

영정귀(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*) 부위별 추출물의 항산화 및 항염증 효과

목지예¹, 강현주², 조정근³, 전인화¹, 김현수¹, 박지민¹, 정승일⁴, 심재석², 장선일^{1*}

1 : 전주대학교 대체의학대학, 2 : 임실생약조합, 3 : 전주대학교 방사선학과, 4 : 전주생물소재연구소

Antioxidative and Anti-inflammatory Effects of Extracts from Different Organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*

Ji Ye Mok¹, Hyun-Ju Kang², Jung-Keun Cho³, In Hwa Jeon¹, Hyeon Soo Kim¹,
Ji Min Park¹, Seung-Il Jeong⁴, Jae-Suk Shim², and Seon Il Jang^{1*}

1 : College of Alternative Medicine, Jeonju University, 2 : Imsil Herbal Medicine Association,
3 : Department of Radiological Science, Jeonju University, 4 : Jeonju Biomaterials Institute

ABSTRACT

Objective : The roots, leaves, flowers, stems and seeds of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* are often used in treatment of human diseases such as hemorrhage, blood congestion and inflammation. Focusing our attention on natural and bioavailable sources of antioxidants and anti-inflammation, we undertook to investigate the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* used as a folk medicine in Korea.

Methods : The extracts of the leaves, stems, flowers, seeds and roots from *C. japonicum* var. *ussuriense* were prepared by extracting with water or 80% ethanol. Total flavonoids and polyphenols were measured by a colorimetric assay. The free radical scavenging activity of the extract was analyzed by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) and Griess reagent assay. An oxidative product of nitric oxide (NO), was measured in the culture medium by the Griess reaction. The level of prostaglandin E₂ (PGE₂) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were measured by Western blot analysis.

Results : Total flavonoid and polyphenol amounts of the leaves (CLE) and flowers (CFE) showed higher than those of the seed extract (CSE), stem extract (CSTE) and roots (CRE). CLE and CFE also showed the high antioxidant activities such as DPPH, NO-like and ABTS radical scavenging activity. An antioxidant activities of these water extracts showed higher than those of 80% ethanol extracts. We investigated the anti-inflammatory effects of CLE on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. CLE significantly suppressed the levels of the inflammatory mediators such as NO and prostaglandin E₂ (PGE₂) in dose dependant. Furthermore, the levels of iNOS and COX-2 protein expressions were markedly suppressed by the treatment with CLE extract in a dose dependent manner.

Conclusions : These results suggest that CLE water extract has a higher antioxidant and anti-inflammatory activity, these properties may contribute to the oxidative and inflammatory related disease care.

Key words : *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*, Water extract, antioxidant, anti-inflammation

*교신저자 : 장선일. 전북 전주시 완산구 효자동 3가 1200, 전주대학교 대체의학대학.
· Tel : 063-220-3124, · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr.
· 접수 : 2011년 11월 4일 · 수정 : 2011년 11월 27일 · 채택 : 2011년 12월 16일

서론

영경귀(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 한국에는 13종 6변종 1품종이 산야에 자생하고 있다. 한방에서는 지상부 또는 지하부(뿌리)를 대계라하여 약용으로 활용해왔다. 즉, 잎, 줄기, 꽃과 씨 등 지상부는 개화시기에서 씨가 여우는 5-6월에 채취하고 뿌리는 가을에 채취하여 건조시킨 후 열수 또는 알코올 추출에 의한 약성분을 토혈, 혈뇨, 대하, 간염 및 고혈압 등 치료에 활용해왔다^{1,2)}. 특히 영경귀에는 이노, 해독, 지혈 및 강장작용이 있어서 월경불순, 자궁근종, 빈혈, 요혈, 하혈 등의 치료에 쓰인다. 약용으로는 주로 뿌리가 사용되는데 여자의 적백대하를 다스려 생리적 기능을 복원시키고, 하혈을 그치게 해주고 혈을 보한다³⁾. 동의보감에 의하면 '성질은 평(平)하고 맛은 쓰며[苦] 독이 없고, 어혈이 풀리게 하고 피를 토하는 것, 코피를 흘리는 것을 멎게 하며 응종과 음과 버짐을 낫게 하며, 여자의 적백대하를 낫게 하고 정(精)을 보태 주며 혈을 보하는 효과가 있다³⁾. 영경귀는 지정(地丁)이라 하는데, 꽃이 누른 것은 황화지정(黃花地丁)이라 하고 꽃이 자줏빛인 것을 자화지정(紫花地丁)이라 하는데 다 같이 응종을 낫게 한다고 기록되어 있다⁴⁾.

영경귀속(*Cirsium*) 식물은 생리활성이 우수한 apigenin, luteolin, myricetin, kaemferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-neo-hesperioside flavonoid(apigenin, luteolin, myricetin, kaemferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-neo-hesperioside 등 플라보노이드 계열의 화합물이 풍부하여 항염증, 항암, 항돌연변이, 항진균, 신경보호 및 면역 증진 활성을 가지고 있다⁵⁻⁹⁾. 또한 영경귀는 지질과산화물을 억제하고 glutathione reductase의 활성을 증가시켜 알코올 해독을 촉진시켜 간 보호 작용이 있으며¹⁰⁾, 영경귀 잎 추출물은 항류마티스성의 효과가 있는 것으로 알려졌다¹¹⁾.

