

## Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activity of Methanol Extract from *Terminalia chebula* Retz., *Lavandula spica* L., and *Dalbergia odorifera* T. in RAW 264.7 Cells

In Gyeong Chae, Mi Hee Yu, Hyuk Il Kim and In Seon Lee\*

Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received January 17, 2011 / Accepted March 11, 2011

This study was performed to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant activities of methanol extract from natural products. Cell viability was determined by MTT assay. The production of NO and TNF- $\alpha$  were measured by Griess assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In order to effectively screen for anti-inflammatory agents, we first examined the inhibitory effects of 24 natural products on the production of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells. Three extracts of *Terminalia chebula* Retz., *Lavandula spica* L., and *Dalbergia odorifera* T. significantly inhibited NO production. The three extracts significantly decreased production of NO in a dose-dependent manner. *Terminalia chebula* Retz. decreased TNF- $\alpha$  production. Antioxidative effects of the three extracts were measured based on polyphenol and flavonoid contents and DPPH radical scavenging activity assay. The three extracts showed high polyphenol contents as well as strong DPPH scavenging activities. In particular, *Terminalia chebula* Retz. contained the highest polyphenol and flavonoid levels of 616 and 96  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respectively, compared to *Lavandula spica* L. and *Dalbergia odorifera* T. As DPPH radical scavenging activities,  $\text{RC}_{50}$  values of *Terminalia chebula* Retz. were 2.09  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Key words** : Anti-inflammatory, anti-oxidative, *Dalbergia odorifera* T. Chen., *Lavandula spica* L., *Terminalia chebula* Retz.

### 서 론

염증반응은 인체 내 대부분의 기관에서 유발되는 기본적인 면역반응으로 급성과 만성으로 나누어지는데[19], 급성염증반응은 물리적 자극이나 외부 감염 등에 의해 즉각적으로 조직손상을 유발하는 반면, 만성 염증 반응은 급성보다 오래 걸리고 지속적이며 단핵구나 대식세포, 림프구, 혈장세포 등의 침윤을 동반하는 특징이 있으며, 조직 파괴와 치유과정을 통해 혈관신생이나 섬유화를 유발하게 된다[7,19]. 지속적인 염증반응은 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암과 같은 질환을 발생시킨다[29]. 대식세포는 동물체내 모든 조직에 분포하며 인체 내 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로서, 외부로부터 침입하는 이물질이나 세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 식균작용을 하는 고전적인 기능[11]과 함께 염증반응 시에는 nitric oxide (NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다[12]. 염증 유도 사이토카인(pro-inflammatory cytokines), nitric oxide (NO)와 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)가 inducible NO synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 다량 생성된다[22]. 혈관

내피로부터 유래된 NO는 강력한 혈관 확장제로 작용함으로써 혈관항상성을 유지시키는 반면, 염증상태에서의 과도한 NO의 생성은 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 급성과 만성염증에 대한 반응으로 조직의 손상 및 유전자 변이 등을 일으킬 수 있다[21,23,26]. 또한, 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 세포막에 존재하며, macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1b (IL-1B)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다[1,14,15,20,24].

한편, NO, HNO<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>와 같은 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 염증반응 시 대식세포, 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성되며, 이때 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)도 같이 생성된다[5,8]. 염증반응의 조절은 대단히 복잡하며, 생체 내 복구체계의 증강 및 손상을 감소시키기 위한 일련의 활성기전이며, 모든 조직에서 잘 조절되는 것으로 알려져 있다. 그러나 반복되는 조직의 손상이나 재생에 의해 염증 반응이 지속되면 염증 관련 세포에서 ROS와 RNS가 과다 생성되고 그 결과 영구적인 유전자의 변형이 야기된다. 이처럼 ROS와 RNS는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증반응과 깊이 관련되

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5538, Fax : +82-53-580-5538  
E-mail : inseon@kmu.ac.kr

어 있다[2].

