



우산이끼 에탄올 추출물의 생리활성

임은영^{1†} · 최형순²

Assessment on the Biological Activities of Ethanol Extract from *Marchantia polymorpha* L.

Eun Young Yim^{1†} and Hyung Soon Choi²

ABSTRACT

Received: 2020 September 29
1st Revised: 2020 November 4
2nd Revised: 2021 March 22
3rd Revised: 2021 June 7
Accepted: 2021 June 7

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: Bryophytes are a group of three non-vascular land plant divisions, consisting of approximately 18,000 species known globally. These species are divided into mosses (Bryophyta), liverworts (Marchantiophyta) and hornworts (Anthocerotophyta). Approximately 900 species of bryophytes have been recorded in Korea. However, only a small number of researchers have discovered new taxa and conducted taxonomic review. Therefore, Bryophytes are still considered an unexplored field and are difficult to use as a resource. We describes a preliminary evaluation of the biological activity on *Marchantia polymorpha* L., a common liverwort species.

Methods and Results: Studies on the anti-inflammatory effect were conducted to screen for biological activity. *M. polymorpha* was extracted using 70% ethanol (MPE). We examined the inhibitory effects of MPE on the production of pro-inflammatory factors [e. g., interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), nitricoxide (NO), and prostaglandin E₂ (PGE₂)] in murine macrophage cell-line RAW 264.7 activated with LPS (lipopolysaccharide). MPE decreased the production of NO and PGE₂. Additionally, MPE inhibited the production of pro-inflammatory cytokines (e. g., IL-1 β , IL-6, and TNF- α).

Conclusions: These results suggest that MPE has significant effects on pro-inflammatory factors and that *M. polymorpha* is a possible anti-inflammatory therapeutic plant.

Key Words: Anti-inflammatory, Biological Activity, *Marchantia polymorpha* L., Marchantiophyta

서 언

선대식물 (Bryophytes)은 이끼라 일컬어지기도 하며, 관속조직이 발달하지 않은 육상식물로 (Simpson, 2018), 선류식물문 (Bryophyta, Mosses), 태류식물문 (Marchantiophyta, Liverworts), 각태류식물문 (Anthocerotophyta, Hornworts) 등 3 개의 문으로 나뉜다 (Goffinet and Shaw, 2009). 전 세계적으로는 약 18,000 분류군이 분포하는 것으로 알려져 있으며 (Goffinet and Shaw, 2009), 한반도에는 선류 50 과 194 속 622 분류군, 태류 41 과 84 속 277 분류군, 뿔이끼류 2 과 3 속 4 분류군으로 총 93 과 281 속 903 분류군이 분포하는 것으로

보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 2013).

한편 생물다양성협약이 발효되어 생물다양성의 보전, 그 구성요소의 지속가능한 이용, 유전자원의 이용으로부터 발생하는 이익의 공정하고 공평한 공유가 강조되고 있다. 또한 산림 자원의 조성 및 관리에 관한 법률에서 이끼 (선대식물) 역시 산림자원으로 정의되고 있는 등 관속식물과 마찬가지로 국가의 중요한 유전자원이다 (KMGL, 2020).

국내외의 사례 및 최근의 연구 결과를 보면 선대식물에서 추출된 수많은 유기화합물들은 다양한 기능성을 나타내 생약 재료로서 경제적 부가가치가 매우 높은 것으로 평가되고 있다. 그러나 자원식물로서 잠재적 가치가 높음에도 한반도 선대식

[†]Corresponding author: (Phone) +82-64-730-7292 (E-mail) curie580@korea.kr

¹국립산림과학원 난대·아열대산림연구소 임업연구사 / Researcher, Warm Temperate and Subtropical Forest Research Center, National Institute of Forest Science, Seogwipo 63582, Korea.

²국립산림과학원 난대·아열대산림연구소 임업연구관 / Researcher, Warm Temperate and Subtropical Forest Research Center, National Institute of Forest Science, Seogwipo 63582, Korea.