최근 인간의 수명이 연장되면서 노화 및 혈행과 관련된 성인병 만성질환이 급증하고 있는데, 이러한 원인은 생체에서 발생하는 하드록실라디칼(\cdot OH) 슈퍼록사이드 라디칼(\cdot O₂), 과산화수소(H₂O₂) 등과 같은 활성산소류(reactive oxygen species)에 의한다고 알려졌다¹²⁾. 활성산소는 암, 순환기질환 및 만성형 염증성질환 같은 인체질환을 유발하거나 악화시키는 주요 원인으로 알려지면서 활성산소를 제거하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 활성산소를 제거하는 물질을 항산화제라 하는데, 대부분의 식물에서 이러한 항산화 효과를 나타내는 물질이 분리·동정되고 있다. 따라서 최근 연구는 식용 또는 약용식물로부터 항산화 효과가 우수한 종을 발굴하여 각종 인체질환을 개선 또는 치료하기 위한 방향으로 연구되고 있다^{16,17)}. 활성산소와 관련된 인체질환에 대한 항산화의 효능이 인정되면서 현재 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), Troxal-C 등 합성 항산화제 등이 개발되어 활용되고 있으나, 동물실험에서 발암성이 보고되어 안전성에 대한 문제점이 지적되고 있다¹⁸⁾. 이러한 이유로 합성 항산화제의 사용이 제한되고 있어 합성 항산화제에 비해 그 효과가 동등하거나 우수한 새로운 천연 항산화제 개발이 요구되고 있다. 일상적으로 우리가 섭취하

고 있는 각종 식품을 비롯하여 인체에 부작용이 최소화된 약용식물로부터 항산화 효능이 우수한 소재를 도출하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구는 영경귀를 대상으로 뿌리, 잎, 줄기, 꽃 및 씨 등 부위별로 열수추출과 80% 에탄올 추출을 하여 총 플라보노이드와 폴리페놀 함량을 조사하고 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼, NO (nitric oxide) 유사 라디칼 및 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 제거에 대한 항산화 활성을 비교 분석하였으며, 더불어 항염증 설치류 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포주에서 NO와 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등과 같은 염증성 매개물의 억제를 조사한 결과 매우 흥미로운 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), Lipopolysacchride (LPS), Quercetin, potassium ferricyanide, sodium nitrite, trichloroacetic acid, butylated hydroxy anisole (BHA), dimethyl sulfoxide (DMSO), Folin-Ciocalteu reagent, sodium nitroprusside, sulfanilamide, N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, sodium carbonate, aluminum chloride, phenazine methosulfate, sulphanilamide, sodium chloride, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole (MTT) 및 기타 시약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich사(MO, USA)로부터 구입하였다. Prostaglandin E₂(PGE₂) assay kit은 R&D Systems (Minneapolis, USA)사로부터 구입하였다. Anti-iNOS, anti-COX-2 antibody는 Santa cruz biotechnology Inc.(California, USA)로부터 구입하였다. RPMI 1640 배지, fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

2) 부위별 영경귀 추출

실험에 사용한 전라북도 임실군 오수면 소재 임실생약영농조합법인에서 재배한 영경귀(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)는 우석대학교 한의과대학 방제학교실의 김홍준 교수에게 의뢰하여 동정하였고, 표본(2011-011)은 전주대학교 대체의학대학 건강관리 연구실에 보관하고 있다. 잎, 줄기와 꽃은 2011년 5월 30일에 채취하였으며, 씨는 2011년 6월 10일에 얻었고, 뿌리는 2010년 11월 10일에 채취하여 사용하였다. 잘 말려진 각각의 시료는 200g를 분말로 제조하여 증류수 (3 L)로 3시간 동안 추출기로 열수 추출하였다. 추출물은 0.45 μm 필터를 사용하여 여과한 후 동결건조기 (Eyela FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 건조하여 48.9 g를 회수한 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 또한 각각의 분말화된 시료 200 g를

80% 알코올(2 L)에 7일간 방치한 후 용액을 취하여 3,000 rpm으로 원심침전 시키고 상층액만 취하여 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과한 후 회전진공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 시료를 회수한 후 동결건조하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis법¹⁹⁾에 따라 메탄올 1 mg/mL의 농도로 용해한 각 용매별 추출액, Folin-Ciocalteu시약 및 10% NaCO₃용액을 각각 1 ml씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 방치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)를 0-100 μ g/mL의 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드는 Moreno등²⁰⁾의 방법에 따라 1 mg/mL 농도의 시료액에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 방치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하여 0-100 μ g/mL 농도범위에서 얻은 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다

3) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois의 방법²¹⁾으로 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 15, 30, 60, 125, 250 및 500 μ g/mL이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 μ L를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 μ L를 넣어 총량이 200 μ L가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(Molecular Devies, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%) =

$$\{1-(\text{첨가군 흡광도}/\text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

4) 아질산염 소거 활성 측정

Gray와 Dugan의 방법²²⁾에 따라 일정 농도의 시료 1 mL에 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL를 가한 뒤 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer를 이용하여 각각 pH 1.2, 3.0 및 6.0으로 보정한 다음 총 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 다음 각 반응액 1 mL를 취하여 2% acetic acid 3 mL과 30% acetic acid 용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 mL를 가하고 잘 혼합하여 실온에서 15분간 방치한 후 ELISA reader (Molecular Devies, USA)로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거 활성은 시료 용

