

증숙 오미자의 항산화, 항염증 및 간보호 효과 비교 연구

추병길^{1#}, 정기훈², 서영배², 노성수^{3*}

1 : 전북대학교 농생명과학부

2 : 대전대학교 한의과대학 본초학교실

3 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

Antioxidant, Antiinflammation and Hepatoprotective activity of Schizandrae Fructus processed with differentiated steaming number

Byung Kil Choo^{1#}, Ki Hun Chung², Young-Bae Seo², Seong-Soo Roh^{3*}

1 : Department of Crop Agriculture & Life Science, Chonbuk National University, Jeonju, South Korea

2 : Department of Herbalogy, Daejeon University, Daejeon, South Korea

3 : Department of Herbalogy, Daegu Haany University, Daegu, South Korea

ABSTRACT

Objectives : We investigated differences of physiological functionalities in the steamed Schisandrae Fructus.

Methods : The samples were extracts of dried schisandrae fructus without steaming process (S0), extracts of schisandrae fructus with three times steamed (S3), extracts of schisandrae fructus with five times steamed (S5) and extracts of schisandrae fructus with seven times steamed (S7).

We analyzed contents of schisandrin, gomisin, total polyphenol and flavonoid and antioxidant activities. We researched antiinflammation effects for Raw264.7 cells. To evaluate liver protective activity, we measured AST, ALT and gamma-GTP in serum of alcoholic mice.

Results : As the steaming number of schisandrae fructus increase, the contents of schisandrin and gomisin were more increased. The contents of total polyphenol of S5 and S7 were significantly increased compared to that of S0.

DPPH free radical scavenging activities of S5 and S7 were significantly increased compared to that of S0, ABST radical scavenging activities of S3 and S5 were significantly increased compared to that of S0 in vitro.

The NO production of all sample was significantly decreased compared to control, PGE2 release of S3, S5 and S7 were significantly decreased compared to control. IL-1 β release of S5 and S7 were significantly decreased. AST, ALT and gamma-GTP of S3, S5 and S7 were significantly decreased compared to control.

Conclusions : We think that extracts of schisandrae fructus with steaming process may have more potential efficacy than a schisandrae fructus without steaming process.

Key words : Schizandra Fructus; antioxidantive activity; anti-inflammation; steaming number; hepatoprotective activity

서론

알코올은 기분전환을 위한 개인적인 욕구와 사회구성원 간의 공동체적 유대감을 확인하는 매체로서의 중요한 역할

을 하고 있다. 그러나 현대사회의 복잡성과 과도한 스트레스로 말미암아 알코올의 남용이 지속적으로 증가하고 있으며¹⁾ 세계적으로 질병과 장애의 주요 위험인자 중 3위를 차지할 만큼 중요하며 사회적, 경제적으로 다양한 손실을

* 교신저자 : 노성수, 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

· Tel : 053-770-2296 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

제1저자 : 추병길, 전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 전북대학교 농생명과학부

· Tel : 063-270-2526 · E-mail : bkchoo@jbnu.ac.kr

· 접수 : 2013년 2월 13일 · 수정 : 2013년 3월 7일 · 채택 : 2013년 3월 22일

초래하고 있다.

세계보건기구 보건통계수집국 (Global Health Observatory) 의 알코올과 건강에 대한 세계 정보체계는, 알코올 소비량, 손실, 국가 대응 정책등과 관련된 건강 상황과 추이를 평가 및 모니터링 하는 필수적인 수단으로 이에 따르면 해마다 250만 명의 사망자가 발생하고 알코올이 중요한 원인이 되는 질병의 종류가 무려 60개가 된다²⁾. 2011년 우리나라 사망원인 통계를 보면 알코올 관련 사망자수는 총 4,493명(1일 평균 12.3명)으로 전년대비 0.9% 감소하긴 하였으나 여성 사망률이 남성보다 8배나 높고 60대를 제외한 모든 연령층에서 사망률이 증가하는 양상을 보인다³⁾.

알코올은 위장과 소장에서 빠르게 흡수된 후에 주로 간에서 대사되는데 다량의 알코올이나 만성적인 알코올 섭취는 간기능 손상을 유발할 수 있다⁴⁾.