물 분야는 연구사가 단절된 기간이 길어 축적된 연구 결과가 적기 때문에 이를 활용하기는 현재로서는 어려운 것으로 평가된다. 근래에는 소수의 연구자들에 의해 미기록종 발굴과 종에 대한 분류학적 검토를 수행해 나가는 한편, 한반도 선대식물의 목록을 확립해 나가고 있는 단계에 이르렀지만 여전히 미개척 연구 분야 중 하나이다.

염증반응과 관련된 nitric Oxide (NO)는 작고 매우 불안정한 무기 저분자 라디칼이고, prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증 인자가 inducible NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 형성된다. NO는 NOS에 의해 L-아르기닌 (L-arginine)으로부터 생성되며 체내 방어 및 신호 전달, 혈관 확장 등의 다양한 생리기능을 가진다 (Monacada *et al.*, 1991; Knowles and Mocada, 1992; Nathan, 1992). iNOS는 constitutive NOS와는 달리 한번 발현이 되면 과도한 양의 NO를 생성하게 되어 염증과 종양을 유발함으로써 조직의 손상과 유전자의 변이 및 신경 등의 손상을 초래한다 (Weis *et al.*, 1996). 이러한 iNOS는 대식세포나 간세포 등에서 LPS 혹은 cytokine과 같은 세포내 자극제에 의해 발현이 이뤄진다 (Nathan, 1992).

내독소 (endotoxin)로 잘 알려진 LPS (lipopolysaccharide, 지질다당류)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하는데, RAW264.7 세포 등의 monocyte 또는 macrophage에서 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) 등의 전염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)을 증가시킨다 (Mukaida *et al.*, 1996; Lazarov *et al.*, 2000; Scott and Hancock, 2000; Axtelle and Pribble, 2001; Lee *et al.*, 2004).

염증매개물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화에 의해 아라키돈산 (arachidonic acid)이 프로스타글란딘 (prostaglandin, PG)으로 변하는 과정과 NO를 형성하는 일련의 과정으로 연속된다 (Vane, 1971; Funk *et al.*, 1991). 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 사멸하거나 종양을 제거하는 데 있어 중요한 역할을 하나 (Weis *et al.*, 1996), 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관의 투과성, 부종 등의 염증반응은 물론 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 규명되었다 (Mu *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2003). Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid을 PGs로 전환하는 기능이 있는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다 (Masferrer *et al.*, 1994; Santos-Gomes *et al.*, 2003). COX-1은 체내에서 위벽의 보호, 혈소판의 형성, 신장기능의 유지 등의 정상적인 생체기능에 작용하고 (Masferrer *et al.*, 1994), COX-2는 염증매개물질인 PGE₂를 형성한다. PGE₂는 염증 반응, 혈관의 신생 (angiogenesis), 면역 반응을 촉진하는 등 암 유발과 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Im and Lee, 2014).

우산이끼 (*Marchantia polymorpha* L.)는 태류식물문 (Marchantiophyta)의 우산이끼과 (Marchantiaceae)에 속하며 주거지 및 산야의 습한 반음지에서 음지에 흔히 자란다 (Kim *et al.*, 2013). 특히 제주 지역에서는 감귤 등의 재배를 위해 실비한 온실이나 과수원 내에서도 쉽게 번식하는 종이다. 우산이끼는 중국, 인도, 일부 유럽 국가 등에서 전통적으로 상처, 비염, 폐렴 등의 치유에 사용되었다 (Trần *et al.*, 2018; Tran *et al.*, 2020). 또한 항산화, 항균, 미백, 항암 및 항알츠하이머 활성이 있는 것으로 규명된 바 있다 (Mewari and Kumar, 2008; Trần *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016).

선대식물의 특성상 다른 종과 혼생하거나 토양이 혼합되기 쉬어 시료의 정제가 까다로운 편이나 기내 배양이 가능하고 획득한 시료 역시 생리활성이 유지되어 (Tran *et al.*, 2020), 산업화도 가능한 것으로 기대된다.

본 연구에서는 제주산 우산이끼 추출물을 이용하여 염증 활성에 대한 연구를 수행하였다. 이를 통해 우산이끼가 염증성 질환의 예방과 치료제 개발의 기초자료로 활용 가능한지 탐색하고, 항염증 활성을 지닌 자원으로서 활용가치를 확인하기 위해 기능성을 규명하고자 하였다.

