

## 섬쑥부쟁이(*Aster glehni* Fr. Schm.) 분획물의 항산화 및 항염증 활성

김한혁<sup>1</sup> · 박근혜<sup>1</sup> · 박강수<sup>1</sup> · 이진영<sup>2</sup> · 안봉전<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>2</sup>호서대학교 한방화장품과학과

**Anti-oxidant and Anti-inflammation Activity of Fractions from *Aster glehni* Fr. Schm.. Kim, Han-Hyuk<sup>1</sup>, Gun-Hye Park<sup>1</sup>, Kang-Soo Park<sup>1</sup>, Jin-Young Lee<sup>2</sup>, and Bong-Jeun An<sup>1\*</sup>.** <sup>1</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea, <sup>2</sup>Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam, 336-795, Korea – The Plants and their extracts containing polyphenol have been shown to be associated with decreased the cause of aging and variety of disease such as reaction oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in several recent studies. We conducted to investigate whether the extracts and fractionation isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. has an inhibitory effect association with oxidation or inflammation. The *Aster glehni* Fr. Schm. 70% aq. MeOH was fractioned according to polarity with n-hexane layer, EtOAc layer, n-BuOH layer and water layer. The electron donating ability of EtOAc, n-BuOH solvent fraction from *Aster glehni* Fr. Schm. was about 58.0%, 46.4% at 50 µg/mL, respectively. The superoxide anion radical inhibitory effect of EtOAc extracts was about 64.65% at 50 µg/mL, and n-BuOH extracts was 35.66% at 50 µg/mL. EtOAc layer to the inhibition activity of hyaluronidase and lipoxigenase were inhibited about 24.37%, 29.5% at 5 µg/mL. In the anti-inflammation effect of EtOAc layer inhibited the generation of nitric oxide. also, these results showed that EtOAc extract inhibited 81.5% at 50 µg/mL on the expressions of iNOS protein in Raw264.7 cell line.

**Key words:** Anti-inflammation effect, anti-oxidant, *Aster glehni* Fr. Schm.

### 서 론

인체는 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환을 일으키게 된다[27]. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 된다[11]. ·NO, HNO<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>와 같은 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 염증 반응 시 대식세포 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성되며, 이때 ROS도 같이 생성된다[4, 7]. 염증 반응의 조절은 대단히 복잡한 것으로 알려져 있는데, 이는 생체 내 복구체계의 증강 및 손상을 감소시키기 위한 것으로 알려져 있다. 그러나 반복되는 조직의 손상이나 재생에 의해 염증반응이 지속되면, 염증관련 세

포에서 ROS와 RNS가 과다 생성되고 그 결과로 영구적인 유전자의 변형이 야기된다[2]. 이처럼 ROS와 RNS는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증 반응과 깊이 관련되어 있다. 염증 과정 중에는 많은 양의 염증유도 cytokines (proinflammatory cytokines), nitric oxide(NO) 그리고 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)가 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 생성되며[23], 포유 세포에서 NO는 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS) 그리고 iNOS 세가지 형태의 NOS에 의해 합성된다. nNOS와 eNOS는 세포 내에 항상 존재하지만, iNOS는 interferon-γ, lipopolysaccharide(LPS) 그리고 다양한 염증유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다[21, 30].

방향성 식용식물자원의 하나인 섬쑥부쟁이는 울릉도 산지에서 자생하는 국화과 개미취 속 다년초로서 모양은 취나물과 비슷하게 생겼고, 울릉도에서는 부지깽이라고 부르는데 이른 봄 새순을 잘라 식용하면 향이 진하다. 높이 1~1.5 m로 근경이 옆으로 자란다. 잎은 호생하고 장타원형이며 끝이 뾰족하고 뒷면에 선점이 있으며 가장자리에 불규칙한 톱니가 있다. 꽃은 8~9월에 피며 원줄기 끝의 산방화서에 달린다[17]. Aster속 식물들은 한방에서 뱀에 물린데 상처를 치료하거나 타박상을 치료하는데 사용되어 왔다[13]. 현재까지 섬쑥부쟁이에 관하여 알려진 물질로는 β-amyrin acetate, phytol, alismol, α-tocopheryl, quinone, α-spinasterol, 10-

\*Corresponding author

Tel: 82-53-819-1429, Fax: 82-53-819-1429

E-mail: anbj@dhu.ac.kr

O-methyl-alismoxide, alismoxide, 3-O-[6'-O-palmitoyl-β-D-glucosyl]-spinasta-7, 22-diene[20]와 α-pinene, limonene, δ-elemene, β-pinenene, cis-3-hexenol, myrcene 외 25종과 살초활성 물질인 coumarin[14]이 있다. 본 연구에서는 섬쭈부쟁이 메탄올 추출물로부터 용매 분획한 섬쭈부쟁이 분획물에 대해 항산화, 항염증에 대한 여러 종류의 in vitro 검색법을 실시하여, 식품과 제약 그리고 화장품 산업에 적용하기 위한 천연소재로서의 가치를 검토하였다.