간에서 알코올은 alcohol dehydrogenase (ADH) 와 cytochrome P-450에 의해 아세트알데하이드로 전환이 되고 만성시엔 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)에 의해 아세트알데하이드 생성량이 증가한다⁵⁾. 정상적인 경로에서는 아세트알데하이드는 mitochondria aldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의해 acetate로 산화되고 TCA 회로를 경유하여 콜레스테롤과 지방산 합성에 이용한다. 하지만 동양인은 서양인에 비해 ALDH2 효소가 적어 acetaldehyde가 몸에 더 많이 잔존하게 되고 이는 DNA를 손상시켜 암을 더 쉽게 유발시킬 수 있다. 알코올의 과도한 섭취는 간의 알코올 처리능력에 한계를 가져 오게 만들고 1차적으로 대사된 아세트알데하이드가 알코올에 비해 반응성이 높아 강한 독성 작용을 하므로 알코올성 간손상 및 대사장애를 초래한다. 즉 단백질 adduct, 독성의 자유라디칼 및 지질과산화물을 생성하고 glutathione을 고갈시킬 뿐만 아니라 간의 콜라겐합성이나 섬유화를 촉진시킨다⁶⁾. 생체내의 free radical 은 반응성이 강하고 여러 생체물질과 쉽게 화학반응을 일으켜 세포에 손상 및 염증을 유발한다.

오미자는 오미자나무과 (Schisandraceae)에 속하는 오미자나무 (*Schizandra chinensis Baillon*)의 열매로서 간염, 두통, 신경쇠약 등의 치료 및 진해, 거담 효과를 나타내는 한약제 중의 하나이다. 오미자의 약리기능은 중추 억제작용과 간보호⁷⁻¹⁰⁾, 혈압강하¹¹⁾, 항산화작용^{12,13)}, 장내 미생물 개선효과^{14,15)}, 위암세포 사멸 및 면역력증강¹⁶⁾ 및 당뇨병 예방과 치료 효과¹⁷⁾, 항균효과¹⁸⁾등 다양한 연구가 수행되었다.

오미자나무속 (Schizandraceae)에는 주로 약용으로 쓰는 오미자 (*Schizandra chinensis*)와 제주도에 분포하며 열매가 흑색을 띠는 흑오미자 (*S. nigra*)가 있다¹⁹⁾. 오미자에 함유된 성분중 schizandrin, schizadran, ethamigrenal, gomisins 등의 리그난 화합물이 주를 이룬다^{20,21)}.

오미자의 생리활성 중 간보호효과는 in vitro에서 보고된 바 있으나²²⁾, in vivo에서의 효과 특히 찌고 말리는 횡수를 달리 했을 때의 간보호 효과에 대해서는 연구된 바가 없다. 이에 연구자는 오미자를 증숙을 달리하여 생리활성 성분 변화 및 생리활성 차이점을 연구하고자 하였다. 이외에 증숙을 달리한 오미자의 리그난 성분을 분석하고 항산화 및 항염증 관련하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시료 제조방법

전북 장수 지역에서 생산된 생오미자를 과육이 단단하면서 붉게 변한 상태에서 구입하여 시료 제조에 사용하였는데, 증숙 기기는 떡찜기 (원형마하찜기 3kw, 대창공업사)를 이용하였다. 증숙 방법은 설정온도 110℃로 설정하고, 증기 발생 후 5분간 증숙하였다. 실제 측정된 증숙 온도는 95~100℃였으며 증숙과 건조 과정을 1회 증숙과정으로 설정하였다. 실제 제조된 오미자 시료는 Fig. 1과 같다.

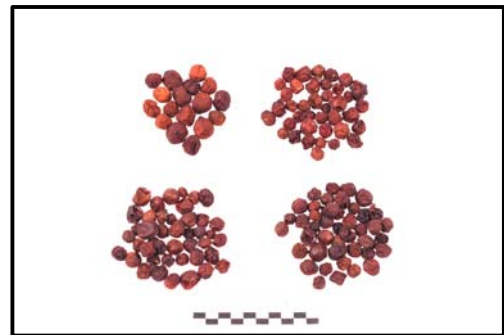


Fig. 1. The shape and color of schisandrae fructus sample upper left: Dried schisandrae fructus sample without steaming process, upper right: Dried schisandrae fructus sample with one time steaming process, lower left: Dried schisandrae fructus sample with three times steaming process, lower right: Dried schisandrae fructus sample with five times steaming process.

2. 실험 재료 및 추출방법

증숙 시료들의 추출은 분쇄기로 분쇄 한 다음 시료 5 g에 Distilled water 50 ml를 넣고, 100℃에서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. Kimble-filtering flask에 funnel을 장착하고 여과지 (Whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 뒤 여과액을 미리 항량된 수기에 넣어 45~50℃의 수온에서 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, EYELA)를 사용하여 감압농축 후 동결건조 (FD5508, IIShin)하였다. 이 분획물을 DMSO에 녹여 200 mg/ml의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20℃에 보관하여 사용하였다.