LPS로 자극된 RAW264.7 세포에 우산이끼 추출물 시료를 처리하여 염증성 매개인자인 NO 및 PGE₂의 생성 억제 효과와 이를 합성하는 iNOS 및 COX-2 단백질 발현억제효과를 조사하였다. 또한, 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성억제효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취 및 처리

2019년 5월 제주특별자치도 서귀포시 상호동 온실에서 채취한 우산이끼 (*M. polymorpha*)를 담수를 이용하여 흙 등의 이물질을 제거한 후, 시료를 음건하여 마쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2. 추출물 제작

우산이끼 시료를 70% 에탄올을 이용하여 상온에서 24 시간 침출하고 3 회 추출하였으며, 그 후 상징액을 회수하고 감압 농축한 후 동결건조기를 활용하여 에탄올 추출물을 얻었다. 추출물은 용매로 용해시켜 0.2 μ m membrane filter (Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA)로 제균하여 4°C에 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

3. 세포 배양

ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 생쥐 (murine) 대식세포주 RAW264.7을 구입하여, 10% Fetal bovine serum (FBS), penicillin (100

units/ml), 및 streptomycin (100 g/ml)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. 이 세포들은 37°C 온도 조건에서 95% air, 5% CO₂ 가습 공기 조건 하 포화 상태에서 배양하였고, 72 시간 마다 계대배양 하였다.

4. Nitric oxide 생성 평가 (NO assay)

RAW264.7 세포를 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24-well plate에 접종하고, 우산이끼 추출물 시료와 LPS (1 µg/ml)를 동시에 처리하여 24 시간 동안 배양하였다.

NO의 생성량은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 사용하여 세포배양액 중의 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포배양 상정액 100 µl와 Griess 시약 100 µl를 혼합하여 96-well plate에서 10 분간 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 sodium nitrite (NaNO₂)를 standard로 한 비교를 통해 평가하였다.

5. 세포독성 평가 (Lactate dehydrogenase assay, LDH assay)

RAW264.7 세포 (1.5×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지에 우산이끼 추출물 시료와 LPS (1 µg/ml)를 일시에 처리하여 24 시간 배양한 후, 획득한 배양배지를 원심분리 하였다 (3,000 rpm, 5 min).

세포독성 평가는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였고, 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50 µl 와 reconstituted substrate mix를 50 µl를 96-well plate에 넣고, 실온에서 30 분간 반응시킨 후 50 µl의 stop solution을 넣은 다음 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 이용하여 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균흡광도를 구했으며, 대조군 (LDH control, 1 : 5,000)의 흡광도 값과의 비교를 통해 세포독성을 평가하였다.

6. PGE₂ (prostaglandin E2) 생성 억제 효능 평가

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 사용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절하여 24-well plate에 접종한 후, 5% CO₂ 항온기에서 18 시간 전배양을 수행하였다. 또한 배지를 제거하고 우산이끼 추출물 시료와 LPS (1 µg/ml)가 모두 함유된 새 배지를 처리하여 전배양과 같은 조건으로 배양하였다. 24 시간 이후 PGE₂를 측정하고자 배양 배지를 12,000 rpm으로 3 분간 원심분리하여 상정액을 얻었다.

PGE₂를 측정하고자 PGE ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 정량하였고 standard에 대한 표준

곡선의 r²값은 0.99 이상으로 확인되었다.

7. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효능 평가 (western-blotting)

배양이 완료된 세포를 수확하여 2 회 - 3 회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 하고, 세포용해 버퍼 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1mM dithiothreitol, 1mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 25 µg/ml aprotinin, 25 µg/ml leupeptin]를 첨가하여 30 분간 4°C 조건하에서 용해시킨 후 15,000 rpm으로 15 분간 원심분리하여, 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질의 농도 정량에는 bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 표준화하였으며 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)를 이용하였다.

분리된 단백질 20 µg - 30 µg를 8% - 12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하였고, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에 200 mA로 120 분간 transfer하였다. 또한 membrane blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% tween 20 + TBS) 용액에서 상온의 조건 하에 120 분간 실시하였다.