액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

아질산염 소거 활성(%) =

$$\{1-(\text{첨가군 흡광도}/\text{무첨가군흡광도})\} \times 100$$

5) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등²³⁾의 방법에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6mM을 혼합한 다음 실온·압소에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성한 다음 ABTS 용액을 실험직전에 732 nm에서 흡광도가 0.70 \pm 0.03 (mean SE)이 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 추출물(1 mg/mL) 50 μ L에 준비된 ABTS 용액 950 μ L를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성(%) =

$$\{1-(\text{첨가군 흡광도}/\text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

6) MTT 분석

설치류 RAW 264.7 대식세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), penicillin G (100 IU/mL)와 streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하여 습기가 충분하고 37 $^{\circ}$ C가 유지되는 CO₂ 배양기(5% CO₂와 95% 공기)에서 배양하였다. RAW 264.7 대식세포(1 \times 10⁶/mL)는 여러 농도의 추출물을 2시간 동안 처리한 후 LPS (1 μ g/mL)을 주입하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다.

7) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변환한다. 그리스 시약 (Griss reagent : 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μ L의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μ L씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 그 샘플 빛의 흡수는 spectrophotometer(MD, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산산염의 농도 정도는 아질산염의 표준곡선으로부터 계산하였다.

8) PGE₂의 측정

RAW 264.7 대식세포(1 \times 10⁶/mL)를 여러 가지 농도 (25-200 μ g/mL)의 추출물을 2시간동안 전 처리한 후 LPS (1 μ g/mL)로 자극 한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 24시간 후에 상층액을 얻어 PGE₂를 측정하였다. PGE₂의 측정 방법은 R&D사(Minneopolis, U.S.A.)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였다.

9) iNOS와 COX-2의 Western blot

추출물이 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법⁽²⁴⁾에 따라 정량하고 50 μ g을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 triton-tris buffered saline (TTBS)로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 tris buffered saline (TBS)로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1 : 1,000) 또는 anti-COX-2 (1 : 500)를 주입하여 3 시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 goat anti-rabbit IgG(1 : 2,000)을 첨가하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 enhanced chemiluminescence (ECL)방법으로 발색시켰다.

10) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준오차(mean \pm SD)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중범위검증(Duncan's multiple range test)에 의한 사후분석을 수행하였다.

결 과

1. 엉겅퀴 부위별 추출물의 총 플라보노이드와 폴리페놀의 함량

본 연구는 엉겅퀴 부위별 열수 및 에탄올 추출물에 따른 항산화 활성에 매우 중요한 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량에 어떠한 차이가 있는 지 알아보았다. 흥미롭게도 Table 1과 같이 엉겅퀴 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량은 0.82배 높았고, 총 플라보노이드 함량은 1.45배 높게 나타났다. 조사된 엉겅퀴 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량은 뿌리에 비해 잎 과 꽃 추출물이 각각 2.3배에서 2.4배 높게 나타났으며, 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량의 경우에서도 열수 추출물과 비슷하게 약 2.3배 높았다. 또한 총 플라보노이드 함량의 경우에서도 뿌리의 열수추출물에 비해 잎 추출물은 1.6배 높게 나타났으며, 뿌리의 에탄올 추출물에 비해 잎 추출물이 1.9배 높게 나타났다. 더불어 조사된 엉겅퀴 부위별 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량은 잎 추출물이 가장 높게 나타났으며, 뿌리와 줄기에 비해 꽃과 씨에서 그 함량이 높았다.

Table 1. Total flavonoid and polyphenol contents of the extracts of *C. japonicum* var. *ussuriense* the extracts

Kind ¹⁾	Total polyphenol (mg/g)		Total flavonoid (mg/g)	
	Water extract	Ethanol extract	Water extract	Ethanol extract
Leaves (CLE)	74.0 \pm 1.036 ^{d)}	62.1 \pm 0.992 ^{e)}	204.5 \pm 0.374 ^{e)}	201.1 \pm 2.158 ^{e)}
Stems (CSTE)	40.7 \pm 1.342 ^{b)}	26.4 \pm 0.375 ^{a)}	144.3 \pm 0.001 ^{b)}	104.5 \pm 3.290 ^{a)}
Flowers (CFE)	70.3 \pm 1.507 ^{e)}	61.3 \pm 0.375 ^{d)}	190.8 \pm 0.373 ^{d)}	180.4 \pm 1.645 ^{d)}
Seeds (CSE)	54.5 \pm 0.507 ^{c)}	44.1 \pm 0.375 ^{c)}	145.2 \pm 0.324 ^{c)}	147.2 \pm 3.290 ^{c)}
Root (CRE)	30.2 \pm 0.657 ^{a)}	26.6 \pm 1.125 ^{b)}	127.4 \pm 3.324 ^{a)}	106.4 \pm 3.158 ^{b)}

¹⁾The extracts of the roots, leaves, flowers, stems and seeds from *C. japonicum* var. *ussuriense* was prepared by extracting with water or 80% ethanol.

^{a-e)} Values with the different letter are significantly different by Duncan's multiple range test.