3. 오미자의 리그난 성분 분석

오미자의 리그난 성분은 schizandrin, gomisins으로 80% methanol을 추출용매로 이용하여 75±5℃ 수조에서 1시간씩 3회 진탕 추출하였다. 얻어진 추출액은 200 ml로 맞춘 후 3배 희석하여 기기분석 시료액으로 사용되었다. 분석기기는 고속액체크로마토그래피 (HPLC)를 이용하였으며 Waters Co., USA), schizandrin 분석조건은 아래와 같다.

Gradient Mode

Solvent A : Solvent B = 0,01M Phosphate Buffer : MeCN

0min-A:80 B:20, 2,5min-A:50 B:50, 9min-A:40 B:60, 20min-A:0 B:100, 25min-A:80 B:20

flow rate: 1 mL/min

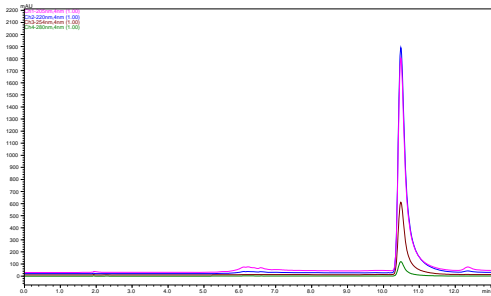
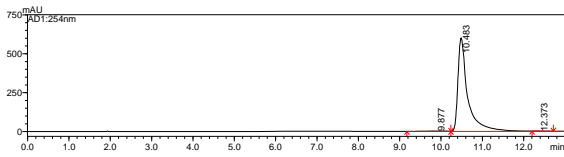


Fig. 2. The standard curve of schizandrin compound

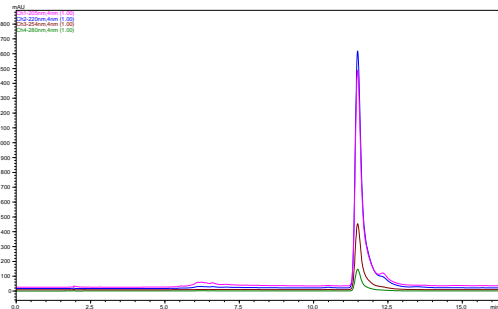
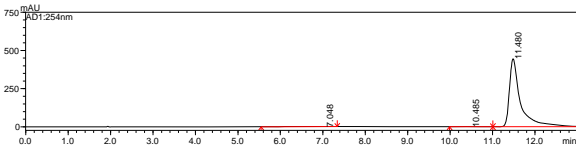


Fig. 3. The standard curve of gomisin compound

4. Polyphenol 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법 (Velioglu, et al, 1998)을 이용하였다. 각 시료 25 μ l(1mg/ml)과 10% Folin-Ciocalteau's phenol reagent 500 μ l를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨다. 그 후 10% Sodium carbonate 500 μ l를 더하여 30 $^{\circ}$ C incubator에서 90분 동안 반응시킨 후 725nm에서 흡광도(Multiscan spectrum, Thermo Scientific)를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 이와 같은 방법으로 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

5. Flavonoid 함량 측정

총 flavonoid의 함량 측정은 Davis법을 변형한 방법 (Chae SK 2002)에 따라 측정하였다. 추출한 시료 300 μ l에 Diethylene glycol 600 μ l를 잘 섞어준 후, 이 혼합물에 1N NaOH 6 μ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치한 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 Flavonoid 함량은 Rutin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

6. DPPH Free Radical 소거활성 측정

추출한 시료의 Free Radical 소거능 활성의 측정을 위해 DPPH법을 이용하였다. 각 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ l와 0.2mM DPPH 용액 100 μ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 암소 상태에서 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 시료 첨가구의 흡광도 차를 백분율로 표시하였다.

7. ABTS Radical Scavenging Activity

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 Re (Re, et al, 1999) 등의 방법을 이용하여 측정하였다. 7mM ABTS 용액과 2.4mM의 potassium persulfate을 혼합하여 실온의 암소 상태에서 약 16시간이상 방치하여 ABTS radical을 형성시킨 후 734nm에서 흡광도 값이 0.70(\pm 0.02)이 되게 100% Ethanol로 희석하였다. 희석된 용액 900 μ l에 시료 100 μ l를 가하여 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC50값으로 나타내었다.