발현된 iNOS의 양을 검토했기 위한 항체로 anti-mouse iNOS (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를, COX-2의 양을 검토했기 위한 항체로 anti-mouse COX-2 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA)를 사용하여, TTBS 용액에서 1 : 1,000으로 희석하여 상온에서 120 분간 반응시킨 후 TTBS로 3 회 세정하였다. 2 차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England)를 1 : 5,000으로 희석하여 30 분 동안 상온에서 반응시킨 다음 TTBS로 3 번 세정한 후 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1 분 - 3 분간 반응 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

8. 염증성 사이토카인 (TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 효능 평가

RAW264.7 세포 (1.5×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 세포수를 조절한 다음 24-well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18 시간 전배양 하였다. 이 후 배지를 제거하고 RAW264.7 세포는 10 배의 농도 (25, 50, 100 µg/ml)로 조제된 추출물 시료 50 µl와 450 µl의 LPS (1 µg/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 전배양과 동일한 조건으로 배양하였다. 24 시간 경과 후 배양 배지를 12,000 rpm으로 3 분간 원심분리하여 획득한 상정액의 pro-inflammatory cytokine 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량하기 전까

지 -20°C 이하의 조건 하에서 보관하였다.

Pro-inflammatory cytokine의 정량은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 수행하였고 standard에 대한 표준곡선의 r²값은 0.99 이상으로 나타났다.

9. 통계분석

실험결과는 3 번 이상의 독립적인 실험의 데이터를 mean ± standard error 값으로 나타내었다. 실험군 사이의 통계적 유의성 검정은 Student's *t*-test와 Statistical Packages for Social Science (SPSS 23.0, Chicago, IL, USA) test를 실시한 후 1% 및 5%의 유의수준으로 검정하였다 (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

결과 및 고찰

1. 에탄올 추출물 제작 및 수율

우산이끼 (*Marchantia polymorpha*) 건조시료 (20 g)를 70% 에탄올로 추출하고 여과하여 획득한 추출액을 감압 농축한 후 동결건조기로 수분을 완전히 제거하여 조추출물 2 g (3.66 g, 18.3%)을 얻었다.

2. Nitric oxide 생성억제 효과

RAW264.7 대식세포는 LPS에 의해 자극되고, 이렇게 자극된 대식세포는 염증 매개물질인 NO의 생성이 증가하게 된다 (Yamamoto *et al.*, 1994). LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포에서 생성되는 NO에 대한 우산이끼 추출물의 억제효과를 알아보하고자 세포에 생성된 NO 양을 Griess 시약을 사용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 그 결과 70% 에탄올 추출물에서 대조군인 LPS 단독 처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 확인할 수 있었다. 특히 50

μg/ml의 농도에서도 세포독성 효과를 보이지 않으면서 우수한 NO 생성 억제효과를 보였다 (Fig. 1).

2. 세포 독성에 미치는 영향

LDH (lactate dehydrogenase)는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로 pyruvic acid 와 lactic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 경우, 혈액 증으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. RAW264.7 세포 (1.5 × 10⁵ cells/ml)에 시험약물과 LPS (1 μg/ml)를 동시에 처리하여 24 시간 동안 배양한 후, LDH assay를 통해 세포독성을 확인한 결과, 우산이끼 70% 에탄올 추출물에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

3. PGE₂ 생성 억제 효과

염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 cytokine인 TNF-α와 IL-6의 발현을 저해하거나, COX-2 활성저해를 초래하는 PGE₂의 생성억제를 통해 pro-inflammatory factor의 증가를 수반하는 병변과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다 (Yoon *et al.*, 2007). RAW264.7 cell에 우산이끼 70% 에탄올 추출물과 LPS (1 μg/ml)를 일시에 처리하여 24 시간 배양한 다음 PGE₂ ELISA assay kit를 이용하여 PGE₂ 생성 억제 활성을 확인한 결과, 우산이끼 70% 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 PGE₂ 생성 억제 활성을 보임을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

4. iNOS 및 COX-2 생성 억제 효과

iNOS는 대개의 경우 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관의 확장, 세포의 독성, 조직의 손상 등과 같이 생체에 유해하게 작용한다. 또한 염증상태에서 iNOS와 COX-2에