2. 엉겅퀴 부위별 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

엉겅퀴 부위별 열수추출물과 알코올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 알아보기 위해 합성 항산화제로 잘 알려진 butylated hydroxytoluene (BHT)와 비교하여 조사하였다. 엉겅퀴 부위별 열수 및 알코올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 비교하기 위해서 모든 엉겅퀴 추출물의 농도를 500 μ g/ml로 고정하여 반응시킨 후 DPPH 라디칼 소거 활성이 정점에 달하는 30분에 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 엉겅퀴 꽃과 씨 알코올 추출물이 열수 추출물에 비해서 다소 높은 항산화 활성을 보여주었지만, 잎과 줄기 그리고 뿌리에서는 열수추출물이 알코올 추출물에 비해서 항산화 활성이 높았다. 잎의 경우 열수 추출물과 알코올 추출물이 각각 72.5 \pm 2.3%와 70.7 \pm 2.4%로 나타났으며, 꽃의 경우 열수 추출물과 알코올 추출물이 각각 75.3 \pm 2.5%와 80.6 \pm 2.6%로 나타나 BHT(82.5 \pm 2.1%)와 유사한 DPPH 라디칼 소거 활성을 보여주었다.

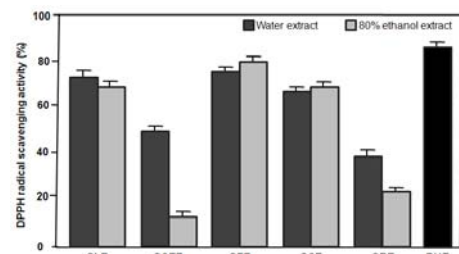


Fig. 1. Effects of *C. japonicum* var. *ussuriense* the extracts on DPPH radical scavenging activity. The extracts of the leaves (CLE), stems (CSTE), flowers (CFE), seeds (CSE), and roots (CRE) from *C. japonicum* var. *ussuriense* was prepared by extracting with water or 80% ethanol. DPPH radical scavenging activity of each extract (500 μ g/mL) was measured at 30 min as described in the section of Materials and Methods. Values are shown as mean \pm S.D. of 3 replicates.

2. NO 유사 라디칼 소거 활성

엉겅퀴 부위별 열수추출물과 알코올 추출물의 NO 유사 라

디칼 소거 활성을 알아보기 위해 vitamin C (L-ascorbic acid)와 비교하여 조사하였다. 영경귀 부위별 열수 및 알코올 추출물의 NO 유사 라디칼 소거 활성을 비교하기 위해서 모든 영경귀 추출물의 농도를 1,000 μ g/ml로 고정하여 반응시킨 후 측정하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 영경귀 씨와 뿌리 알코올 추출물이 열수 추출물에 비해서 다소 높은 항산화 활성을 보여주었지만, 잎과 줄기 그리고 꽃에서는 열수추출물이 알코올 추출물에 비해서 항산화 활성이 높았다. 잎의 경우 열수 추출물과 알코올 추출물이 각각 $29.5 \pm 1.2\%$ 와 $28.5 \pm 1.3\%$ 로 나타났으며, 꽃의 경우 열수 추출물과 알코올 추출물이 각각 $31.2 \pm 1.3\%$ 와 $24.6 \pm 1.2\%$ 로 나타나 vitamin C ($37.5 \pm 1.4\%$) 보다 낮았으나 우수한 NO 유사 라디칼 소거 활성을 보여주었다.

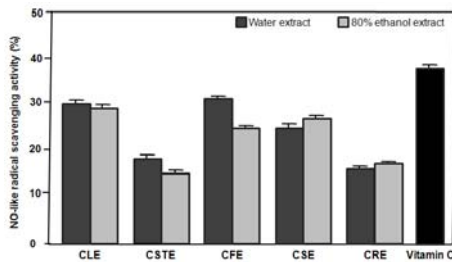


Fig. 2. Effects of *C. japonicum* var. *ussuriense* the extracts on NO-like radical scavenging activity. The extracts of the leaves (CLE), stems (CSTE), flowers (CFE), seeds (CSE), and roots (CRE) from *C. japonicum* var. *ussuriense* was prepared by extracting with water or 80% ethanol. NO-like radical scavenging activity of each extract (500 μ g/mL) was measured by Griess reagent as described in the section of Materials and Methods. Values are shown as mean \pm S.D. of 3 replicates.

3. ABTS 라디칼 소거 활성

영경귀 부위별 열수추출물과 알코올 추출물의 ABTS 유사 라디칼 소거 활성을 알아보기 위해 vitamin C와 BHT 등 잘 알려진 항산화제와 비교하여 조사하였다. 영경귀 부위별 열수 및 알코올 추출물의 ABTS 유사 라디칼 소거 활성을 비교하기 위해서 모든 영경귀 추출물의 농도를 1,000 μ g/ml로 고정하여 반응시킨 후 측정하였다. 그 결과 Fig. 3와 같이 영경귀 씨와 뿌리는 알코올 추출물이 열수 추출물에 비해서 다소 높은 항산화 활성을 보여주었지만, 잎과 줄기 그리고 꽃에서는 열수추출물이 알코올 추출물에 비해서 항산화 활성이 높았다. 잎의 경우 열수추출물과 알코올 추출물이 각각 $90.15 \pm 1.3\%$ 와 $82.5 \pm 1.5\%$ 로 나타났으며, 꽃의 경우 열수 추출물과 알코올 추출물이 각각 $88.7 \pm 1.2\%$ 와 $77.5 \pm 1.3\%$ 로 나타나 vitamin C ($89.5 \pm 1.2\%$) 및 BHT ($91.8 \pm 1.1\%$)와 매우 유사하게 우수한 ABTS 라디칼 소거 활성을 보여주었다.

