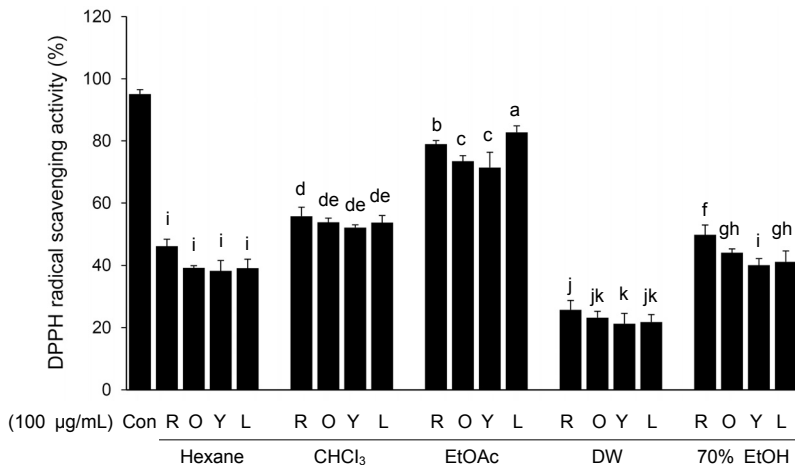


Fig. 1. Effects of paprika fruit and leaf on DPPH radical scavenging activity. Ascorbic acid was served as positive control. Means with different letters (a-k) above the bars are significantly different ($P < 0.05$). Con, ascorbic acid; R, red paprika fruit; O, orange paprika fruit; Y, yellow paprika fruit; L, paprika leaf. Hexane, hexane fraction; CHCl₃, chloroform fraction; EtOAc, ethyl acetate fraction; DW, distilled water fraction; 70% EtOH, 70% ethanol extract.

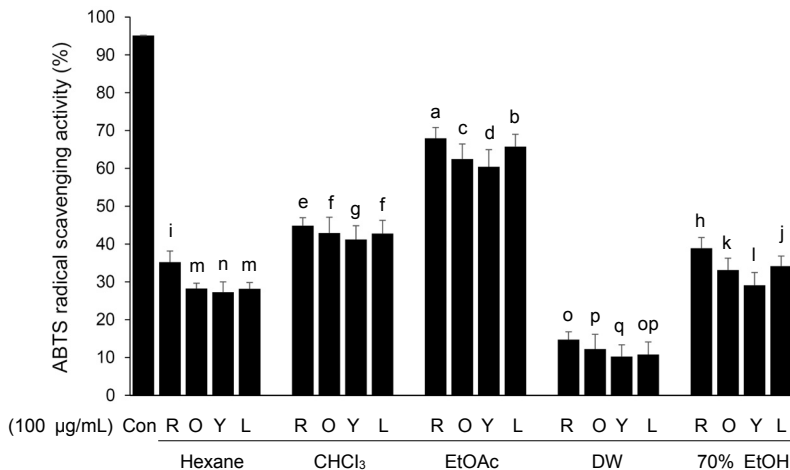


Fig. 2. Effects of paprika fruits and leaf on ABTS radical scavenging activity. Ascorbic acid was served as positive control. Means with different letters (a-q) above the bars are significantly different ($P < 0.05$). Con, ascorbic acid; R, red paprika fruit; O, orange paprika fruit; Y, yellow paprika fruit; L, paprika leaf. Hexane, hexane fraction; CHCl₃, chloroform fraction; EtOAc, ethyl acetate fraction; DW, distilled water fraction; 70% EtOH, 70% ethanol extract.

양한 극성의 용매에 따라서 항산화 활성을 평가한 실험에서 극성이 낮을수록 DPPH 라디칼에 대한 소거능이 증가한다고 보고된 것과 유사하였다.