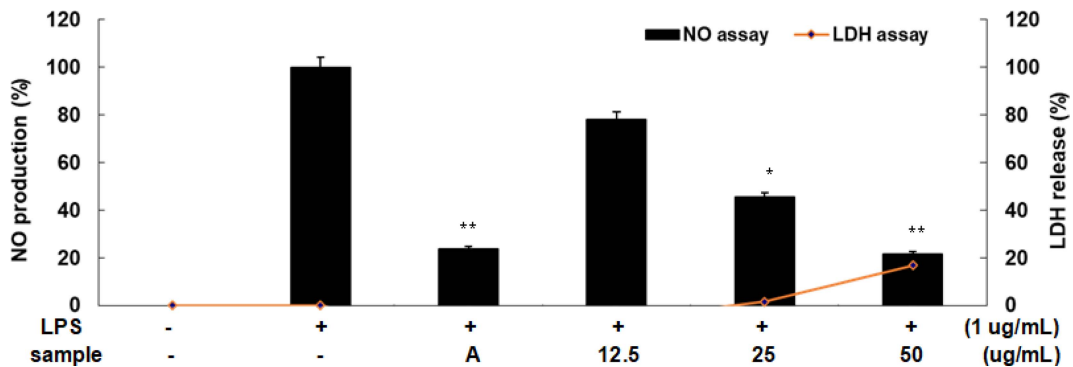


Fig. 1. Inhibitory effects of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* on NO production and cytotoxicity in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The production of nitric oxide (NO) was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 μg/ml) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* (12.5, 25.0 and 50.0 μg/ml). Cytotoxicity was determined using the LDH method. Values are the means ± SEM of triplicate experiments. Means with difference letters are significantly different by Student's *t*-test versus LPS-treated group (**p* < 0.05, ***p* < 0.01). A; 2-amino-4-methyl pyridine (20 μM)

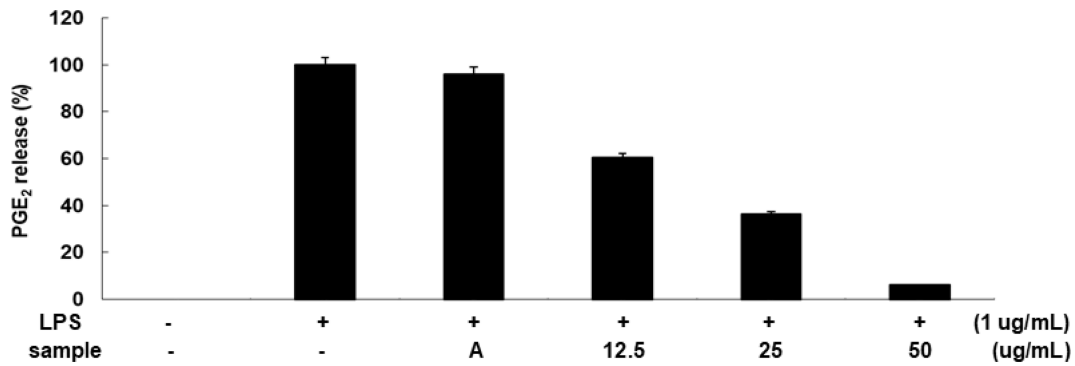


Fig. 2. Inhibitory effects of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* on PGE₂ in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The production of Prostaglandin E₂ (PGE₂) was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* (12.5, 25.0 and 50.0 µg/mL). Values are the means ± SEM of triplicate experiments. Means with difference letters are significantly different by Student's *t*-test versus LPS-treated group (**p* < 0.05, ***p* < 0.01). A; 2-amino-4-methyl pyridine (20 µM).