현재까지 치료에 사용했던 대부분의 항염증제들이 장기복용 할 경우 출혈성 위장관 궤양, 신장기능 저하, 혈압상승 등의 부작용과 함께 심근경색 및 혈전형성 등의 순환계 질환도 유발할 수 있다고 보고되었다[4]. 효능과 안전성이 우수한 새로운 항염증제 개발에 관심을 가지게 되었으며, 다양한 분야에서 새로운 항염증제 개발을 위한 많은 연구들이 수행되었다[3,25,27]. 따라서 본 연구에서는 비교적 부작용이 적은 천연물을 이용하여 항염증 및 항산화 활성을 검색하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료 제조

24종의 건조 상태 시료 1 kg을 구입하여 가법계 수세하여 건조한 후, 시료 무게의 10배량(w/v)의 70% 메탄올을 가하여 실온에서 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No. 3, Maidstone, England)를 사용하여 2회 여과하고, 상등액은 rotary vacuum evaporator (EYELA UNI TRAP UT-1000, Tokyo, JAPAN)로 55°C에서 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

### 세포주 배양

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양 받았으며, 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/ streptomycin)를 첨가한 DMEM (Gibco-BRL, Rockville, MD) 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2~3회 교체 배양하였다.

### 세포독성 측정

시료의 세포독성을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay를 green 등의 방법[10]으로 측정하였다. RAW 264.7 세포 1×10<sup>5</sup> cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 RAW 264.7 세포는 serum free 배지로 교체한 후 LPS (100 ng/ml)와 시료를 처리하여 각각 24시간 배양하여 5 mg/ml의 MTT 용액 10 µl를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 µl의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

### Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO생성량 측정은 Griess Reagent System의 방법[28]에 따라 RAW 264.7 세포주를 1×10<sup>5</sup> cells/well로 96 well plate에

분주하여 24시간 배양한 후 LPS (100 ng/ml)와 농도별 sample 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 µl를 96 well plate에 취하고, 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도(µM)는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

### Tumor necrosis factor-α (TNF-α) 생성량 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (invitrogen corporation, Carlsbad, CA, USA)을 수행하였다. 각 시료의 추출물 혹은 LPS를 처리한 배양액을 이용하여 TNF-α 측정에 사용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 µl씩 첨가하여 4°C에서 overnight 시켰다. Washing buffer로 3회 세척한 다음, 100 µl의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate (TMB) substrate를 100 µl씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 µl의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법[9]을 응용하여 측정하였다. 즉 각 메탄올 추출물 시료 1 mg을 증류수 1 ml에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 ml에 2배 희석한 folin 시약 2 ml을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 ml을 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 tannic acid를 이용한 표준곡선은 10, 25, 50, 75, 100 µg/ml가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Moreo [18] 등의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 추출물 0.1 ml와 80% ethanol 0.9 ml을 혼합한 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate 0.1 ml 그리고 80% ethanol 4.3 ml을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 quercetin 검량선과 비교하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였다. Quercetin을 이용한 표준곡선은 5, 10, 25, 50, 75 µg/ml가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 415 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

### α-α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성

DPPH radical에 대한 각 시료의 환원력을 측정하기 위해

99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800  $\mu$ l와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH용액 200  $\mu$ l를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다[30]. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC<sub>50</sub>값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 ascorbic acid를 사용하였으며 시료농도의 1/10이 되도록 첨가하여 같은 방법으로 항산화 효과를 측정하였다.