8. 세포배양

마우스 대식 세포주인 Raw264,7 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Raw264,7 cell은 10% Fetal Bovine Serum (FBS)를 첨가한 DMEM을 이용하여 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

9. Cell Counting Kit-8

시료의 세포독성을 측정하기 위해 Cell counting Kit-8을 이용하였다. 96 well plate에 세포를 Seeding 한 후 증숙 시료를 정해진 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하여 CCK-8 용액을 처리하고 37 $^{\circ}$ C Incubator에서 30분 동안 반응시켰다. CCK-8 측정은 ELISA (Multiscan spectrum, Thermo Scientific)를 이용하여 분석하였다.

10. NO Production

Raw264,7 cell을 96 well plate에 2.5 \times 10⁵ cells/well 분주한 후 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 LPS 1 μ g/ml 처리한 후 정해진 농도의 증숙 시료를 처리한 후 24시간동안 배양한 후 배지에서 분비된 Nitric oxide를 Griss reaction에 기초한 NO colorimetric assay (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)로 분석하였다. 세포가 생산한 NO는 Sodium Nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 NO 함량을 정량하였다.

11. Prostaglandin E2 (PGE2)

Raw264,7 cell을 96 well plate에 에 2.5 X 10⁵

cells/well분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 LPS 1µg/ml 처리 한 후 정해진 농도의 증숙 시료를 처리한 후 24 시간동안 배양한 후 배지에서 분리된 PGE2 (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 PGE2 kit를 이용하여 측정하였다. 세포가 생산한 PGE2는 ELISA microplate 리더기에서 540 nm에서 측정하였다.

12. IL-1β

Raw264.7 cell을 96 well plate에 에 2.5 X 10⁵ cells/well분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 LPS 1 µg/ml 처리 한 후 정해진 농도의 증숙 시료를 처리한 후 24 시간동안 배양한 후 배지에서 분리된 IL-1β (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 IL-1β kit를 이용하여 측정하였다. 세포가 생산한 IL-1β는 ELISA microplate 리더기에서 540 nm에서 측정하였다.

13. 혈청 내 AST, ALT 및 gamma-GTP 분석

증숙 오미자의 알코올성 간보호 효능을 알아보기로, 급성 알코올성 간손상 유발 마우스 모델을 이용하여 혈청 내 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) 및 gamma-GTP (Glutamyl Transferase) 분석하였다. 부검시 복대정맥에서 혈액을 채취하여 상온에서 1시간 정치시킨 다음 3,000 rpm, 15분 원심분리한 후 혈청에서 간손상지표의 대표적인 AST, ALT 및 gamma-GTP를 측정하였다. 혈청 내 AST, ALT 및 gamma-GTP 함량은 생화학분석기(METROLAB 1600DR, 아르헨티나)을 이용하여 측정하였다.

14. 통계처리

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

결 과

1. Schisandrin 및 Gomisins 성분 분석

오미자 열수 추출물의 시료별 함량분석 결과, 생건 오미자 열수 추출물의 schisandrin 함량은 4.158%이었으며, 3번 증숙 오미자 열수 추출물의 schisandrin 함량은 2.828%, 5번 증숙 오미자 열수 추출물의 schisandrin 함량은 3.327%, 7번 증숙 오미자 열수 추출물의 schisandrin 함량은 3.676%로 증숙 횟수에 따라 schisandrin 함량이 증가되었다 (Table 1).

오미자 80% 에탄올 추출물의 시료별 함량분석 결과, 생건 오미자 80% 에탄올 추출물의 gomisins 함량은 3.92%이었으며, 3번 증숙 오미자 80% 에탄올 추출물의 gomisins 함량은

4.51%, 5번 증숙 오미자 80% 에탄올 추출물의 gomisins 함량은 5.2%, 7번 증숙 오미자 80% 에탄올 추출물의 gomisins 함량은 5.63%로 증숙 횟수에 따라 gomisins 함량이 증가되었다 (Table 1)

Table 4. The Contents of Schisandrin and Gomisins in the Schisandrae Fructus with Steaming Process

H ₂ O extract of Schisandrae Fructus		Ret. Time (min)	Contents (%)	80% EtOH of Schisandrae Fructus		Ret. Time (min)	Contents (%)
control	Schisandrin	10,501	4,15837	control	Gomisins	11,483	3,9225
S3	Schisandrin	10,487	2,82846	S3	Gomisins	11,453	4,5121
S5	Schisandrin	10,482	3,32678	S5	Gomisins	11,466	5,1972
S7	Schisandrin	10,482	3,67587	S7	Gomisins	11,474	5,6323

Control : Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, S3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, S5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, S7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

2. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

오미자 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 분석 결과, 총 폴리페놀 함량은 5번 증숙 오미자와 7번 증숙 오미자에서 함량이 생건 오미자 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량보다 유의성있게 높았다. 또한 플라보노이드는 생건 오미자 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량보다 3번, 5번 및 7번 오미자 열수 추출물에서 유의성있게 증가되었다 (Fig. 4).