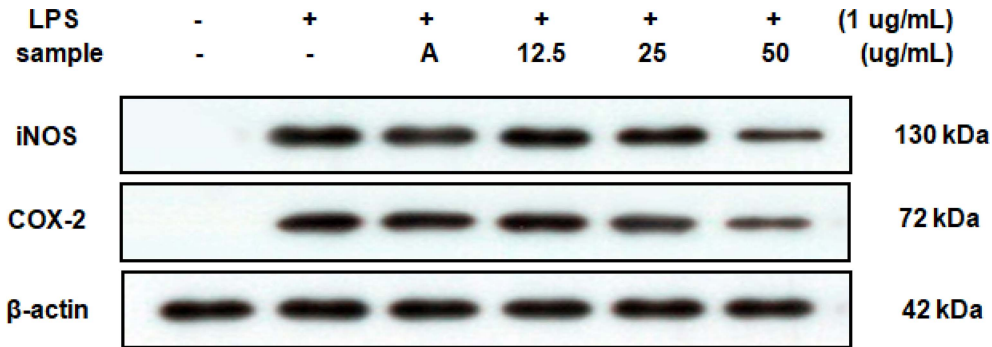


Fig. 3. Inhibitory effects of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* on the protein level of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1.0 × 10⁶ cells/mL) were pre-incubated for 18 h, and the cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* (12.5, 25.0 and 50.0 µg/mL) and 2-amino-4-methyl pyridine (A, 20 µM) for 24 h. iNOS protein level was determined using immunoblotting method.

의해 생성된 NO와 PGE₂는 혈관의 투과성, 부종 및 통증 등의 염증반응과 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 더욱 심화시키는 것으로 알려져 있다 (Tezuka *et al.*, 2001).

우산이끼 70% 에탄올 추출물에 의한 NO 및 PGE₂ 생성 억제 활성이 iNOS와 COX-2의 발현 억제로 인한 것인지 확인하고자 단백질의 수준을 Western blot analysis로 확인하였다. RAW264.7 cell에 LPS (1 µg/mL)와 우산이끼 70% 에탄올 추출물을 24 시간 처리한 다음, iNOS, COX-2의 발현 억제 활성을 확인하였다. 그 결과 우산이끼의 70% 에탄올 추출물이 iNOS 및 COX-2의 발현 억제 활성을 보이고 있음을 알 수 있다 (Fig. 3).

5. Pro-inflammatory cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 효과

TNF-α와 같은 다 기능성 cytokine은 정상조직에서 발현될

뿐만 아니라 병변과정에서 그 발현 정도가 증가되며 (Dinarello, 2000), 암축진 과정에서 일어나는 염증에 중요한 역할을 한다. TNF-α가 염증성 피부질환과 관련이 있음은 널리 알려져 있다 (Piguet *et al.*, 1991; Burrell, 1994).

RAW264.7 cell에서 우산이끼의 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. RAW264.7 cell에 LPS (1 µg/mL)와 우산이끼 70% 에탄올 추출물을 처리하고 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 생성 억제 활성을 확인한 결과, IL-1β, IL-6, 및 TNF-α 모두 생성이 억제된 것으로 나타났다 (Fig. 4 - 6).

결론적으로, 본 연구를 통해 우산이끼 에탄올 추출물은 유의미한 항염증 효과를 지니고 있으며, 염증 치료 식물자원으로 활용 가능성이 규명되었다.

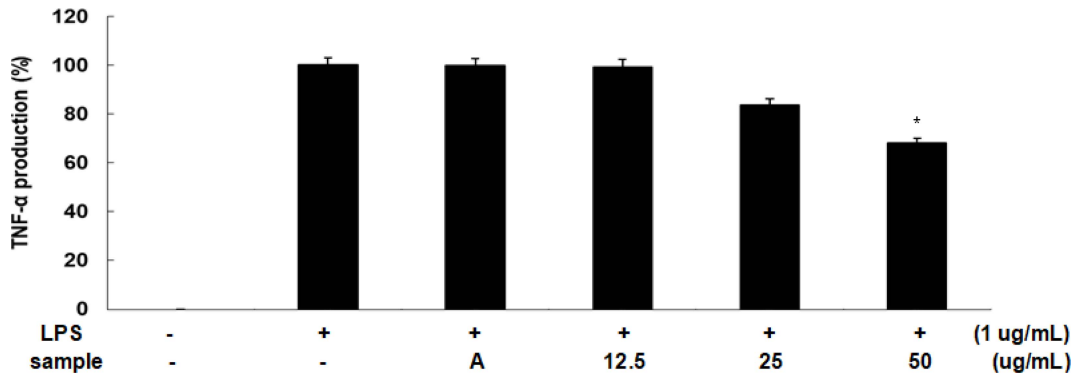


Fig. 4. Inhibitory effects of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* on TNF- α in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* (12.5, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 2-amino-4-methyl pyridine (A, 20 μM). Values are the means \pm SEM of triplicate experiments. Means with difference letters are significantly different by Student's *t*-test versus LPS-treated group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