통계학적 분석

대조군과 추출물 처리군의 실험결과에 대한 통계처리는 Student's t-test로 비교하였다. 통계처리 후 p값이 0.01 미만일 경우(p<0.01) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

가자, 라벤더, 강향이 nitric oxide 생성능에 미치는 영향

활성산소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 최근 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 nitric oxide (NO) 저해에 대한 24종 천연물 추출물(Table 1)의 효과를 25  $\mu$ g/ml의 농도에서 검색해 본 결과, Table 2와 같이 나타났다. LPS에 의해 RAW 264.7 cell로부터 생성되는 NO는 약 40-50  $\mu$ M이었다. 다른 추출물에 비해, No. 3(가자), 12(라벤더), 24(강향)에서 우수한 효과를 나타냈다. 하지만 강향의 세포 생존율이 52.67  $\pm$  5.66%인 것으로 나타나 세포독성으로 인한 NO 저해로 보여 지므로 농도를 낮춰 다음 실험을 진행하였다. 가자, 라벤더, 강향의 농도별 NO 생성을 측정 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 최고농도인 50, 100  $\mu$ g/ml에서 가자와 라벤더는 LPS대조구에 비해 NO 생성량이 20-30%로 감소하였으며(Fig. 1A, 1B), 강향은 10  $\mu$ g/ml에서 NO 생성능이 약 30%로 다른 시료에 비해

Table 1. List of the natural products used

No.	Scientific name
1	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.
2	<i>Corchorus olifolius</i> L.
3	<i>Terminalia chebula</i> Retz.
4	<i>Cuscuta japonica</i> Choisy
5	<i>Citrus junos</i>
6	<i>Dendropanax morbifera</i> Nakai
7	<i>Pinus densiflora</i> Sieb.
8	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.
9	<i>Geranium nepalense</i> Hara.
10	<i>Cymbopogon citratus</i>
11	<i>Picrasma quassioides</i> (D. Don) Benn.
12	<i>Lavandula spica</i> L.
13	<i>Achyranthes japonica</i>
14	<i>Lycium chinense</i> Mill
15	<i>Pueraria thunbergiana</i>
16	<i>Rosahybrida</i> Hort.
17	<i>Artemisia lavandulaefolia</i>
18	<i>Dendropolyporus umbellatus</i>
19	<i>Perillafrutescens</i> (L.) Britton var. <i>acuta</i> Kudo
20	<i>Rehmannia glutinosa</i> var. <i>purpurea</i> (Makino) Makino & Nemoto
21	<i>Equisetum arvense</i> L.
22	<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.
23	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.
24	<i>Dalbergia odorifera</i> T. Chen.

낮은 농도에서 높은 NO 저해활성을 나타내었다(Fig. 1C). 또한, 이들 모든 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 보여 추출물의 항염증 효과는 세포 생존율의 감소와는 관계없음을 보여 준다(Fig. 1).

Cheon [6] 등은 대황 추출물 100  $\mu$ g/ml에서 약 50% NO 생성능, Hyun 등[13]은 백삼, 홍삼, 발효홍삼 50  $\mu$ g/ml에서

Table 2. Effects of methanol extract from natural products on LPS-induced cell viability and NO inhibition in RAW 264.7 cells

No.	Cell viability rate (%)	NO inhibition rate (%)	No.	Cell viability rate (%)	NO inhibition rate (%)
1	95.79 $\pm$ 2.58 <sup>1)</sup>	9.84 $\pm$ 19.49	13	91.29 $\pm$ 3.75	- <sup>2)</sup>
2	80.04 $\pm$ 1.93	3.27 $\pm$ 4.12	14	98.87 $\pm$ 0.88	0.15 $\pm$ 2.99
3	87.72 $\pm$ 2.47	58.98 $\pm$ 2.24	15	79.80 $\pm$ 1.45	21.83 $\pm$ 9.40
4	90.54 $\pm$ 7.25	20.67 $\pm$ 6.66	16	81.28 $\pm$ 7.47	-
5	81.22 $\pm$ 2.36	-	17	95.72 $\pm$ 1.77	8.62 $\pm$ 4.40
6	86.81 $\pm$ 1.98	14.94 $\pm$ 3.86	18	74.07 $\pm$ 1.55	-
7	88.57 $\pm$ 3.05	-	19	94.67 $\pm$ 7.79	4.85 $\pm$ 5.82
8	90.53 $\pm$ 3.72	1.74 $\pm$ 8.19	20	93.45 $\pm$ 6.69	-
9	96.83 $\pm$ 2.30	19.32 $\pm$ 0.96	21	82.63 $\pm$ 3.19	-
10	101.13 $\pm$ 2.09	3.00 $\pm$ 8.39	22	95.71 $\pm$ 3.59	-
11	92.31 $\pm$ 2.51	6.73 $\pm$ 5.73	23	90.31 $\pm$ 0.30	-
12	86.98 $\pm$ 0.62	30.66 $\pm$ 31.64	24	52.67 $\pm$ 5.66	99.27 $\pm$ 0.68