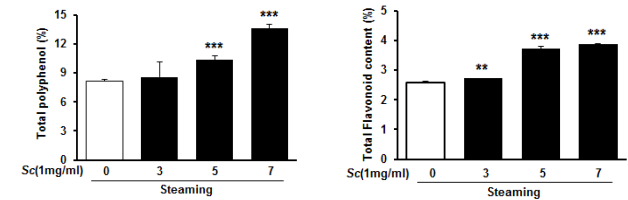


Fig. 4. The contents of total polyphenol and flavonoid in the schisandrae fructus with steaming process.

0: Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

3. 항산화 생리활성

1) DPPH 자유 라디칼 소거능

DPPH 자유 라디칼 소거능 분석 결과, 생건 오미자와 3번 증숙 오미자 추출물의 소거능은 유의적 차이점을 보이지 않았으나, 5번 증숙 오미자 열수 추출물과 7번 증숙 오미자 열수 추출물의 자유 라디칼 소거능은 생건 오미자 열수 추출물에 비해 유의성있게 증가되었다 (Fig. 5).

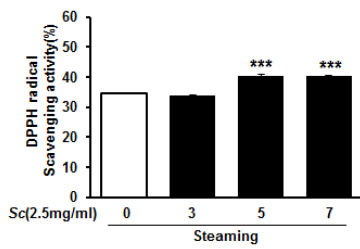


Fig. 5. The effect of DPPH free radical scavenging activity in the schisandrae fructus with steaming process.

0: Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

2) ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능 분석 결과, 생건 오미자와 7번 증숙 오미자 추출물의 소거능은 유의적 차이점을 보이지 않았으나, 3번 증숙 오미자 열수 추출물과 5번 증숙 오미자 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 생건 오미자 열수 추출물에 비해 유의성있게 증가되었다 (Fig. 6).

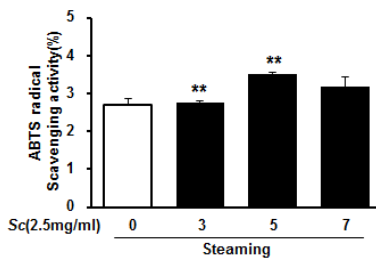


Fig. 6. The effect of ABTS radical scavenging activity in the schisandrae fructus with steaming process.

0: Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

4. 항염증 생리활성

1) 세포 생존율

MTT assay를 통해 세포독성을 분석한 결과, 생건 오미자 및 3번, 5번, 7번 증숙 오미자 열수 추출물을 400 µg/ml 농도까지 독성은 나타나지 않았다 (Fig. 7).

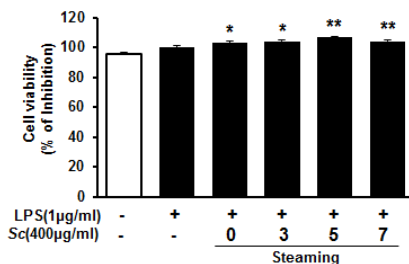


Fig. 7. The cytotoxicity of the schisandrae fructus with steaming process. 0: Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

2) NO농도의 측정

RAW264.7 cell의 NO 생성 억제능에 대한 분석 결과, LPS만 처리한 대조군에 비해 생건 오미자 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군, 3번 증숙 오미자 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군, 5번 증숙 오미자 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군, 7번 증숙 오미자 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군 모두에서 유의성있게 NO 생성이 저하되었다 (Fig. 8).

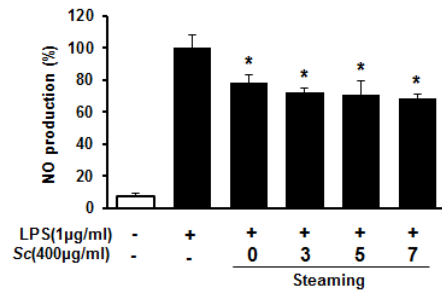


Fig. 8. The Change of NO production in the RAW264.7 treated with the extract of schisandrae fructus with steaming process.

0: Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

3) PGE2 생산량 측정

생건 오미자 열수 추출물 및 증숙 오미자 열수 추출물 처리 후, prostaglandin E2 생성을 분석한 결과, LPS 처리 대조군의 prostaglandin E2 발현량에 비해 생건 오미자 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군과는 유의성있는 차이가 없었다. 반면에 3번 증숙 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군, 5번 증숙 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군 및 7번 증숙 열수 추출물을 400 µg/ml 농도로 처리한 세포군의 prostaglandin E2 생성은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 9).