Kim 등(2011a)의 연구에서는 파프리카의 색상별 항산화 성분 분석 결과 적색의 총 carotenoids의 함량과 L-ascorbic acid 함량은 다른 색상보다 유의하게 높았다고 보고하였으며, 적색과의 우수한 항산화 활성은 여러 phytochemical 중 L-ascorbic acid와의 관련성이 높다고 밝힌 바 있다. 그러나 농촌진흥청 식품영양·기능성 정보(National Institute of Agricultural Sciences, 2019)에 의하면 색상별 비타민 C의 함량은 오히려 적색(91.75 mg/100 g)에 비해 주황색(116.29 mg/100 g)과 노란색(110.60 mg/100 g)이 더 높다고 하였으며, β -carotene 함량은 적색(338 μ g/100 g), 주황색(271 μ g/100 g), 노란색(147 μ g/100 g) 순이었으며, 라이코펜 함량도 적색(484 μ g/100 g)이 가장 높아 오히려 적색과의 높은 항산화 활성은 수용성인 비타민 C보다는 지용성인 carotenoid 성분과 관련이 높을 것으로 생각된다. Hwang 등(2015)의 연구에서도 carotenoid 함량은 적색 파프리카의 neoxanthin, capsorubin, capsanthin, β -carotene의 함량이 다른 색의 파프리카에 비해 매우 높았고 그다음으로

주황색, 초록색, 노란색 순으로 함량이 높은 것으로 보고하였다. Matsufuji 등(1998)의 연구에 의하면 적색을 나타내는 carotenoid인 capsanthin이 β -carotene, lutein, zeaxanthin처럼 과산화물 생성을 억제한다고 하였으며, 다른 carotenoids보다 비교적 천천히 분해되어 라디칼 소거 효과를 더 길게 나타냄으로써 좋은 항산화 물질로 보고하였다. 파프리카 잎에 대한 성분 분석 자료는 거의 없으나, 파프리카 잎과 유사한 고춧잎의 비타민 C와 β -carotene 함량은 각각 24.03 mg/100 g, 5,203 μ g/100 g이었으며 고춧잎의 43.95 mg/100 g과 458 μ g/100 g에 비해 잎의 β -carotene 함량이 매우 높은 것으로 보아 파프리카 잎의 높은 항산화 활성도는 높은 β -carotene 함량에 기인한 것으로 생각된다.

분획 및 파프리카 열매의 색상과 부위별로 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 비교해본 결과, 적색 파프리카 열매와 잎의 EtOAc 분획물이 가장 높은 항산화 활성을 나타내어 항염증 활성은 이들 분획물에 대해 검증하였다.

RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향

파프리카 열매 및 잎 분획물의 세포독성은 대식세포주인

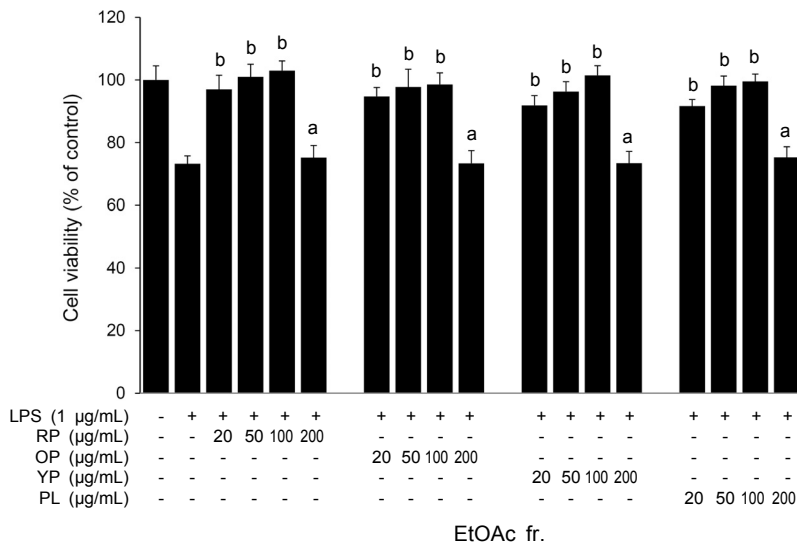


Fig. 3. Effects of ethyl acetate fractions extracted from paprika fruits and leaf on cell viability of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated for 24 hours in the presence or absence of solvent fractions at indicated dose. MTT assay was carried out as mentioned in Materials and Methods. Data mean±SE of three experiments performed in triplicate. Means with different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P < 0.05$). LPS, lipopolysaccharide; RP, red paprika fruit; OP, orange paprika fruit; YP, yellow paprika fruit; PL, paprika leaf.