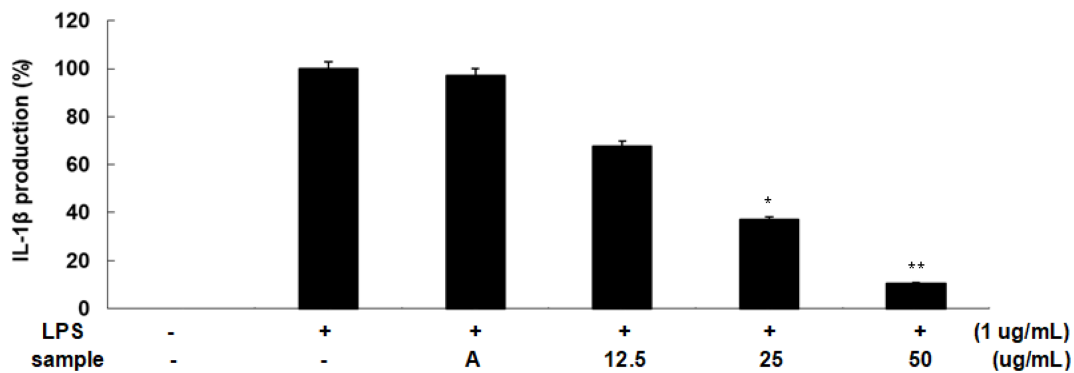


Fig. 5. Inhibitory effects of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* on IL-1 β in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The production of Interleukin-1 β (IL-1 β) was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* (12.5, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 20 μM of 2-amino-4-methyl pyridine (A). Values are the means \pm SEM of triplicate experiments. Means with difference letters are significantly different by Student's *t*-test versus LPS-treated group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

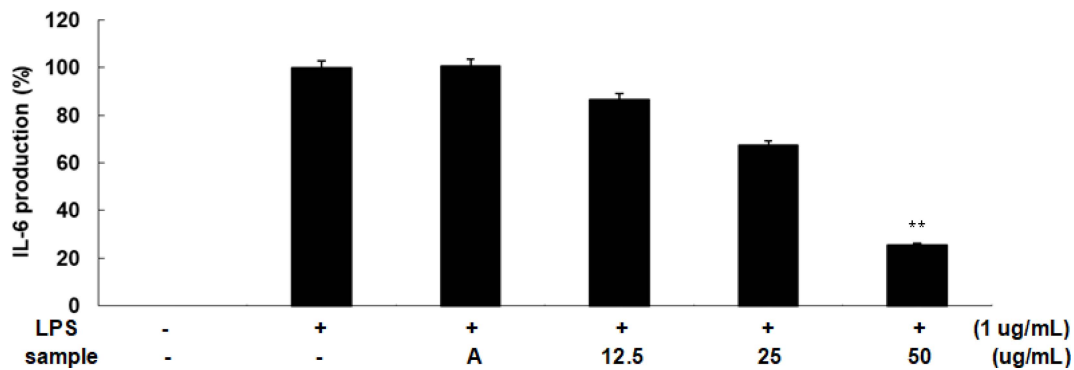


Fig. 6. Inhibitory effects of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* on IL-6 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The production of Interleukin-6 (IL-6) was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of 70% EtOH extract of *M. polymorpha* (12.5, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 20 μM of 2-amino-4-methyl pyridine (A). Values are the means \pm SEM of triplicate experiments. Means with difference letters are significantly different by Student's *t*-test versus LPS-treated group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

REFERENCES

- Axtelle T and Pribble J. (2001). IC14, a CD14 specific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis. *Journal of Endotoxin Research*. 7:310-314.
- Burrell R. (1994). Human responses to bacterial endotoxin. *Circulatory Shock*. 43:137-153.