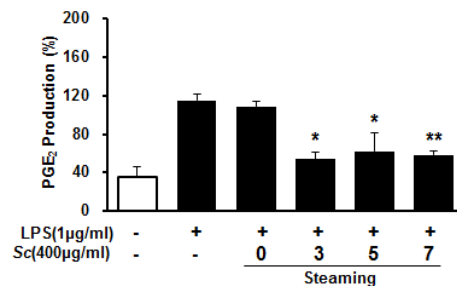


Fig. 9. The change of prostaglandin E2 in the RAW264.7 treated with the extract of schisandrae fructus with steaming process.

0: Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

4) IL-1β 측정

생건 오미자 열수 추출물 및 증숙 오미자 열수 추출물 처리 후, interleukin (IL)-1β 생성을 분석한 결과, LPS

처리 대조군의 IL-1 β 발현량에 비해 생건 오미자 열수 추출물을 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포군 및 3번 증숙 열수 추출물을 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포군과는 유의성있는 차이가 없었다. 반면에, 5번 증숙 열수 추출물을 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포군 및 7번 증숙 열수 추출물을 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포군의 IL-1 β 생성은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 10).

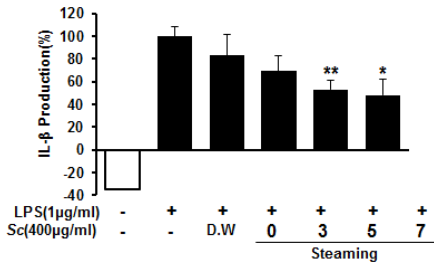


Fig. 10. The change of IL-1 β in the RAW264.7 treated with the extract of schisandrae fructus with steam processing. 0: Dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

5. 알코올성 간손상 보호 효능

1) AST 효소의 측정

급성 알콜성 간손상 모델에 대한 증제 오미자 시료의 효능을 알아보기 위해 혈청 중 AST 함량을 분석하였다. 분석 결과, 정상군의 혈청 내 AST 함량은 47.6 \pm 7.4 U/L인 반면 알코올투여 대조군의 혈청 내 AST 함량은 72.7 \pm 10.5 U/L로 유의성 있게 증가되었다. 생건 오미자 추출물 투여군의 정상군의 혈청 내 AST 함량은 62 \pm 5.3 U/L로 대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었으며, 3번 증숙 오미자 추출물 투여군은 51.2 \pm 6.2 U/L, 5번 증숙 오미자 추출물 투여군은 53.6 \pm 4.5 U/L, 7번 증숙 오미자 추출물 투여군은 54.3 \pm 4.9 U/L로 대조군에 비해 유의성 있게 혈청 내 AST 함량이 감소되었다 (Fig. 11).

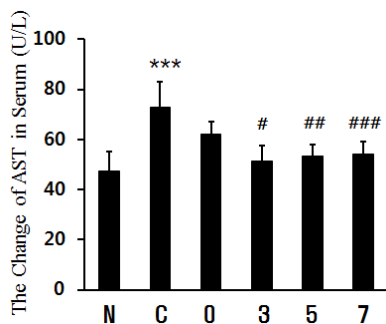


Fig. 11. The effect of AST in the serum of alcoholic mice treated with the extract of schisandrae fructus with steaming process. N: Normal mice, C: Alcoholic mice, 0: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

2) ALT 효소의 측정

급성 알코올성 간손상 모델에 대한 증숙 오미자 시료의 효능을 알아보기 위해 혈청 중 ALT 함량을 분석하였다. 분석 결과, 정상군의 혈청 내 ALT 함량은 20.0 \pm 4.3 U/L인 반면 알코올투여 대조군의 혈청 내 ALT 함량은 35 \pm 5.8 U/L로 유의성 있게 증가되었다.

생건 오미자 추출물 투여군의 정상군의 혈청 내 ALT 함량은 22.3 \pm 4.1 U/L로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, 3번 증숙한 오미자 추출물 투여군의 혈청 내 ALT 함량은 21.1 \pm 2.9 U/L, 5번 증숙한 오미자 추출물 투여군의 혈청 내 ALT 함량은 32 \pm 4 U/L, 7번 증숙한 오미자 추출물 투여군의 혈청 내 ALT 함량은 28.2 \pm 2.6 U/L로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게 혈청 내 ALT 함량이 감소되었다 (Fig. 12).