**재료 및 방법**

**재료**

본 실험에 사용한 섬쭈부쟁이(*Aster glehni* Fr. Schm.)는 2009년 7, 8월경 경북 울릉군 울릉읍에서 건조된 잎을 구입하여 실험재료로 사용하였다.

**시료 추출 및 용매분획**

시료의 추출은 섬쭈부쟁이 5 kg을 시료 중량의 10배 양인 70% 메탄올을 가하여 상온에서 1주일간 3회 추출한 다음 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축하여 메탄올 추출물(472.7 g)을 얻었다. 섬쭈부쟁이 메탄올 추출물을 물에 현탁 후, 현탁액과 n-hexane을 1:1 비율로 분획 깔대기에 넣고 n-hexane층과 물층으로 분획하였고, n-hexane층을 다시 감압 농축하여 154.22g를 얻었다. 이상의 동일한 과정을 EtOAc, n-BuOH, 물로 순차적으로 가하여 각각 74.66 g, 87.84 g, 155.98 g의 분획물을 얻은 후, 동결 건조하여 용매를 제거한 뒤 실험에 사용하였다(Fig. 1).

**총 폴리페놀 함량 측정**

폴리페놀 정량은 AOAC[1]에 준하여 정량하였다. 즉, 100 배 희석한 시료용액 3 mL에 Folin-Ciocalteu phenol reagent

시약 1 mL를 가하고, 1 N HCl 0.2 mL을 넣은 후, 포화용액 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 혼합한 후 1시간 실온에서 방치하고, 640 nm에서 흡광도를 측정 후, 표준물질인 tannic acid로 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

**전자공여능 측정**

전자공여능(EDA: electron donating ability)은 기존에 보고된 방법을 변형하여 96 well plate에 맞게 수정하여 측정하였다[3]. 각 시료용액 2 mL에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 1 mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

**Superoxide anion radical 소거능 측정**

Superoxide anion radical 소거능은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법에 의해 측정하였다[10]. 각 시료용액 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 xanthine(0.4 mM)과 NBT(0.24 mM)을 녹인 기질액 1mL를 첨가하고 xanthine oxidase(0.049 U/mL) 1 mL를 가하여 37 °C에서 20분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 superoxide anion radical의 양을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해율(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 superoxide anion radical 생성량}}{\text{무첨가군의 superoxide anion radical 생성량}}\right) \times 100$$

**Hyaluronidase 저해활성 측정**

Hyaluronidase(HAase) 저해활성 측정은 sodium-hyaluronic acid(HA)로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucosazoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethylaminobenzaldehyde(DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다[16]. 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 HAase (7,900 U/mL) 0.05 mL와 시료용액 0.1 mL를 혼합하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 12.5 mM CaCl<sub>2</sub> 0.1 mL를 가하고 혼합 후 다시 20분간 배양하였다. 기질로서 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 HA(12 mg/mL)를 첨가하여 다시 40 분간 배양하여 0.4 N potassiumtetraborate 0.1 mL 및 0.4 N NaOH 용액을 0.1 mL 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕상에서 가열한 후 완전히 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 발색제로 DMAB 시약 3 mL을 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출 하였다.

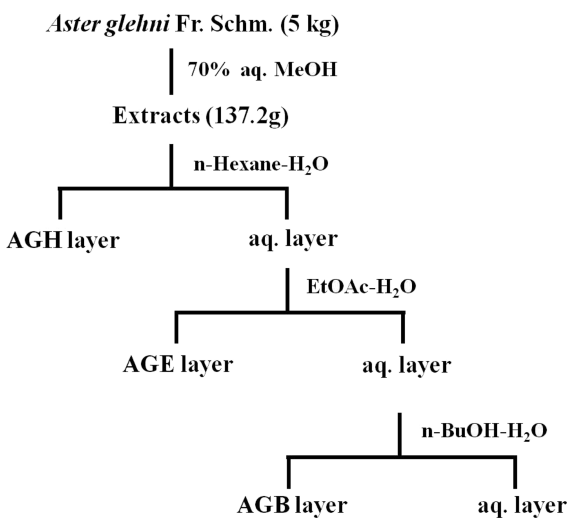


Fig. 1. Isolation procedure of *Aster glehni* Fr. Schm.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### Lipoxygenase 저해활성 측정

Lipoxygenase 활성 측정은 기존의 방법을 변형하여 실험하였다[25]. 즉 반응구는 0.1 M tris buffer(pH 8.5) 2 mL와 시료용액 0.02 mL를 첨가하고 lipoxygenase(500U/mL) 0.03 mL를 첨가하여 18°C에서 5분간 배양한 다음 110 μM linolenic acid 0.05 mL를 첨가하여 20분간 반응시켜 254 nm에서 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 세포배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin/streptomycin(100 U/mL)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. RAW 264.7 세포에 시료용액의 여러 농도(1, 10, 100, 1000 μg/mL) 또는 양성 대조군을 1시간 전처리한 후 LPS(1 μg/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다.