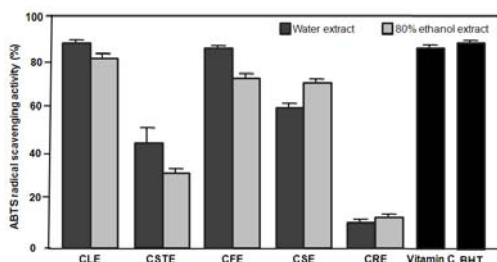


Fig. 3. Effects of *C. japonicum* var. *ussuriense* the extracts on ABTS radical scavenging activity. The extracts of the leaves (CLE), stems (CSTE), flowers (CFE), seeds (CSE), and roots (CRE) from *C. japonicum* var. *ussuriense* was prepared by extracting with water or 80% ethanol. ABTS radical scavenging activity of each extract (500 μ g/mL) was measured by ABTS assay method as described in the section of Materials and Methods. Values are shown as mean \pm S.D. of 3 replicates.

4. 세포 생존율에 미치는 영경귀 잎 열수추출물의 효과

앞에서 조사한 항산화 활성이 우수한 영경귀 열수추출물인 CLE가 LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포(1×10^5 /mL)를 RPMI 1640(1% P/S, 10% FBS) 배지를 사용하여 세포 부유액을 만든 다음 여러 가지 농도의 CLE를 주입하고 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때, LPS만 자극하였을 경우 $78.3 \pm 2.5\%$ 로 감소되었으나, CLE 처리군은 농도에 의존적으로 세포생존율이 증가되었다($p < 0.05$ 와 $p < 0.01$). 따라서 본 연구에 사용된 CLE의 어느 농도에서도 세포독성은 없었고, 오히려 LPS 자극에 대한 세포 보호 효과가 있었다.

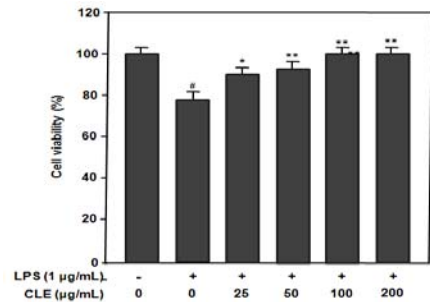


Fig. 4. Effects of *C. japonicum* var. *ussuriense* the leaf extracts (CLE) on cell viability in LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Cells were pretreated with or without CLE at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 μ g/mL) for 24 h. Cell viability were measured by MTT assay as described in the section of Materials and Methods. Values are means \pm SD of three independent experiments. # $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.05$ versus control group treated with LPS alone.

5. NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 영경귀 잎 열수추출물의 효과

영경귀 잎 열수추출물인 CLE가 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포 (1×10^5 /mL)를 접종하고 4시간 후에 CLE를 25-200 μ g/mL의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS (1 μ g/mL)로 자극한 후 24시간 배양하고 배양액에 축적된 아질산염을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5A과 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 LPS로 자극하였을 경우 $18.5 \pm 1.8 \mu$ M로 증가되었으나($p < 0.001$), CLE 처리군은 농도에 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다. 특히 100-200 μ

g/mL CLE 처리군에서는 그 효과가 뚜렷하였다($p < 0.01$). NO 생성에 있어 CLE의 억제효과에 대한 기전을 알아보기 위하여 배양세포의 iNOS 발현을 조사하였다. 그 결과 NO 생성에 대한 CLE의 억제 현상과 같이 iNOS 발현이 농도에 의존적으로 억제하였다(Fig. 5B). 이러한 결과는 CLE가 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

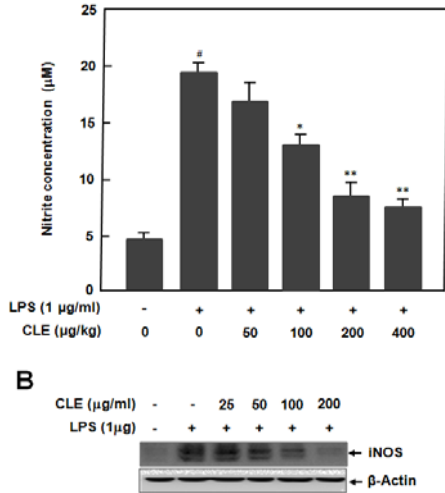


Fig. 5. Effects of *C. japonicum* var. *ussuriense* the leaf extracts (CLE) on LPS-induced NO production and iNOS expression in RAW 264.7. Cells were pretreated with or without CLE at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 µg/mL for 18 h (iNOS) or 24 h (NO)). (A) NO produced by cells was measured by the method of Griess. (B) Western blot analysis on iNOS expression was carried out as described in the section of Materials and Methods. Values are means ± SD of three independent experiments. [#] $p < 0.001$ versus the non-treated control group. ^{*} $p < 0.05$ and ^{**} $p < 0.05$ versus control group treated with LPS alone.