<sup>1)</sup>The culture supernatants were isolated and analyzed for nitrite levels. Data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments (n=3). The concentration of all tested samples was 25  $\mu$ g/ml.

<sup>2)</sup>Not detected.

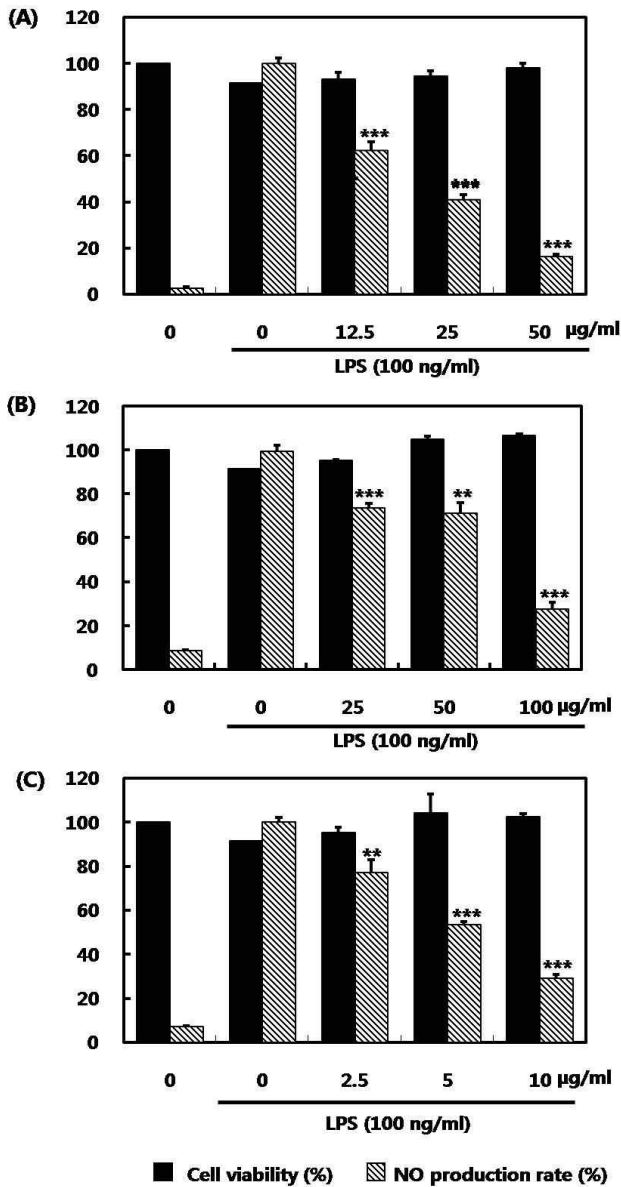


Fig. 1. Inhibition effects of *Terminalia chebula* Retz. (A), *Lavandula spica* L. (B), and *Dalbergia odorifera* T. Chen. (C) on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. The culture supernatants were used to measure NO production. Data represent the mean±SEM of three independent experiments (n=3). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 when compared the groups treated with LPS (100 ng/ml) alone.