### MTT assay에 의한 세포 독성 측정

세포 독성 측정은 Carmichael 등[6]의 방법에 따라 각 세포주 macrophage(Raw 264.7) cell을 96 well plate에 0.6~8×10<sup>3</sup> cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:EtOH(1:1) 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 독성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### Nitric oxide 저해활성 측정

Nitric oxide(NO) 측정은 세포의 상층액에서의 nitric oxide(NO)의 양을 nitrite와 nitrate로서 측정을 하였다[8]. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent(Sigma, USA)를 사용하였으며, 6 well plate에 2×10<sup>6</sup> 개의 cell을 confluence가 80%일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양시킨 후에 lipopolysaccharide(LPS) 10 μg/mL을 대조군을 뺀 모든 well에 다 넣어서 자극시켰다. 2시간 후에 시료를 농도별로 처

리하여 실험하였다. NO 생성량은 24시간 후에 상층액을 모아 griess 시약으로 10분간 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. LPS만 첨가한 군에서 생성된 NO의 양을 100%로 하여 시료가 첨가된 경우에 측정된 흡광도를 환산하여 표기하였다.

### Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

Raw 264.7 세포를 60 mm tissue culture dish에 2×10<sup>4</sup> cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 섬썩부쟁이 핵산층, 에틸아세테이트층 분획물을 농도별로 처리한 배지로 교환하고 24시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 100 μL을 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리하여(4°C, 12,000 rpm, 20 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 60 μL의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 30~40 V에서 2시간 이상 transfer하였다. Transfer가 끝나면 ponceau에 담긴 후 band를 확인하고 TBST로 2회 이상 씻은 후 꺼내서 5% skim milk로 overnight 시켜 background는 제거시켰다. 3회 washing 후 1차 antibody(1:1000)를 1시간 동안 붙인 후 다시 2차 antibody(1:1000)를 붙이고 ECLkit(Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Band density는 Gel doc(Bid-rad, America)으로 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 폴리페놀 함량 확인

페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며, 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 총치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다[29]. 본 실험에서는 섬썩부쟁이의 용매별 분획물에 존재하는 총 페놀 함량을 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 mg/g TAE(tannic acid equivalent) 단위로 나타내었다. 각 분획물에 함유된 총 폴리페놀

**Table 1. The contents of total polyphenols of solvent fractions extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.**

Solvent for extraction	Contents of polyphenols (mgTAE/g) <sup>1)</sup>
Hexane Fr.	2.78±0.12 <sup>2)</sup>
EtOAc Fr.	7.91±0.07
n-BuOH Fr.	6.45±0.27
H <sub>2</sub> O Fr.	5.95±0.66
MeOH extracts	6.77±0.43

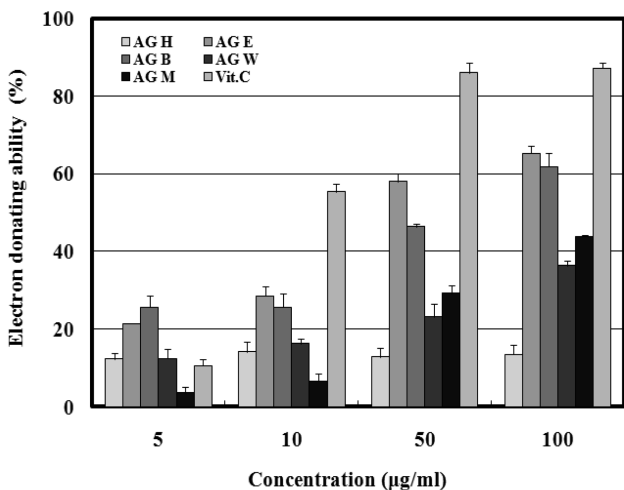
<sup>1)</sup>TAE standards for tannic acid equivalents

<sup>2)</sup>Result are means±S.D of triplicate data.