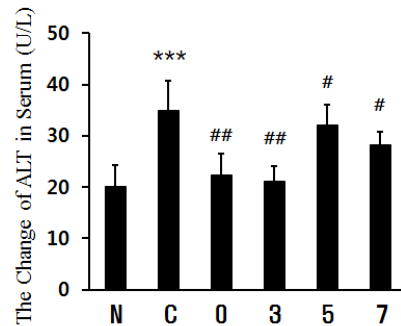


Fig. 12. The effect of ALT in the serum of alcoholic mice treated with the extract of schisandrae fructus with steaming process

N: Normal mice, C: Alcoholic mice, 0: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

3) Gamma-GTP

급성 알코올성 간손상 모델에 대한 증숙 오미자 시료의 효능을 알아보기 위해 혈청 중 gamma-GTP 함량을 분석하였다. 분석 결과, 정상군의 혈청 내 gamma-GTP 함량은 22 \pm 1.1 U/L인 반면 알코올투여 대조군의 혈청 내 gamma-GTP 함량은 82 \pm 6.8 U/L로 유의성 있게 증가되었다.

생건 오미자 추출물 투여군의 정상군의 혈청 내 gamma-GTP 함량은 64 \pm 8.3 U/L로 대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었으며, 3번 증숙 오미자 추출물 투여군의 혈청 내 gamma-GTP 함량은 60 \pm 5.4 U/L, 5번 증숙 오미자 추출물 투여군의 혈청 내 gamma-GTP 함량은 52 \pm 6.1 U/L, 7번 증숙 오미자 추출물 투여군의 혈청 내 gamma-GTP 함량은 45 \pm 4.2 U/L로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게 혈청 내 gamma-GTP 함량이 감소되었다 (Fig. 13).

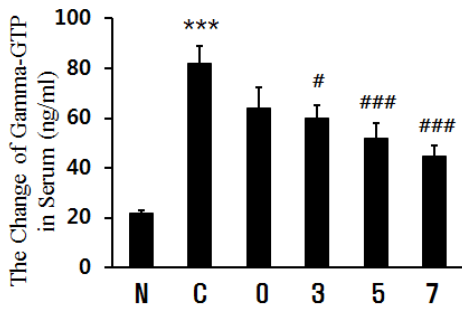


Fig. 13. The effect of gamma-GTP in the serum of alcoholic mice treated with the extract of schisandrae fructus with steaming process

N: Normal mice, C: Alcoholic mice, 0: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts without steaming process, 3: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with three times steaming process, 5: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with five times steaming process, 7: Alcoholic mice treated with dried schisandrae fructus extracts with seven times steaming process.

고찰

예로부터 오미자(*Schizandra chinensis*)는 우리나라 한의 학에서 거담, 자양 및 강장제 등으로 이용되는 한약재로 약 리기능이 다양하여 진정, 진해, 해열 등의 중추억제작용, 간 보호작용, 혈압 강하작용 및 알코올 해독작용이 있다고 하였 다²³. 에탄올을 급성으로 단회 투여한 쥐에서 상승된 알코 올 농도를 오미자추출물의 경구투여로 현저하게 감소시키는 효과를 보고한바 있다²⁴.

최근 문²⁵ 등은 오미자 추출물의 인간 전립선암 세포주 PC-3에 대한 성장 억제 효과를 연구 보고하였고, 김²⁶ 등 은 nrDNA-ITS 분자마커를 이용한 오미자(五味子) 종 감 별 및 기원분석 -ITS 염기서열을 이용한 오미자(五味子) 감별법을 연구보고 하였으며, 신²⁷ 등은 천연 색소 고정화 기술을 활용한 오미자와 자소엽 추출물 함유 음료의 항산 화 활성 연구를 보고 하였다. 그러나 아직까지 생건 오미 자와 중숙 오미자간의 생리활성 비교 연구는 수행되지 않 았고, 오미자의 전통 포제 방법 중 하나인 중숙 오미자의 약리 효능에 관한 연구결과가 필요하다고 판단되어 생건 오미자와 중숙 오미자의 이화학적 성분 비교, 항산화 활성 성분 및 항산화 효능, 대식세포주를 이용한 항염증 효능 비교 연구 및 *in vivo* 간보호 효능을 비교 분석하였다.

알코올 섭취로 인한 간손상이 일어나면 간세포가 파괴되 고 이때 혈중으로 aspartate aminotransferase (AST 또는 GOT)와 alanine aminotransferase (ALT 또는 GPT)가 유 리되어 나오기에 AST와 ALT의 활성이 간세포손상의 지 표로 사용되고 있다.