약 60% NO 생성능을 보고하였으며, 본 연구의 강향은 10 µg/ml에서 높은 저해활성을 나타내 NO 소거능이 뛰어난 것으로 보여진다.

가자, 라벤다, 강향 추출물이 염증성 사이토카인 TNF-α 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 100 ng/ml의 LPS를 처리했을 때, 처리

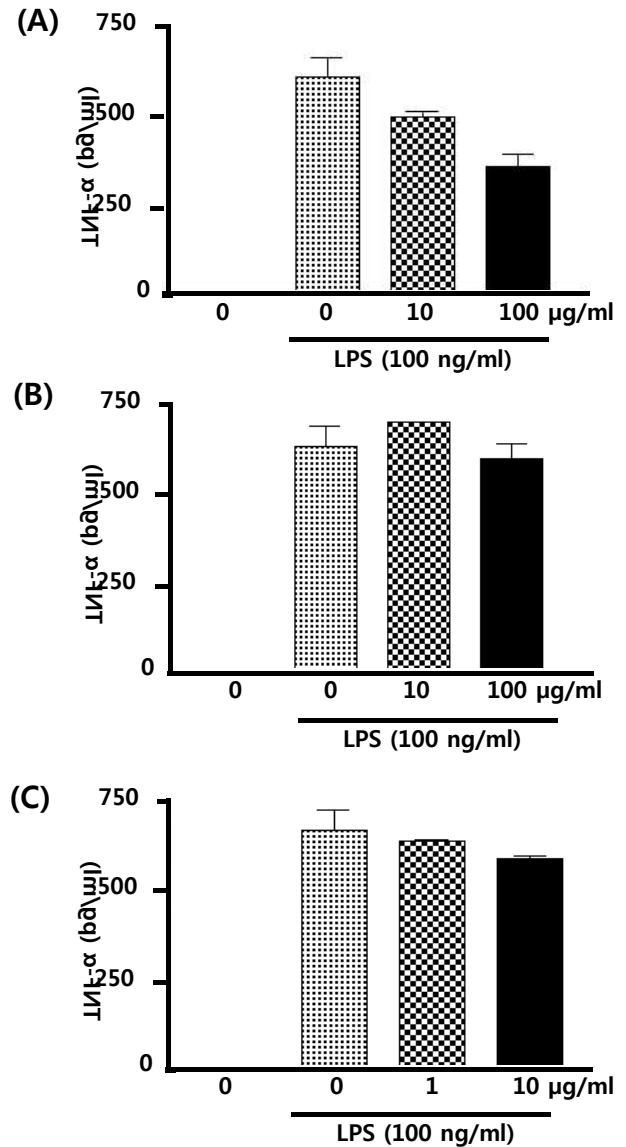


Fig. 2. Effects of *Terminalia chebula* Retz. (A), *Lavandula spica* L. (B), and *Dalbergia odorifera* T. Chen. (C) on LPS-induced TNF-α levels in RAW 264.7 cells. The culture supernatants were isolated and analyzed for TNF-α levels. Data represent the mean±SEM of three independent experiments (n=3).

하지 않은 군에 비해 TNF-α의 생성량은 급격히 증가되었으며, 가자 추출물을 각각 10, 100 µg/ml로 처리했을 때, 100 µg/ml의 농도에서 TNF-α 생성능은 약 50%로 감소하는 것을 보여준다(Fig. 2A). 이에 비해, 라벤더 추출물을 농도별로 각각 10, 100 µg/ml 처리 했을 때는 별다른 영향을 미치지 못했다(Fig. 2B). 강향 추출물 또한, 농도별로 각각 1, 10 µg/ml 처리 했을 때 미미한 감소를 나타냈다(Fig. 2C).