함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 섬쭈부쟁이의 에틸아세테이트 분획물은 7.91±0.07 mgTAE/g로 총 폴리페놀 함량이 가장 많이 함유되어 있으며, 핵산 분획물은 2.78±0.12 mgTAE/g, 부탄올 분획물은 6.45±0.27 mgTAE/g, 물 분획물은 5.95±0.66 mgTAE/g를 함유하고 있었다. 대조군인 tannic acid(7.02±0.82 mgTAE/g)의 폴리페놀 함량과 비교 시 에틸아세테이트 분획물의 폴리페놀 함량이 더욱 높게 나타났음을 알 수 있었으며, phenolic hydroxyl(OH)기의 활성물질은 메탄올 추출물(6.77±0.43 mgTAE/g)에서 EtOAc 분획물로 더욱 이행한 것으로 추정하였다.

**전자공여능 확인**

섬쭈부쟁이 메탄올 추출물과 각 용매별 분획물 그리고 양성대조군인 ascorbic acid의 전자공여능을 농도별로 측정하여 비교한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 50 µg/mL에서 핵산층 분획물이 12.86%를 나타내었고, 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물은 50 µg/mL에서 각각 58.0%, 46.4%의 전자공여능을 나타내었으며, 물 분획물은 50 µg/mL에서 23.09%의 전자공여능을 나타내었다. 대조군인 ascorbic acid의 10 µg/mL과 비교 시 에틸아세테이트 분획물이 28.5%의 전자공여능을 나타내어 ascorbic acid 보다 다소 낮은 활성을 확인할 수 있었으나, IC<sub>50</sub> 값에서는 에틸아세테이트 분획물이 8.90 µg/mL로 ascorbic acid의 9.39 µg/mL와 비교 시 유의적인 효과를 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물은 부탄올 분획물 또는 70% 메탄올 추출물과 비교했을 때, 각 분획물 중 전자공여능이 가장 우수한 것으로 나타나 phenolic hydroxyl(OH)기가 free radical의 환원 능력에 영향을 미친 것으로 추정하였다.



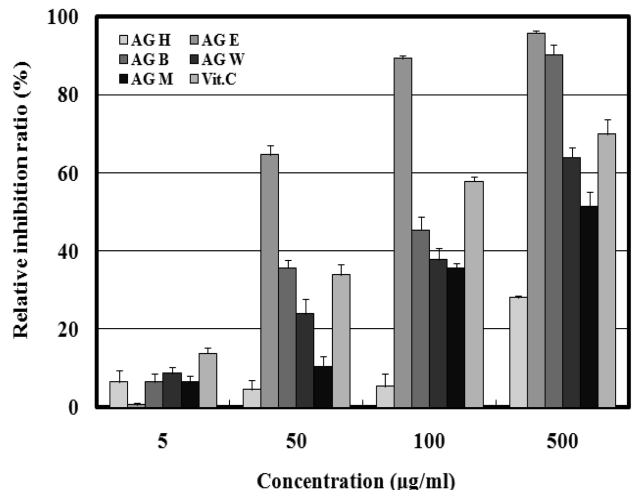
**Fig. 2. Electron donating ability of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.** □, AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. n-hexane extracts; ■, AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. ethyl acetate extracts; ■, AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. n-butanol extracts; ■, AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. water extracts; ■, AG M, *Aster glehni* Fr. Schm. methanol extracts; □, Vit. C, Ascorbic acid. Result are means ± S.D. of triplicate data.

**Superoxide anion radical 소거능 확인**

생체내 활성 산소종은 산소에서 유래된 것들로서 안정한 분자 상태인 triplet oxygen(<sup>3</sup>O<sub>2</sub>)이 자외선, 방사선, 화학반응, 대사과정을 통하여 생성되며 superoxide anion radical (O<sup>2-</sup>·), hydroxyl radical(OH·), peroxy radical(HO<sub>2</sub>·), nitric oxide radical(NO·)과 같은 자유 라디칼들과 라디칼의 형태가 아닌 singlet oxygen(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), 오존(O<sub>3</sub>), hypochlorous acid (HOCl) 그리고 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등이 있다[12]. 섬쭈부쟁이 메탄올 추출물을 이용한 분획물의 superoxide anion radical 소거능은 Fig. 3과 같이 나타내었다. 핵산 분획물의 경우 500 µg/mL에서 28.03%의 소거능을 보였고, 에틸아세테이트 분획물이 50 µg/mL에서 64.65%, 부탄올 분획물이 50 µg/mL에서 35.66%, 물 분획물이 50 µg/mL에서 23.84%를 나타내었으며, 대조군인 vitamin C에서는 50 µg/mL에서 33.84%의 소거능을 나타내었다. 또한, IC<sub>50</sub>값은 에틸아세테이트 분획물이 39.69 µg/mL로 ascorbic acid의 83.72 µg/mL와 비교 시 우수한 효과를 나타내었다. Velioglu 등[28]은 어떤 식물에서는 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성이 크게 관련 있다고 보고한 바, 총 폴리페놀 함량이 우수한 에틸아세테이트 분획물이 ROS(Reactive oxygen species)중 하나인 superoxide anion radical(·O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 제거하는데 밀접한 관련이 있다고 사료된다.