RAW264.7 세포에 EtOAc 분획별 시료를 20, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 24시간 처리한 후 MTT 분석방법으로 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 EtOAc 분획물에 의한 세포 생존율은 200 µg/mL 농도에서 75%의 생존율을 보였고, 100 µg/mL 이하 농도에서는 분획별, 색상별로 91% 이상의 생존율이 나타나 세포독성을 보이지 않았다. 이상의 결과에 의거 세포독성이 전혀 나타나지 않은 100 µg/mL 이하 농도에서 실험을 진행하였다.

RAW264.7 세포에서 NO 생성 억제 효과

NO는 외부상처에 대한 반응 및 염증 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokine인 IL-1이나 TNF- α 등에 유도된 iNOS에 의하여 생성된다. 이 NO는 병리적인 혈관 확장, 세포독성, 조직 손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다(Park과 Yang, 2008). 특히 염증 상태에서 생성된 NO는 혈관투과성 및 부종 등의 염증반응을 촉진하는 것으로

알려져 있다(Aeberhard 등, 1995). 대식세포는 동물 체내 모든 조직에 분포하며 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로서, 외부로부터 침입하는 이물질이나 세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 식균작용 및 다양한 염증매개 물질들을 분비하여 초기 염증반응에서 중요한 역할을 한다(Kaul과 Kapoor, 1989). RAW264.7 세포에서 EtOAc 분획물의 NO 생성량을 측정한 결과 Fig. 4와 같이 적색>주황색>노란색>흰 순으로 LPS에 의해서 유도된 NO 생성량을 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다($P < 0.05$). 식물성 재료의 용매 분획물에 대한 항염증 활성 중 EtOAc 분획물이 NO 생성 억제 효과가 높다고 보고된 바가 많다(Park과 Yang, 2008; Choi와 Lee, 1976; Byun, 2012). 일반적으로 EtOAc 분획물에서 검출되는 폴리페놀성 물질이나 플라보노이드 물질이 항산화 및 항염증 활성에 관여한다고 보고된 바 있다(Cha 등, 1999; Lu와 Foo, 2000; Tsao, 2010). 본 연구에서 다른 색에 비해 적색 EtOAc 분획물이 NO 생성

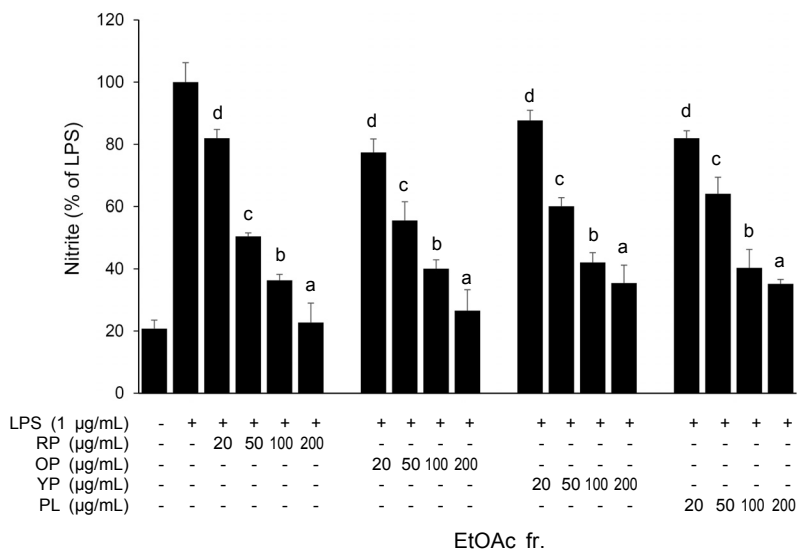


Fig. 4. Effects of paprika fruits and leaf ethyl acetate fractions on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were preincubated for 1 hour with medium or paprika fruits and leaf at indicated doses, and then stimulated with 1 µg/mL for 24 hours. NO production from cells was measured by the method of Griess. Values are shown as mean±SE of 3 replicates. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$). LPS, lipopolysaccharide; RP, red paprika fruit; OP, orange paprika fruit; YP, yellow paprika fruit; PL, paprika leaf.