6. PGE₂ 생성과 COX-2 발현에 미치는 CLE의 영향

영경귀 잎 열수추출물인 CLE가 PGE₂ 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포 (1×10^5 /mL)를 접종하고 4시간 후에 CLE를 25-200 µg/mL의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS (1 µg/mL)로 자극한 후 24시간 배양하고 배양액에 축적된 PGE₂를 측정하였다. 그 결과 Fig. 6A와 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 LPS로 자극하였을 경우 $4,210.45 \pm 389.57$ pg/mL로 증가되었으나, 25 µg/mL CLE 처리군을 제외한 50-200 µg/mL CLE 처리군은 농도에 의존적으로 PGE₂ 생성율이 감소되었다. 특히 200 µg/mL CLE 처리군에서는 그 효과가 우수하였다($p < 0.01$). 이와 같이 CLE가 PGE₂ 생성 억제에 대한 효과를 알아본 후 COX-2의 활성 및 발현에 미치는 CLE의 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포(1×10^6 /mL)를 접종하고 4시간 후에 CLE를 25-200 µg/mL의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS (1 µg/mL)로 자극한 후 18시간 배양하고 세포를 수확하여 lysis buffer로 세포를 용출시키고 COX-2의 활성과 발현을 측정하였다. 그 결과 PGE₂ 생성에 대한 CLE

의 억제 현상과 같이 COX-2 활성과 발현이 농도에 의존적으로 억제하였다(Fig. 6B). 이러한 결과는 CLE가 COX-2 활성과 발현을 억제함으로써 PGE₂ 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

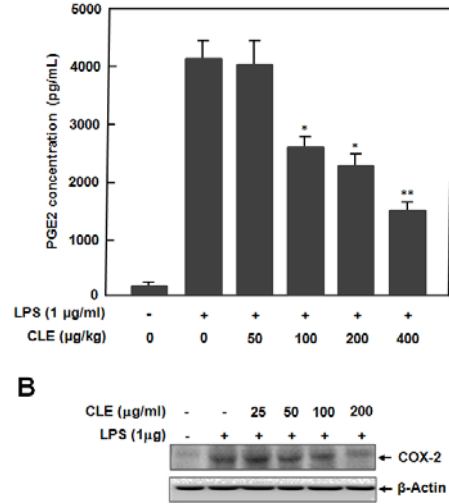


Fig. 6. Effects of *C. japonicum* var. *ussuriense* the leaf extracts (CLE) on LPS-induced PGE₂ production and COX-2 expression in RAW 264.7. Cells were pretreated with or without CLE at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 µg/mL for 18 h (COX-2) or 24 h (PGE₂)). (A) PGE₂ produced by cells was measured by ELISA assay (B) Western blot analysis on COX-2 expression was carried out as described in the section of Materials and Methods. Values are means ± SD of three independent experiments. [#] $p < 0.001$ versus the non-treated control group. ^{*} $p < 0.05$ and ^{**} $p < 0.05$ versus control group treated with LPS alone.

고찰

산화적 스트레스는 생체에서 산화촉진제(prooxidant)와 항산화제(antioxidant)의 불균형을 유발하여 각종 질환을 일으키는 것으로 알려졌다²³⁾. 특히 인체에 있어서 노화 또는 심혈관계 만성질환을 앓고 있는 환자의 경우 대량의 활성 산소가 생산되어 세포나 조직에 치명적 손상을 주게 된다^{7,14,16,23)}. 그러므로 만성 및 염증성 질환을 예방하거나 치료하기 위해서는 생체에 존재하는 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소의 활성유지는 물론 비타민 C와 E, 셀레늄을 비롯한 폴리페놀과 플라보노이드와 같은 외부 천연물질을 적당하게 섭취하는 것이 매우 중요하다. 최근에 슈퍼옥사이드 음이온(O₂⁻), H₂O₂, ONOO⁻ 및 NO 등과 같은 활성 산소를 효과적으로 제거할 수 있는 천연물 유래 항산화 물질 발굴에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

따라서 본 연구는 혈행과 관련된 만성 염증성 질환에서 나타나는 활성산소를 제거하기 위한 효과적인 천연물을 발굴하고자 전북 임실군 오수면 임실생약조합영농법인 농장에서 재배한 영경귀의 잎, 줄기, 꽃, 씨 그리고 뿌리 등 부위별로 열수와 에탄올을 활용하여 각각의 추출물을 얻고 이들의 항산화 효과를 검증한 결과 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 잎과 꽃에서 가장 높았고, 알코올 추출물에 비해서 열수추출물의 함량이 높았다(Table 1). 또한 영경귀 부위별 항산화 활성을 알아보기 위해서 DPPH, NO 유사 그리고 ABTS 라디

칼에 대한 소거 활성을 조사한 결과 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 높은 잎과 꽃의 열수 추출물에서 그 활성이 가장 높게 나타났으며, BHT 또는 vitamin C와 유사한 활성을 보였다. 잎과 꽃의 열수추출물은 뿌리에 비해서 2배 이상 DPPH와 NO 유사 라디칼의 소거 활성이 높았으며, 특히 ABTS 라디칼 소거 활성은 5배 이상 높았다. 이러한 결과로부터 얻은 항산화 활성물질이 알콜 용해성 물질 보다는 수용성 물질이 많은 것으로 사료된다. 폴리페놀과 플라보노이드 계열의 화합물은 항산화 효과가 우수한 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 일반적으로 녹차를 비롯한 녹황색 채소의 경우 폴리페놀과 플라보노이드 계열의 화합물이 많이 함유되어 있어 인체의 만성 질환을 예방하거나 개선하는데 활용되고 있다^{18,23)}. 영경귀 부위별 추출물을 대상으로 DPPH 라디칼 소거 활성과 영양소에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만^{26,27)}, NO 유사 및 ABTS와 같은 라디칼의 소거 활성에 대한 조사는 없는 실정이다. 이와 같이 본 연구에 의해 밝혀진 영경귀 부위별 열수 추출물 중 잎과 꽃 유래 항산화 활성이 우수한 효과를 발휘하는 물질은 수용성 플라보노이드와 폴리페놀 성분이 다량 함유되었기 때문인 것으로 사료된다.