**Hyaluronidase 저해활성 확인**

Hyaluronidase(HAase)는 mocopoly saccharide splitting enzyme의 하나로서 모세혈관 투과성에 관여하고, 간염, 치주염 등의 염증 부위에서 활성이 증가하고 급성 부종을 일

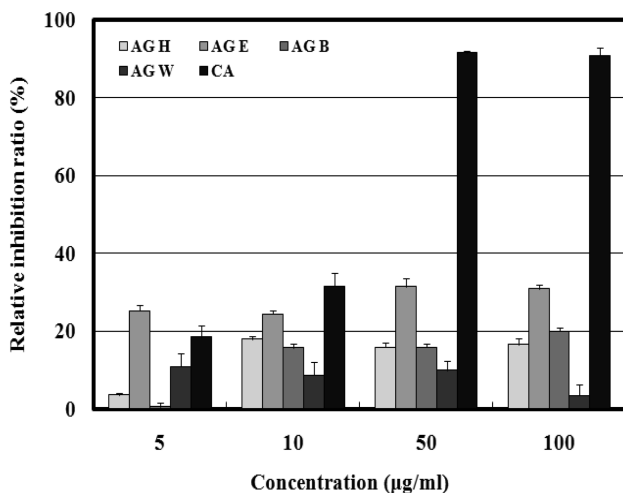


**Fig. 3. Superoxide anion radical scavenging activity of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.** □, AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. n-hexane extracts; ■, AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. ethyl acetate extracts; ■, AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. n-butanol extracts; ■, AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. water extracts; ■, AG M, *Aster glehni* Fr. Schm. methanol extracts; □, Vit. C, Ascorbic acid. Result are means ± S.D. of triplicate data.

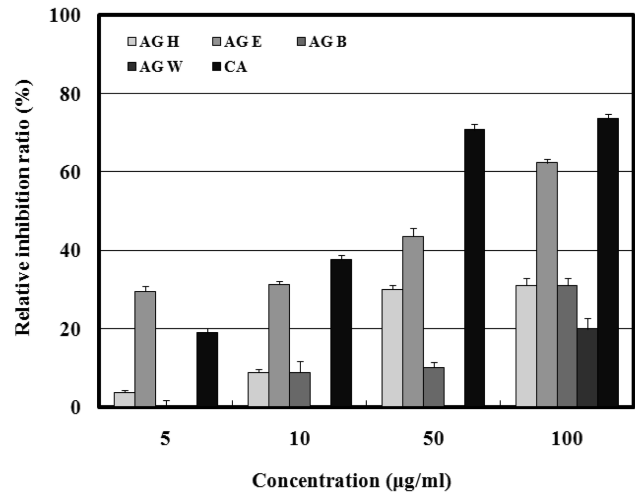
우키며, chemical mediator의 유리에도 관여하는 등 염증발 현과 관련이 있는 효소로 dermis(connective tissue)의 기본 물질인 HA와 같은 산성다당류(acidic mucopolysaccharides) 에서 N-acetyl-glucosamic 결합을 끊는 것을 촉진하며, 이들 의 분해 물질은 생물학적 시스템을 조절하는데 매우 중요하 다[19]. 섬쭈부쟁이 분획물이 HA를 분해하는 HAase를 저해 할 수 있는지 알아보고자 다양한 농도에서 효소 저해 효과 를 측정하여 Fig. 4와 같이 나타내었다. 섬쭈부쟁이 핵산 분 획물은 10 µg/mL에서 17.91%, 에틸아세테이트 분획물은 10 µg/mL에서 24.37%, 부탄올 분획물은 10 µg/mL에서 15.74%, 물 분획물은 10 µg/mL에서 8.75%의 저해 효과가 나타났고, 대조군인 (+)-Catechin의 경우, 10 µg/mL에서 31.61%의 저 해능을 나타내어, 섬쭈부쟁이 분획물이 고분자 hyaluronic acid의 염증반응 조절에 다소 낮은 역할을 한 것으로 나타 났다.

**Lipoxygenase 저해활성 확인**

Lipoxygenase(linoleate : oxygen oxidoreductase : EC 1.13.11.12)는 일중항 산소(singlet oxygen) 존재 하에서 cis, cis-1,4 pentadiene(-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) 구조를 가지고 있는 불포화지방산에만 작용하는 기질 특이성을 갖는 산화 효소이다[9]. Lipoxygenase의 작용으로 arachidonic acid는 6-hydroperoxyeicosatetra enoic acid를 거쳐 5-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid와 여러 가지 형태의 leukotriene을 생성 한다[22, 24, 26]. 특히, 5-hydroperoxyeicosa tetraenoic acid 는 neutrophil chemotaxis를 작용하여 여러 가지 형태의 염 증 반응이 일어나는 동안 조직에서 증가되고 있는 것으로 보 아 이들 화합물은 leukocyte를 새로 생기게 하는 효소의



**Fig. 4. Hyaluronidase inhibition rate of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.** □, AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. n-hexane extracts; ▤, AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. ethyl acetate extracts; ▥, AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. n-butanol extracts; ▦, AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. water extracts; ▨, CA, Catechin. Result are means ± S.D. of triplicate data.