억제 효과가 가장 높게 나온 것을 볼 수 있는데, Kim 등 (2011a)의 실험 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

RAW264.7 세포에서 COX-2 및 iNOS 발현에 미치는 영향

COX-2와 iNOS는 다양한 조직에서 발현되고 항염증 효능에서 주목받는 효소 단백질로 감염원의 자극에 의해 COX-2와 iNOS의 발현이 빠르게 증가하여 다량의 염증성 물질을 생성한다. COX-2는 cyclooxygenase와 peroxidase 활성을 모두 가지고 있는 효소로 급성염증반응에서 prostaglandins의 합성에 관여하며 LPS 및 cytokine에 의해 발현이 유도된다(Turini, 2002; Needleman과 Isakson, 1997). 파프리카 열매 및 잎의 용매 분획물 중 NO 생성 저해 활성이 가장 높았던 적색 파프리카 열매의 EtOAc 분획물(RP)과 파프리카 잎의 EtOAc 분획물(PL)로 iNOS와 COX-2 발현을 측정하였다. RAW264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)를 처리한 후 시료별 20, 100 µg/mL 농도로 처리하여 측정한 결과(Fig. 5), RP와 PL은 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 COX-2 발현과 iNOS 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 잎 추출물의 항염증 효과에 대한 Jeong 등(2012)의 연구에 의하면 250, 500 µg/mL 농도에서 처리한 결과 비교적 낮은 농도에서도 COX-2 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Sung 등(2011)의 연구에서는 개망초(*Eriogon annuus* L.) 꽃 메탄을 추출물을 처리한 결과 LPS 처리에 의해 증가한 iNOS 단백질 발현이 100, 200 µg/mL로 처리하였을 때 감소하였고, 200 µg/mL를 처리하였을 때 iNOS 단백질 발현은 LPS를 처리하지 않은 상태와 비슷한 수준으로 감소하였다고 보고하였다. 이러한 결과를 본 실험과 비교하였을 때 100 µg/mL 농도에서 iNOS 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과 염증반응 시 RP와 PL은 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 감소시켜 NO 및 PGE2 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

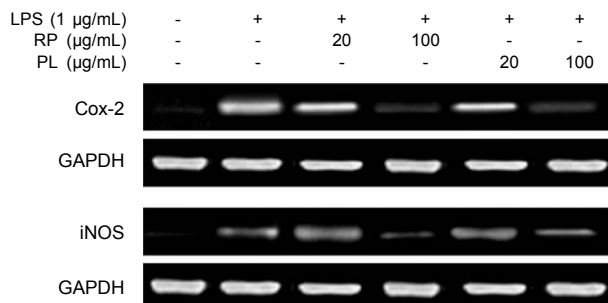


Fig. 5. Effects of paprika fruits and leaf for ethyl acetate fractions on the expression of protein COX-2 and iNOS in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. RT-PCR analysis for COX-2 and iNOS mRNA expression and COX-2, iNOS secretion were carried out as mentioned in Materials and Methods. LPS, lipopolysaccharide; RP, red paprika fruit; PL, paprika leaf; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

RAW264.7 세포에서 TNF-α 및 IL-6 발현에 미치는 영향

염증성 cytokine은 면역세포의 염증 부위로 이동 및 면역세포를 활성화해 면역기능을 증가시킴으로써 효과적인 면역반응을 유도한다. 대식세포에서 다량으로 분비되는 cytokine에는 TNF-α, IL-6, IL-1β 등이 있다. TNF-α는 체내에서 림프구 및 대식세포 등 백혈구에 의해 생성되는 cytokine으로 LPS 등에 의해 활성화된 대식세포의 자극으로 만들어지며 정상 상태에서는 분비되지 않으며(Lin, 1994), 만성 또는 급성 염증 질환의 발생 및 진행과 관련되어 있다(Lee 등, 2003; Tracey 등, 1988). 또한 IL-6는 초기 면역반응에서 중요한 역할을 하며 체내에서 과잉 생산될 경우 감염성 질환이나 악성 종양 및 자가 면역질환 등을 유발함에 따라 다양한 염증성 질환에서 IL-6 분비량이 항상 증가하는 것으로 보고되어 있으며 T세포, B세포의 기능조절에 중요한 역할을 한다(Delgado 등, 2003; Chae 등, 2007). 그러나 어떤 원인에 의해서 감염원이 제거된 후에도 계속해서 이들 cytokine이 분비된다면 만성 염증질환이 발생할 수 있다. 따라서 RP와 PL의 염증 유발 원인이 되는 TNF-α와 IL-6의 생성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW264.7 대식세포에서 LPS의 자극에 의해 분비되는 TNF-α와 IL-6의 양을 측정하였다. 실험 결과(Fig. 6) RP와 PL 모두 TNF-α와 IL-6 발현을 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과 RP와 PL은 염증성 cytokine인 TNF-α 및 IL-6 분비량 감소에 있어서 효과적인 것으로 생각된다.