따라서, RAW 264.7 세포주에 LPS와 각 추출물을 처리하여 염증을 유발한 후 염증인자인 NO의 생성, 그리고 proin-

flammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정된 결과, 강향 추출물은 낮은 농도에서 높은 NO저해활성을 나타냈으며, 가자 추출물은 TNF- $\alpha$  생성을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

#### 가자, 라벤더, 강향 추출물의 항산화 활성 검색

가자, 라벤더, 강향 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다(Table 3). 그 결과, 각각의 총 폴리페놀 함량은 가자 616  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 라벤더 73.98  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 강향 161.82  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 세가지 추출물 모두 높은 폴리페놀 함량을 나타냈으며, 특히 가자 추출물의 폴리페놀 함량은 매우 높게 나타났다. 플라보노이드 함량은 가자 96.13  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 라벤더 11.77  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 강향 41.21  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타나, 플라보노이드 함량 역시 가자 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었다.

시료의 free radical 소거활성 측정은 stable radical인

Table 3. Total polyphenols and flavonoids contents of methanol extract from *Terminalia chebula* Retz., *Lavandula spica* L., and *Dalbergia odorifera* T. Chen.

	Total polyphenols <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Total flavonoids <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	616.96 $\pm$ 32.65	96.13 $\pm$ 26.28
<i>Lavandula spica</i> L.	73.98 $\pm$ 5.03 <sup>3)</sup>	11.77 $\pm$ 3.02
<i>Dalbergia odorifera</i> T. Chen.	161.82 $\pm$ 16.79	41.21 $\pm$ 26.28

<sup>1)</sup>Micrograms of total polyphenol content/mg of plants based on tannic acid as standard.

<sup>2)</sup>Micrograms of total flavonoid content/mg of plants based on quercetin as standard.

<sup>3)</sup>Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiments.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of methanol extracts from *Terminalia chebula* Retz., *Lavandula spica* L., and *Dalbergia odorifera* T. Chen.

Samples	Concentration	Scavenging effect (%)	RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	1	28.28 $\pm$ 1.87 <sup>2)</sup>	2.09 $\pm$ 4.01
	5	96.05 $\pm$ 1.38	
	10	96.52 $\pm$ 0.51	
<i>Lavandula spica</i> L.	5	13.41 $\pm$ 7.25	17.25 $\pm$ 2.43
	10	25.92 $\pm$ 8.17	
	25	74.33 $\pm$ 7.23	
<i>Dalbergia odorifera</i> T. Chen.	1	10.11 $\pm$ 1.87	6.31 $\pm$ 4.01
	5	41.96 $\pm$ 1.38	
	10	76.40 $\pm$ 0.51	
Ascorbic acid	1	26.37 $\pm$ 0.69	1.57 $\pm$ 0.07
	2.5	89.09 $\pm$ 5.79	

<sup>1)</sup>Concentration required for 50% reduction of DPPH $\cdot$  at 30 min after starting the reaction.

<sup>2)</sup>Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiments.

DPPH를 사용하여 측정하였는데, DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되며, 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다[17]. DPPH radical을 50% 저해하는 시료의 농도를 RC<sub>50</sub>값으로 표기하였다. 각각의 RC<sub>50</sub>값은 가자 2.09  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 라벤더 17.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 강향 6.31  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며 세가지 시료 모두 낮은 RC<sub>50</sub>값으로 DPPH radical 소거능이 우수하였다. 특히 가자는 천연항산화제인 ascorbic acid (1.57  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )와 비슷한 RC<sub>50</sub>값을 나타내 뛰어난 항산화능을 보였다. 또한, Lee 등[16]은 가자 추출물의 RC<sub>50</sub>값이 3.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 비슷한 결과를 나타냈으며, 마두령, 결명자, 익모초, 갈근은 RC<sub>50</sub>값이 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상으로 나타나 가자의 라디칼 소거능은 매우 우수한 것으로 사료된다.

이들 항산화 활성은 염증관련 세포에서 ROS와 RNS의 생성 억제와 대식세포의 염증반응 억제와도 깊은 관련이 있다[2].