**Fig. 5. Lipoxygenase inhibition rate of an extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.** □, AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. n-hexane extracts; ▤, AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. ethyl acetate extracts; ▥, AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. n-butanol extracts; ▦, AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. water extracts; ▨, CA, Catechin. Result are means ± S.D. of triplicate data.

release를 증진시키거나 항원의 침입을 알리는 mediator를 증진시키는 작용을 하는 것으로 추측된다. 본 실험에서는 linolenic acid를 기질로 하여 soybean lipoxygenase에 의한 과산화 반응을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 모든 용매추출물에서 농도 유의적으로 흡광도 수치가 감소함을 알 수 있었고, 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 5 µg/mL의 농도에서 29.5%로 비교적 높은 저해활성을 보였다. 이는, 대조군인 (+)-catechin의 18.97% 보다 우수하였으며, 에틸아세테이트 분획물은 대체로 저농도에서 우수한 활성을 보였다.

**대식세포(Raw 264.7)의 독성 확인**

섬쭈부쟁이 에틸아세테이트 분획물에 의한 macrophage 세포의 독성을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 6과 같이 나타내었다. 즉 섬쭈부쟁이 에틸아세테이트 분획물이 lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 nitric oxide의 생성을 감소시킨 것인지, 섬쭈부쟁이 에틸아세테이트 분획물의 세포 독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하는 것인지를 측정한 결과, 전 농도에서 20% 이하의 세포 독성을 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 섬쭈부쟁이 에틸아세테이트 분획물의 농도를 100 µg/mL 이하의 농도에서 nitric oxide량을 측정하였다.

**Nitric oxide 저해활성 확인**

내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하며, Raw 264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1β(IL-1β)과 같은 proin-

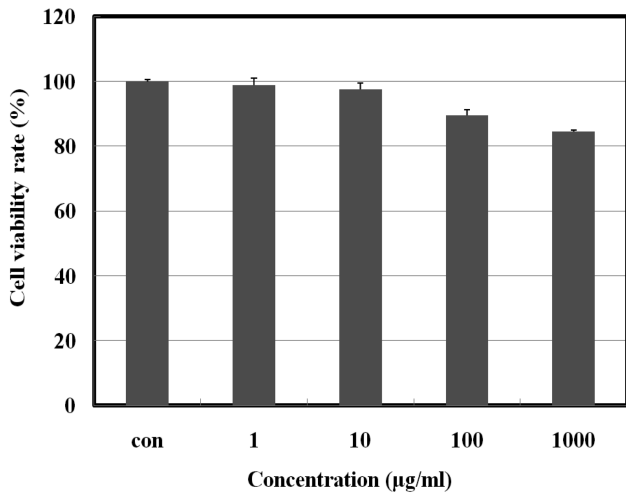


Fig. 6. Cytotoxicity of macrophage cell (Raw 264.7) of EtOAc extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. ■, AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. ethyl acetate extracts. Result are means ± S.D. of triplicate data.

inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다[18]. Raw 264.7 cell의 NO 생성억제 정도를 측정하기 위하여 섬쭉부쟁이 분획물을 농도별로 세포에 처리하여 생성되는 NO량을 측정한 결과 Fig. 7과 같이 나타내었다. LPS를 첨가하지 않은 군에서는 10~12%의 NO를 생성하였고, 에틸아세테이트 분획물은 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였으며, 50 µg/mL에서 NO의 생성을 25.9%를 억제하였다. 이는 Byun 등[5]의 현삼 메탄올 추출물과 Kim 등[15]의 상황 H<sub>2</sub>O 추출물의 LPS로 유도된 Raw cell의 NO 생성 억제능에 미치는 결과와 비교하여 보면 섬쭉부쟁이 분획물 중 에