RAW264.7 세포에서 HO-1 발현에 미치는 영향

HO-1은 heme을 분해하여 biliverdin, free iron, CO 등을 생성하는 데 관여하는 속도 조절 효소로서 산화적 손상으로부터 세포 내 지질 및 단백질을 보호하는 방어 기작의 하나로 세포손상 및 사멸 억제, 항산화 작용 및 염증반응을 약화시킨다(Li 등, 2003). HO는 HO-1, HO-2 및 HO-3의 세 가지 isozyme이 존재하는데, HO-2와 HO-3는 구성형 효소로 HO-2는 자극에 상관없이 발현된다(Kim 등, 2011b).

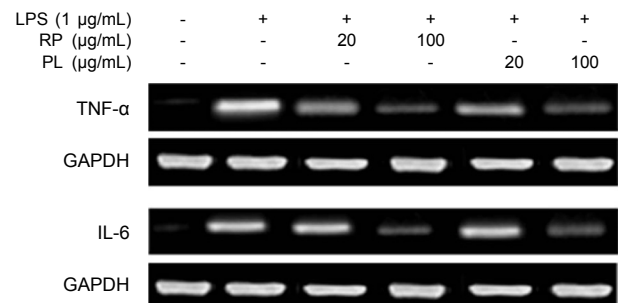


Fig. 6. Effects of paprika fruits and leaf for ethyl acetate fractions on the expression of protein TNF-α and IL-6 in RAW264.7 cells stimulated with LPS. RT-PCR analysis for TNF-α, IL-6 mRNA expression and TNF-α, IL-6 secretion were carried out as mentioned in Materials and Methods. LPS, lipopolysaccharide; RP, red paprika fruit; PL, paprika leaf; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

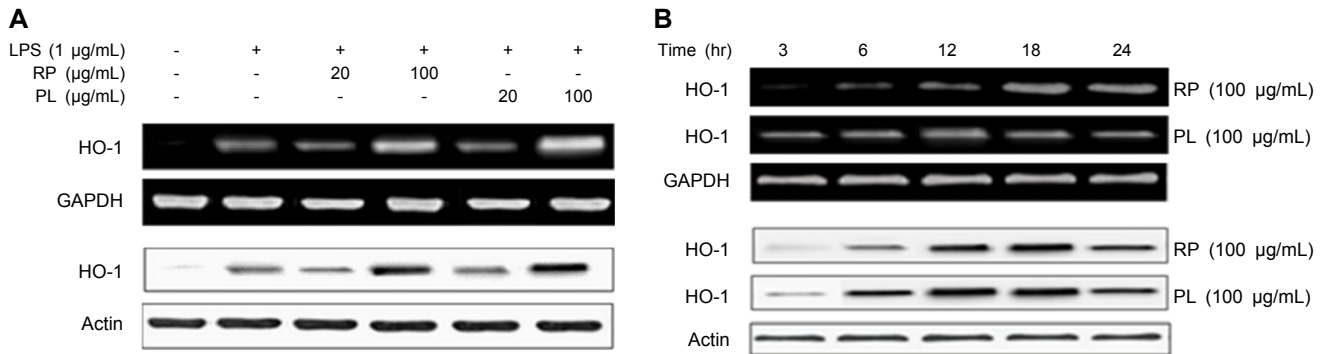


Fig. 7. Effects of paprika fruits and leaf for ethyl acetate fractions on the expression in RAW264.7 macrophages. Cells were treated with the indicated concentration of PRE and PLE for 24 h. (A) Time dependent induction of HO-1 protein by RP and PL. Cells were pretreated RP and PL (100 µg/mL) for the indicated periods (3, 6, 12, 18, 24 h). (B) The induction of HO-1 protein by RP and PL in cells were analyzed by RT-PCR and western blotting. LPS, lipopolysaccharide; RP, red paprika fruit; PL, paprika leaf; HO-1, heme oxygenase-1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

만면 HO-1은 heat shock protein계의 한 종류로 LPS, 과산화수소, 저산소증 등과 같은 다양한 스트레스 자극에 의해 발현되어 산화적 스트레스로부터 생체를 방어하는 기능을 가진다(Kikuchi 등, 2005).