따라서, 가자, 강향, 라벤더 추출물은 NO 저해활성 및 항산화 활성이 대체적으로 우수하였으므로 향후 추가적인 기전연구를 통해 기능성 소재로서의 가능성이 보여진다.

## 감사의 글

이 논문은 2010학년도 계명대학교 대학원 학술연구논문장학금과 2010년 교육과학기술부(지역거점 연구단육성사업 / 노화극복·웰빙을 위한 융합의료기술개발 사업단)로부터 지원받아 수행되었음에 감사 드립니다.

## References

- Axtelle, T. and J. Pribble. 2001. IC14, a CD14 specific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J. Endotoxin Res.* **7**, 310-314.
- Azad, N., Y. Rojanasakul, and V. Vallyathan. 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* **11**, 11-15.
- Barton, C. C., E. X. Barton, P. E. Ganey, S. L. Kunkel, and R. A. Roth. 2001. Bacterial lipopolysaccharide enhances aflatoxin B1 hepatotoxicity in rats by a mechanism that depends on tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Hepatology* **33**, 66-73.
- Boumpas, D. T., G. P. Chrousos, and R. L. Wilder. 1993. Glucocorticoid therapy for immune mediated disease: Basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.* **119**, 1198-1208.
- Brune, B., J. Zhou, and A. Von Knethen. 2003. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int. Suppl.* **84**, 22-24.
- Cheon, M. S., T. Y. Yoon, G. Y. Choi, S. J. Kim, A. Y. Lee, B. C. Moon, B. K. Choo, and H. K. Kim. 2009. Comparative study of extracts from Rhubarb on inflammatory activity in Raw 264. 7 cells. *Korean J. Med. Crop Sci.* **17**, 109-114.
- Cline, M. J. 1970. Leukocyte function in inflammation: the ingestion, killing, and digestion of microorganism. *Ser.*

- Haematol.* **3**, 3-16.
8. Delanty, N. and M. A. Dichter. 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* **117**, 463-466.
  9. Folin, O. and W. Denis. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249.
  10. Green, L. C., J. L. Reade, and C. F. Ware. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* **126**, 131-138.
  11. Guo, L. Y., T. M. Hung, K. H. Bae, E. M. Shin, H. Y. Zhou, Y. N. Hong, S. S. Kang, H. P. Kim, and Y. S. Kim. 2008. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Eur. J. Pharmacol.* **591**, 293-299.
  12. Higuchi, M., N. Hisgahi, H. Taki, and T. Osawa. 1990. 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.* **144**, 1425-1431.
  13. Hyun, M. S., J. M. Hur, Y. S. Shin, B. J. Song, Y. J. Mun, and W. H. Woo. 2009. Comparison study of white ginseng, red ginseng, and fermented red ginseng on the protective effect of LPS-induced inflammation in Raw 264.7 cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 21-27.
  14. Lazarov, S., M. Balutsov, and E. Ianev. 2000. The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock. *Vutr. Boles.* **32**, 33-40.
  15. Lee, E. S., H. K. Ju, T. C. Moon, E. Lee, Y. Jahng, 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 macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 617-620.
  16. Lee, S. E., N. S. Seong, C. G. Park, and J. S. Seong. 2002. Screening for antioxidative activity of oriental medicinal plant materials. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **10**, 171-176.
  17. Lee, S. G., M. H. Yu, S. P. Lee, and I. S. Lee. 2008. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 269-275.
  18. Moreno, M. I., M. I. Isla, A. R. Sampietro, and M. A. Vattuone. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 109-114.
  19. Morson, B. C. 1980. Pathology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Jpn.* **15**, 184-187.
  20. Mukaida, N., Y. Ishikawa, N. Ikeda, N. Fujioka, S. Watanabe, K. Kuno, and K. Matsushima. 1996. Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 145-151.
  21. Mu, M. M., D. Chakravorty, T. Sugiyama, N. Koide, K. Takagashi, I. Mori, T. Yoshida, and T. Yokochi. 2001. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res.* **7**, 431-438.
  22. Posadas, I., M. C. Terencio, I. Guilln, M. L. Ferrndiz, J. Coloma, M. Pay, and M. J. Alcaraz. 2000. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunun-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **361**, 98-106.
  23. Ryu, J. H., H. Anh, J. Y. Kim, and Y. K. Kim. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother. Res.* **17**, 485-489.
  24. Scott, M. G. and R. E. Hancock. 2000. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20**, 407-431.
  25. Seo, W. G., H. O. Pae, G. S. Oh, K. Y. Chai, T. O. Kwon, Y. G. Yun, N. Y. Kim, and H. T. Chung. 2001. Inhibitory rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, Raw 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **76**, 59-64.
  26. Stokes, K. Y., D. Cooper, A. Tailor, and D. N. Granger. 2002. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biol. Med.* **33**, 1026-1036.
  27. Surh, Y. J. 2002. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1091-1097.
  28. Wang, S., Y. Chen, L. He, Y. Yang, J. Chen, and X. Wang. 2007. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with gastrodia and uncaria decoction. a traditional Chinese formulation. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 458-462.
  29. Willoughby, D. A. 1975. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **34**, 471-478.
  30. Yu, M. H., H. G. Im, H. J. Lee, Y. J. Ji, and I. S. Lee. 2006. Components and their antioxidative of Methanol extracts from sarcocarp and seed of Zizyphus jujube var. inermis Rehder. *J. Food Sci. Technol.* **38**, 128-134.