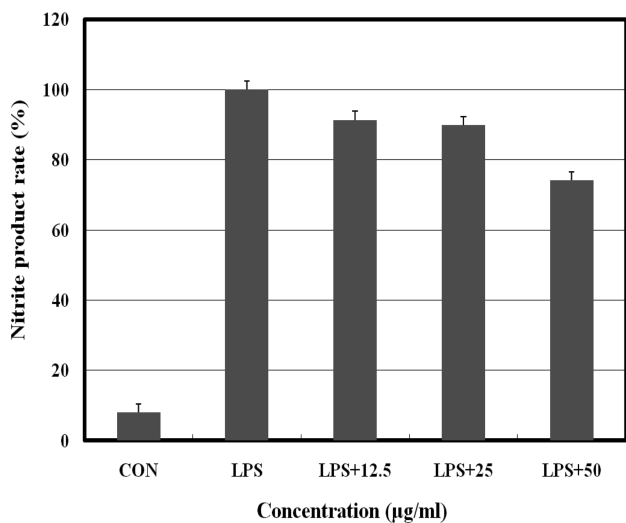


Fig. 7. Effects of solvent fractioning an extracts from *Aster glehni* Fr. Schm. on the production of nitric oxide in macrophage cell (Raw 264.7). ■, AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. ethyl acetate extracts. Result are means ± S.D. of triplicate data.

틸아세테이트 분획물의 NO 생성 억제능이 가장 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

**iNOS 단백질의 발현 측정 결과**

자극에 유도된 iNOS는 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하게 되고, 생성된 NO는 guanylyl cyclase의 활성화와 동시에 주위 조직에 세포독성을 나타낸다. 즉 LPS로 유도되어진 Raw 264.7 cell에서 iNOS의 protein level의 감소에 의해 항염증 효과를 기대할 수 있다. 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물이 iNOS를 저해하는 효과가 있는지 알아보기 위하여 Raw 264.7 cell에 LPS(10 µg/µL)을 처리 하고 1시간 뒤, 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물을 100 µg/mL로 처리 한 후 24시간 배양한 후 iNOS, protein의 발현 변화를 western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH에 대한 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획물의 iNOS protein 발현율은 50 µg/mL을 처리한 농도에서 81.5%을 감소시켜 우수한 활성이 관찰되었다(Fig. 8).

본 연구에서는 섬쭉부쟁이 분획물을 이용하여 항산화 효과와 항염증 효과를 동시에 가지는 활성을 탐색하였으며, 그 중 가장 우수한 활성을 나타낸 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 pro-inflammation 및 anti-inflammation 등 다양한 메커니즘 내의 in vitro 검색법을 수행하였다. 결론적으로, 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물의 항염증 활성은 관련 분야의 활용 가치로서 이용 가능성이 크다고 판단된다. 추가적인 연구로, 분획물 내 어떠한 화합물이 우수한 항염증 활성을 나타내는지를 확인하여 아토피 유발 NC/Nga mice를 이용한 항아토피 연구와 같은 in vivo test를 제안한다. 또한, 향후 기능성 화장품, 연고제 등의 산업적 가

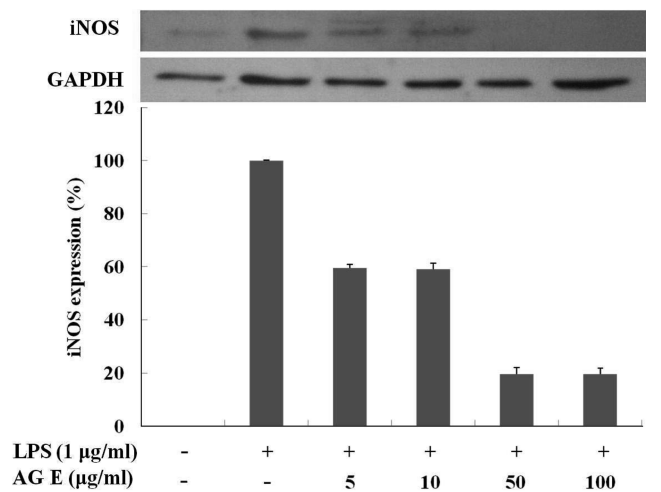


Fig. 8. iNOS protein expression rate of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. on macrophage cell (Raw 264.7). ■, AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. ethyl acetate extracts. Result are means ± S.D. of triplicate data.

치를 고려했을 때, 제재 첨가 시에 따른 안정성 및 안전성 등에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## 요 약