- Dinarelo CA.** (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118:503-508.
- Funk CD, Frunk LB, Kennedy ME, Pong AS and Fitzgerald GA.** (1991). Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB Journal*. 5:2304-2312.
- Goffinet B and Shaw AJ.** (2009). *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press. New York, NY, USA. p.565.
- Im DY and Lee KI.** (2014). Prostaglandin E2 up-regulation and wound healing effect of the ethanol extract of *Eriobotryae folium* in human keratinocyte. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:457-462.
- Kim JS, Kim SY, Lee BY, Yoon YJ, Choi SS, Sun BY and Lee GH.** (2013). A field guide to Bryophytes in Korea. National Institute of Biological Resources. Incheon, Korea. p.237.
- Knowles RG and Mocada S.** (1992). Nitric oxide as signal in blood vessels. *Trend in Biochemical Sciences*. 17:399-402.
- Korea Ministry of Government Legislation(KMGL).** (2020). Creation and management of forest resources act. <http://www.law.go.kr> (cited by 2020 Sep 3).
- Lazarov S, Balutsov M and Ianev E.** (2000). The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic(endotoxin) shock. *Vutreshni Bolesti*. 32:33-40.
- Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee EK, Jhang YD, Lee SH, Son JK, Baek SH and Chang HW.** (2004). Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor(NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27:617-620.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC and Seibert K.** (1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91:3228-3232.
- Mewari M and Kumar P.** (2008). Antimicrobial Activity of Extracts of *Marchantia polymorpha*. *Pharmaceutical Biology*. 46:819-822.
- Monacada S, Palmer RM and Higgs EA.** (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology Review*. 43:109-142.
- Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T and Yokochi T.** (2001). The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Endotoxin Research*. 7:431-438.
- Mukaida N, Ishikawa Y, Ikeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K and Matsushima K.** (1996). Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: Biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF- κ B and regulation of cytokine production/action through β_2 integrin *in vivo*. *Journal of Leukocyte Biology*. 59:145-151.
- Nathan C.** (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*. 6:3051-3064.
- Piguet PF, Grau GE, Houser C and Vassalli P.** (1991). Tumor necrosis factor is a critical mediators in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reaction. *Journal of Experimental Medicine*. 173:673-679.
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY and Kim YK.** (2003). Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytotherapy Research*. 17:485-489.
- Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB and Fernandes-Ferreira M.** (2003). Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Plant Physiology*. 160:1025-1032.
- Scott MG and Hancock RE.** (2000). Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Critical ReviewsTM in Immunology*. 20:407-431.
- Simpson MG.** (2018). *Plant Systematics*. (eds.). Academic Press. Cambridge, MA, USA. p.1-740.
- Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K and Kadota S.** (2001). Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 77:209-217
- Trần QT, Lương TT, Phan NH and Quách NDP.** (2018). Khảo sát một số hoạt tính sinh học của loài địa tiền *Marchantia polymorpha* L. thu hái tại Đà Lạt, Lâm Đồng. *Science and Technology Development Journal-Natural Science*. 2:26-34.
- Tran QT, Phan NH, Bui LA and Quach NDP.** (2020). Biological activities of *in vitro* liverwort *Marchantia polymorpha* L. extracts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 48:826-838.
- Vane JR.** (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*. 23:232-235.
- Wang X, Cao J, Wu Y, Wang Q and Xiao J.** (2016). Flavonoids, antioxidant potential, and acetylcholinesterase inhibition activity of the extracts from the gametophyte and archegoniophore of *Marchantia polymorpha* L. *Molecules*. 21:360 <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/3/360> (cited by 2020 Sep 3).
- Weis ZA, Cicatiello L and Esumi H.** (1996). Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and N^G-monomethyl-L-arginine. *Biochemical Journal*. 316:209-215.
- Yamamoto Y, He P Klein TW and Friedman H.** (1994). Endotoxin induced cytotoxicity of macrophages is due to apoptosis caused by nitric oxide production. *Journal of Endotoxin Research*. 1:181-187.
- Yoon WJ, Lee JA, Kim KN, Kim JY and Park SY.** (2007). *In vitro* anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extract in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 39:467-469.