영경귀는 apigenin, luteolin, myricetin, kaemferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-neo-hesperioside flavonoid(apigenin, luteolin, myricetin, kaemferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-neo-hesperioside 등 플라보노이드 계열의 화합물이 풍부하게 함유되어 항염증, 항암, 항돌연변이, 항진균, 신경보호 및 면역 증진에 대한 생리활성이 우수한 것으로 알려졌다⁵⁻⁹⁾. 특히 영경귀 성분 중 apigenin은 잎, 줄기, 꽃 등에 함유된 물질로 예방 효과 및 신경 보호 효과, 항염증, 항균작용 등의 생리 활성이 있다고 보고되었으며, 류마티스성 관절염 치료에도 효과가 있는 것으로 알려졌다²⁸⁻³⁰⁾.

인체에 나타나는 거의 모든 질환은 염증을 동반하므로 이를 개선 또는 치료하는 데는 항염증 효과를 나타내는 약물을 일반적으로 사용하고 있다. 그러므로 본 연구에서 조사된 영경귀 부위별 항산화 활성이 가장 좋은 영경귀 잎 열수추출물인 CLE를 대상으로 염증 매개물로 잘 알려진 NO의 PGE₂ 생성에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 NO와 PGE₂생성의 생성억제에 대한 CLE의 효과 기전은 각각 iNOS(Fig. 5)와 COX-2의 발현을 억제함으로써 이루어짐을 확인할 수 있었다. NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포를 LPS로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하면서 활성화 된다³¹⁾. 또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 소량의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 활성화된 대식세포로부터 과량의 prostanoid생성은 면역반응에 관여하여 다양한 염증성 질환의 원인이 된다³²⁾.

한편 인체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필연적으로 염증성 사이토카인이 동반되는데, 대표적인 사이토카인으로는

interleukin-1 β (IL-1 β)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)이다. IL-1 β 는 대표적인 전 염증성 사이토카인이다. IL-1 β 의 수용체는 TNF- α 의 수용체와 명확히 다른 구조를 가지고 있는데도 면역 생물학적 기능으로 볼 때 다른 사이토카인보다 TNF- α 와 매우 밀접한 관련이 있다. 일반적으로 IL-1 β 는 생체에서 매우 낮은 농도로 작용하는데, 낮은 농도에서는 세포 성장이나 체내 항상성 유지에 필요하지만, 염증반응이나 상처 또는 면역학적 자극을 주었을 때는 대량으로 생산되어 인체 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다³³⁾. 또한 TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에서 대량 생산되지만, 림프oid계의 세포(lymphoid cells), 비만세포(mast cells), 내피세포(endothelial cells)을 비롯하여 생체에 존재하는 다양한 세포에서도 생산된다³⁴⁾. 특히 LPS 또는 IL-1으로 자극할 경우 대량 생산된다. 따라서 본 연구에서 처음에 밝힌 영경귀 잎 열수 추출물인 CLE를 대상으로 NO와 PGE₂염 생성 억제에 대한 기전 이외에도 향후 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등 염증성 사이토카인의 생성억제 및 그 기전을 규명할 필요성이 있다.

이상의 결과를 종합해볼 때 DPPH, NO 유사 및 ABTS 라디칼 소거 활성이 가장 우수한 잎과 꽃의 열수 추출물의 항산화 효과는 이들이 함유한 총 폴리페놀과 플라보노이드의 높은 함량 때문이고, 더불어 LPS에 의해 유도되는 RAW 264.7 대식세포에서 생산되는 과량의 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개물을 효과적으로 억제한 것은 각각 iNOS와 COX-2 분자 발현을 효과적으로 억제하였기 때문인 것을 알 수 있었다. 그러므로 영경귀 잎의 열수 추출물은 활성산소와 관련된 인체질환을 개선 또는 치료하는데 활용할 수 있는 좋은 소재라 사료된다.

결론

영경귀의 잎, 줄기, 꽃, 씨 및 뿌리는 출혈, 혈전 및 염증을 개선 또는 치료하는데, 전통적으로 활용되어 왔다. 본 연구는 영경귀의 부위별 항산화 활성을 밝히고 항산화 활성이 가장 좋은 잎의 열수추출물인 CLE를 대상으로 항염증 활성을 규명하였다. 영경귀 잎과 꽃의 열수 추출물은 알코올 추출물에 비해 DPPH, NO 유사 및 ABTS 소거 활성이 줄기, 씨 그리고 뿌리 추출물에 비해서 매우 높았으며, 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량도 높았다. 더불어 본 연구는 항산화 활성이 가장 우수한 영경귀 잎의 열수 추출물인 CLE를 대상으로 항염증 효과를 알아본 결과 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 iNOS와 COX-2 분자발현을 효과적으로 억제함으로써 NO와 PGE₂ 생성을 현저히 억제하는 기전을 밝혔다. 그러므로 영경귀 잎의 열수 추출물은 활성산소와 관련된 인체질환을 개선 또는 치료하는데 활용할 수 있는 좋은 소재라 사료된다.