최근 연구에서 폴리페놀을 함유한 천연물은 질병의 위험과 노화의 원인인 ROS와 RNS를 감소시키는 것과 연관이 있다고 밝혔다. 본 연구에서는 섬쭉부쟁이 추출물과 분획물의 산화와 염증에 대한 저해 효과가 있는지에 대한 연구를 조사하였다. 섬쭉부쟁이 70% 메탄올 추출물은 핵산층, 에틸아세테이트층, 부탄올층, 물층을 극성별로 분획하였다. 섬쭉부쟁이로부터 분획한 에틸아세테이트 추출물과 부탄올 추출물의 전자공여능은 50 µg/mL에서 각각 58.0%, 46.4%를 나타냈다. 에틸아세테이트 추출물의 superoxide anion radical 소거능은 50 µg/mL에서 64.65%를 나타냈고, 부탄올 추출물은 50 µg/mL의 농도에서 35.66%의 저해 효과를 나타내었다. 항염증 효과와 관련된 hyaluronidase와 lipoxygenase의 저해 활성에 대한 에틸아세테이트 분획물의 효과는 5 µg/mL의 농도에서 각각 24.37%, 29.5%의 저해 효과를 나타냈다. 이러한 에틸아세테이트 추출물의 항염증 효과는 nitric oxide 생성 억제에서도 유의했으며, Raw 264.7 cell 내 LPS에 의해 유도된 iNOS 단백질에서 50 µg/mL의 EtOAc 추출물을 처리시 81.5%의 발현을 억제하는 효과가 확인되었다.

## REFERENCES

- Association of Analytical Chemists. 1980. Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed. Washington (DC): *Association of Analytical Chemists* INC.
- Azad, N., Y. Rojanasakul, and V. Vallyathan. 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health. Part B: Crit. Rev.* **11**: 5-11.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* **26**: 1199-1120.
- Brune, B., J. Zhou, and A. Von Knethen. 2003. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int. Suppl.* **84**: 4-22.
- Byun, S. H., C. H. Yang, and S. C. Kim. 2005. Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 164.7 cells. *Kor. J. Herbology.* **20**: 7-16.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Delanty, N. and M. A. Dichter. 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* **98**: 53-145.
- Ding, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**: 2407-2412.
- Eskin, N. A., S. Grossman, and A. Pinsky. 1977. Biochemistry of lipoxy- genase in relation to food quality. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**: 1-4.
- Fridovich, I. 1970. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **245**: 4053-4057.
- Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **264**: 7761-7762.
- Harman, D. 1982. Free radicals in biology. pp. 255-275. 8 ed. W.A. Pryor. London Academic Press, New York, U.S.A.
- Kim, C. M., M. K. Sin, T. K. An, and K. S. Lee. 1997. Dictionary of Chinese herb. pp. 1431. Jung-Dam Publisher, Seoul, Korea.
- Kim, K. W., J. G. Shin, and D. G. Lee. 2008. Isolation of herbicidal compound from *Aster grehni* Fr. Schm. *Kor. J. Weed Sci.* **28**: 434-441.
- Kim, S. C., Y. S. Jung, J. R. Lee, Y. W. Kim, B. H. Byun, T. K. Kwon, S. I. Suh, S. H. Byun, and Y. K. Kwon. 2004. Inhibition effect of *Phellinus igniarius* water extract on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 164.7 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* **18**: 880-886.
- Kim, Y. S., Y. K. Noh, G. I. Lee, and Y. K. Kim. 1995. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 265-272.
- Lee, C. B. 2006. Coloured flora of Korea. pp. 322. Hyangmoon-sa, Seoul, Korea.
- Lee, E. S., H. K. Ju, T. C. Moon, E. Lee, Y. Jang, S. H. Lee, J. K. Son, S. H. Baek, and H. W. Chang. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production by propenone compound through blockade of nuclear factor(NF)- $\kappa$ B activation in cultured murine macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 617-620.
- Meyer, K. 1947. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* **27**: 335-359.
- Min, Y. D., H. C. Kwon, S. Z. Choi, and K. R. Lee. 2004. Terpenoids from the aerial parts of *Aster grehni*. *Yakhak Hoeji.* **48**: 65-69.
- Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.
- Parker, C. W. 1984. Lipoxygenases and leukotrienes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **74**: 343-348.
- Posadas, I., M. C. Terencio, I. Guillen, M. L. Ferrandiz, J. Coloma, M. Paya, and M. J. Alcaraz. 2000. Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **361**: 98-106.
- Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* **220**: 568-575.
- Tappel, A. L., W. O. Lundberg, and P. D. Boyer. 1953. Effect of temperature and antioxidants upon the lipoxygenase

- catalyzed oxidation of sodium linoleate. *Arch. Biochem. Biophys.* **42**: 293-304.
26. Taylor, G. W. and H. R. Morris. 1983. Lipoxygenase pathways. *Br. Med. Bull.* **39**: 219-222.
27. Videla, L. A. and V. Fernandez. 1988. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Archivos de Biología Y Medicina Experimentales.* **21**: 85-92.
28. Velioglu, Y. S., G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4113-4117.
29. Yoshizawa, S., T. Horiuchi, T. Yoshida, and T. Okuda. 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother. Res.* **1**: 44-47.
30. Yun, H. Y., V. L. Dawson, and T. M. Dawson. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**: 291-316.

**(Received July 7, 2010/Accepted Oct. 4, 2010)**