실험 결과 Fig. 7과 같이 RP와 PL을 20, 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 HO-1의 발현을 유도하였다. 배암차즈기 잎 추출물 500 µg/mL 농도에서 HO-1의 발현량을 1.8배 유의적으로 증가시켰다는 Jeong 등(2012)의 연구와 100, 250, 500 µg/mL 농도의 국내산 삼채 에탄올 추출물이 HO-1의 발현을 농도 의존적으로 유도하였다는 Bae와 Bae(2012)의 연구 결과와 비교하면 파프리카 적색 열매와 잎의 EtOAc 분획물은 비교적 낮은 농도에서 HO-1이 발현됨을 알 수 있었다. 또한 100 µg/mL 농도를 시간별로 처리한 결과 RP는 처리 6시간부터 HO-1이 발현되기 시작하여 12시간, 18시간까지 점차 증가하였으며, 18시간 이후 다소 감소하였다. PL은 처리 3시간부터 점차 나타나기 시작하여 6시간 이후 증가하다가 18시간 이후 다소 감소하였다. 본 연구에서는 LPS로 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 RP와 PL은 염증을 유발하는 중요 인자인 NO를 저해하였고, iNOS, COX-2, TNF-α 및 IL-6 등의 발현을 억제했으며, 산화적 손상으로부터 세포 보호 방어 기작에 관여하는 HO-1 발현을 통해 항염증 효과를 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 파프리카 열매와 잎의 70% 에탄올 추출물을 이용하여 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 용매로 순차분획을 실시하고 각각의 분획물을 이용하여 항산화 및 항염증 효과를 조사하였다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 이용하여 적색, 주황색, 노란색 파프리카 열매와 잎의 에탄올 추출물과 순차분획물의 항산화 활성을 스크리닝한 결과, 에틸아세테이트 분획물의 항산화 활성이 가장 우수한 것으로