참고문헌

1. Lee SJ. Korean folk medicine. Seoul National University Press, Seoul, 1996 ; 145-146.

2. Ishida H, Umino T, Tosugee T. Studies on antihemorrhagic substance in herbs classified hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem Pharm Bull*, 1987 ; 35 : 861.
3. Shin, MK. Clean clinical herbology(정화 임상 본초학). Younglimsa, 2010.
4. Chung CJ. Thistle plant as a resources of many utilizing value. *The Korea Plant Conservation Society*, 1993 ; 372.
5. Chung MS, Um HJ, Kim CK, Kim GH. Development of functional tea product using *Cirsium japonicum*. *Korean J Food Culture* 2007 ; 22 : 261-265.
6. Liu S, Luo X, Li D, Zhang J, Qui D, Liu W, She L, Yang Z. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *Int Immunopharmacol*. 2006 ; 6 : 1389-1393.
7. Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU, Yu CY. Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* Kitamura. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2003 ; 11 : 53-61.
8. Kim SJ, Kim GH. Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. *J Food Sci Nutr*. 2003 ; 8 : 330-335.
9. Lee MK, Moon HC, Lee JH, Kim JD, Yu CY, Lee HY. Screening of immune enhancing activities in medicinal herbs, Compositae. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2002 ; 10 : 51-57.
10. Park JC, Hur JM, Park JG, Kim SC, Park JR, Choi SH, Choi JW. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother*. 2004 ; 18 : 19-24.
11. Lee JH, Choi SI, Lee YS, Kim GH. Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanol extract from leaves of *Cirsium japonicum*. *Food Sci Biotechnol*, 2008 ; 17 : 38-45.
12. Wiseman H. Dietary influences on membrane function ; impotent in protection against oxidative damage and disease. *Nutr, Biochem*, 1996 ; 7 : 2-6.
13. Shin DH. The study course and movement of natural antioxidants. *Korean Dood Sci, Technol*, 1997 ; 30 : 14-18.
14. Kondo T., Hirose M. Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J. Atheroscler Thromb*. 2009 ; 6 : 532-538.
15. Mimeault M, Batra SK. Recent advances on skin-resident stem/progenitor cell functions in skin regeneration, aging and cancers and novel anti-aging and cancer therapies. *J. Cell Mol, Med*, 2010 ; 14 : 116-134.
16. Geronikaki AA, Gavalas AM. Antioxidants and inflammatory disease : synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2006 ; 9 : 425-442.
17. Kumar S., Kuma D., Manjusha., Saroha K., Singh N., Vashishta B. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharm*, 2008 ; 58 : 215-220.
18. Frankel EN. Antioxydants in lipid foods and their on quality. *Food Chem*, 1996 ; 57 : 51-54.
19. Peterson DM., Emmons CL, Hibbs AH. Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions fractions of oat groats. *J Cereal Sci*, 2001 ; 33 : 97-103.
20. Moreno DA., Carvajal M., López-Berenguer C., García-Viguera C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal*, 2006 ; 41 : 1508-1522.
21. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958 ; 181 : 1199-1200.
22. Gray JI., Dugan JRL. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci*, 1975 ; 40 : 981-985.
23. Bengmark S., Mesa MD., Gil A. Plant-derived health : the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp*, 2009 ; 24 : 273-281.
24. Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 1976 ; 72 : 248-254.
25. Peterson DM., Emmons CL., Hibbs AH. Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *J Cereal Sci*, 2001 ; 33 : 97-103.
26. Kim EM, Comparison of physiochemical composition and Antioxidative activity of Korean and Chinese *Cirsium japonicum*. *The Korean J Culinary Research*, 2009 ; 15 : 284-293.
27. Lee SH, Kim YS, Heo SI, Sa JH, Choi DS, Wang MH. Composition Analysis and Antioxidative Activity from Different Organs of *Cirsium setidens* Nakai. *Korean J Food Sci*, 2006 ; 571-576.
28. Jordon - Thaden, I.E. and Louda S.A. Chemistry of *Cirsium* and *Carduus* : A Role in Ecological

- Risk Assessment for Biological Control of Weeds?
Biochemical Systematics and Ecology 2003 ;
31(12) : 1353-1396.
29. Iwashina T., Kadota Y., Ueno T., Ootani S. Foliar flavonoid composition in Japanese *Cirsium* species(Compositae), and their chemotaxonomic significance. *J. Japanese Bot.* 1995 ; 70 : 280-290
 30. Kaneta, M., Hikichi, H., Endo, S. and Sugiyama, N. Identification of flavonoids in sixteen Compositae species. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry* 1978 ; 42(2) : 475-477.
 31. Ahmad N., Chen LC., Gordon MA., Laskin JD., Laskin DL. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *J Leukocyte Biol.* 2002 ; 71 : 1005-1011.
 32. Chen YC., Shen SC., Chen LG., Lee TJ., Yang LL. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol.* 2001 ; 61 : 1417-1427.
 33. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw.* 1994 ; 5 : 517-531.
 34. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991 ; 88 : 4220-4224.