---

**초록 : 가자, 라벤더, 강향의 항염증 및 항산화 활성 검색**

채인경 · 유미희 · 김혁일 · 이인선\*

(계명대학교 식품가공학 전공)

염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 nitric oxide (NO) 저해율에 대한 24종 천연물 추출물의 효과를 25 µg/ml의 농도에서 검색해 본 결과, 다른 추출물에 비해 가자, 라벤더, 강향이 우수한 효과를 나타냈다. 하지만 강향은 세포 생존율이 52.67±5.66%인 것으로 보아 세포독성으로 인해 NO 저해율이 높게 나타난 것으로 보여 지므로 농도를 낮춰 다음 실험을 진행하였다. 농도별 NO생성능을 측정해본 결과, 최고농도인 100 µg/ml에서 가자와 라벤더는 NO 생성량이 20-30%로 감소하였으며, 강향은 10 µg/ml에서 NO 생성량이 약 30%로 다른 시료에 비해 낮은 농도에서 높은 저해활성을 나타내었다. RAW 264.7 세포주에 LPS와 각각의 시료를 처리하여 염증을 유발한 후 염증인자인 NO의 생성, 그리고 proinflammatory cytokines인 TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 강향 추출물은 낮은 농도에서 높은 저해활성을 나타내, LPS로 유도된 염증 인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 각각의 총 폴리페놀 함량은 가자 616 µg/mg, 라벤더 73.98 µg/mg, 강향 161.82 µg/mg으로 세 가지 추출물 모두 높은 함량을 지내고 있었으며, 특히 가자 추출물의 폴리페놀 함량은 매우 높았다. 플라보노이드 함량은 가자 96.13 µg/mg, 라벤더 11.77 µg/mg, 강향 41.21 µg/mg으로 또한 가자 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었다. 각각의 RC<sub>50</sub>값은 가자 2.09 µg/ml, 라벤더 17.25 µg/ml, 강향 6.31 µg/ml로 나타났으며 세 가지 시료 모두 낮은 RC<sub>50</sub>값으로 DPPH radical 소거능이 우수하였다. 특히 가자는 천연항산화제인 ascorbic acid (1.57 µg/ml)와 비슷한 RC<sub>50</sub>값을 나타내 뛰어난 효과로 보여 진다.