나타났으며, 이는 카로티노이드 성분과 같은 지용성 물질과 깊은 관련이 있을 것으로 생각되었다. 이에 색상별 파프리카 열매와 잎의 에틸아세테이트 분획물을 20~200 µg/mL 농도로 처리하여 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 대해 MTT assay를 수행하여 세포 생존율을 확인한 결과, 200 µg/mL 농도에서는 75%의 생존율을 보였고, 100 µg/mL 이하 농도에서는 91% 이상의 생존율을 보여 세포독성을 보이지 않았다. 또한 RAW264.7 세포에서 NO 생성량을 측정된 결과 적색 > 주황색 > 노란색 > 잎 순으로 LPS에 의해 유도된 NO 생성량을 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다. 이상의 결과에 의거 NO 생성 저해 활성이 가장 높았던 적색 열매와 항산화 활성이 가장 높았던 잎의 에틸아세테이트 분획물로 RT-PCR과 western blot 분석을 수행하였다. RAW264.7 세포에 과량의 LPS를 처리하여 과다 면역반응 상태를 만들고 항염증 효과를 조사한 결과, RP와 PL은 RAW264.7 세포에서 염증성 효소인 iNOS와 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며, TNF-α와 IL-6 mRNA 발현을 감소시켰다. 또한 RP와 PL을 20, 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 HO-1의 발현을 유도함으로써 iNOS의 발현을 억제하고 NO 생성을 감소시킬 수 있다. 따라서 RP와 PL은 대식세포 활성을 억제해 과다 염증반응을 감소시키는 항염증 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 파프리카 적색 열매와 잎은 염증 억제에 효과적인 물질로 확인되었으며, 만성 염증에 의해 발병할 수 있는 비만, 아토피나 알레르기 등과 같은 만성질환을 예방할 수 있는 건강식품 소재로서 적극 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2018학년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Aeberhard EE, Henderson SA, Arabolos NS, Griscavage JM, Castro FE, Barrett CT, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995. 208:1053-1059.
- Aizawa K, Inakuma T. Dietary capsanthin, the main carotenoid in paprika (*Capsicum annuum*), alters plasma high-density lipoprotein-cholesterol levels and hepatic gene expression in rats. *Br J Nutr*. 2009. 102:1760-1766.
- Bae GC, Bae DY. The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium hookeri* cultivated in South Korea. *Kor J Herbol*. 2012. 27:55-61.
- Byun MW. Anti-inflammatory activity of austroinulin from *Stevia rebaudiana* in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012. 41:456-461.
- Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1999. 28:1310-1315.
- Chae SY, Kim MJ, Kim DS, Park JE, Jo SK, Yee ST. Effect of *Asterina pectinifera* extraction on the activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2007. 36:269-275.
- Choi SY, Lee HR. Host preference by the small brown planthopper and green rice leafhopper on barley and water foxtail (I). *Kor J Pl Prot*. 1976. 15:179-181.
- Colditz GA. β -Carotene and cancer. In: Quebdeaux B, Bliss FA, editors. *Horticulture and Human Health: Contributions of Fruits and Vegetables*. American Society for Horticultural Science Symposium Series No. 1. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA. 1987. p 150-159.
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 2003. 37:355-361.
- Faller ALK, Fialho E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *J Food Compos Anal*. 2010. 23:561-568.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol*. 1990. 144:1425-1431.
- Hwang JR, Hwang IK, Kim S. Quantitative analysis of various carotenoids from different colored paprika using UPLC. *Korean J Food Sci Technol*. 2015. 47:1-5.
- Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012. 41:888-894.
- Kaul S, Kapoor NK. Reversal of changes of lipid peroxide, xanthine oxidase and superoxide dismutase by cardio-protective drugs in isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. *Indian J Exp Biol*. 1989. 27:625-627.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. 338:558-567.
- Kim JS, Ahn J, Ha TY, Rhee HC, Kim S. Comparison of phytochemical and antioxidant activities in different color stages and varieties of paprika harvested in Korea. *Korean J Food Sci Technol*. 2011a. 43:564-569.
- Kim YH, Lee MJ, Lee HS, Kim JG, Park WH. Suppressive effect of *Euryale ferox* Salisbury extracts on inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells through the antioxidant mechanism. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2011b. 25:202-211.
- 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 B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol*. 2003. 139:11-20.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two β -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*. 2000. 406:301-309.
- Lee JW. Present condition of paprika cultivation and its prospects for export. *Kor Res Soc Protected Hort*. 2001. 14(2):36-41.
- Li L, Grenard P, Van Nhieu JT, Julien B, Mallat A, Habib A, et al. Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology*. 2003. 125:460-469.
- Lin RIS. Phytochemicals and antioxidants. In: Goldberg I, editor. *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Chapman & Hall, New York, NY, USA. 1994. p 393-449.
- Lu Y, Foo LY. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem*. 2000. 68:81-85.
- Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997. 37:517-554.
- Matsufuji H, Nakamura H, Chino M, Takeda M. Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J Agric Food Chem*. 1998. 46:3468-3472.
- National Institute of Agricultural Sciences. 9th Revision Korean Standard Food Composition Table. 2018 [cited 2019 Sep 18]. Available from: <http://koreanfood.rda.go.kr/kfi/fct/fctCompSrch/list>
- Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl*. 1997. 49:6-8.
- Park EY, Yang KS. Inhibition of nitric oxide production by the extracts of *Hibiscus manihot*. *Yakhak Hoeji*. 2008. 52:259-263.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activities applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999. 26:1231-1237.
- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AMK. Heme oxygenase, carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem*. 2002. 234-235:249-263.
- Schipper HM. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp Gerontol*. 2000. 35:821-830.
- Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *J Am Med Assoc*. 1994. 272:1413-1420.
- Sung M, Kim Y, Choi Y, Ham H, Jeong HS, Lee J. Anti-inflammatory effect of *Erigeron annuus* L. flower extract through heme oxygenase-1 induction in RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011. 40:1507-1511.
- Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, et al. Cachectin, tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J Exp Med*. 1988. 167:1211-1227.
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010. 2:1231-1246.
- Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002. 53:35-57.