인체는 항산화계가 존재하여 산화촉진물질 (prooxidant) 과 산화억제물질 (antioxidant)이 균형을 유지하고 있다. 그러나 환경오염, 흡연, 알콜 및 방사선 등에 지속적으로 노출이 되면 두 인자가 불균형을 이루어 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 유발하게 된다²⁸. 대표적인 원인으로 는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활성질 소종 (reactive nitrogen speices, RNS)으로 ROS에는 superoxide anion radical (O₂⁻), hydrogen oxide (H₂O₂),

hydroxyl radical (-OH) 등이 있고, RNS에는 nitric oxide (NO), nitrogen dioxide (NO₂), nitrous acid (HNO₂), peoxynitrite (ONOO⁻) 있다.

항산화활성은 이들 반응물질, 즉 ROS 또는 RNS의 라디 칼을 소거하여 반응성 물질로 인한 위해를 방지하는 역할 을 한다. 최근 연구에서 폴리페놀을 함유한 천연물은 질병 의 위험과 노화의 원인인 ROS와 RNS를 감소시키는 것과 연관이 있다고 밝혔다. 페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가진 방향족 화합물로 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산 화, 항암 등의 다양한 활성을 가진다²⁹.

안정한 free radical을 함유하는 DPPH 분자는 항산화 제의 radical 소거능을 평가하기 위해 가장 많이 사용된다^{30,31}. 또한 ABTS radical 소거능은 항산화제의 유무를 확 인하는 것으로 radical 생성하는 ABTS 존재시 hydrogen peroxide와 metmyoglobin의 활성을 토대로 보다 빠른 항 산화 반응을 일으켜 myoglobin radical을 감소시킨다³².

문제는 이런 산화적 스트레스가 제대로 제거되지 못하면 생체막의 손상, 고분자단백질 및 DNA의 변형과 기능 상실 등으로 인한 다양한 퇴행성 질환이 유발될 수 있다는 사실 이다. 이는 항산화작용이 염증과도 관련이 되어있다는 점 을 시사한다. 즉 ROS와 RNS는 염증 과정 중 많은 양의 염증유도 cytokines (proinflammatory cytokines) 및 nitric oxide (NO), 그리고 prostaglandin E2 (PGE2)가 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX2)의 과발현에 의해 생성이 증가 한다³³.

우리 몸에 있는 대표적인 면역세포로 대식세포 및 단핵 구를 들 수가 있는데 이는 외부에서 침입한 세균 유래의 특정 물질이나 체내 다른 면역세포에서 분비되는 사이토카 인에 의해 활성화된다. 대식세포는 LPS (lipopolysaccharide) 감염초기에 반응하고 숙주의 방어와 항상성 유지에 중요한 역할을 하지만 고농도의 LPS의 자극은 Raw264.7 세포와 같은 대식세포에서 염증성 사이토 카인 tumor necrosis factor- α (TNF α), interukin (IL)-6, IL-1 β 와 염증성 매개물질인 nitric oxide(NO), prostaglandin E2 (PGE2)를 분비시켜 숙주의 면역반응이 적절하게 작동하지 않으면 특정기능에 장애를 초래하는 염 증성 질환이 발생할 수 있다³⁴.

염증반응에 있어서 항산화작용의 연구는 중요하며, 과생 산되어 조절이 불가능한 reactive oxygen species (ROS) 는 정상적인 세포에 산화적 스트레스로 작용한다. ROS는 일차적으로 산화적 스트레스 뿐만 아니라 염증과 관련된 NO, iNOS와 COX2 등을 자극하여 과발현하게 한다.

일반적으로 NO는 혈압조절, 당뇨조절, 신경전달, 혈액응 고, 면역기능 등의 역할을 조절하나³⁵⁻³⁷ 과도한 NO의 형 성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. PGE2는 COX에 의해서 arachidonic acid로부터 생산된다. COX는 COX1과 COX2 두 가지 형태로 COX1은 위장의 세포를 보 호하는 등의 생리적 기능을 조절하고 COX2는 미생물에 의한 감염이나 손상 혹은 여러 요인의 스트레스에 반응한

대식세포에서 발현된다.

IL-1 β 는 TNF α 와 함께 활성화된 대식세포로부터 생성되는 대표적인 염증 매개성 cytokine으로서 TNF α 의 수용체와 명확히 다른 구조를 가지고 있으나 많은 부분에서 비슷한 생물학적 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그 작용으로는 내피세포에서 ICAM-1 유발, 섬유모세포증식 유도, collagenase와 PG 생산자극, 급성기 반응 및 혈관형성 등을 들 수 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 있다³⁸⁾.

본 연구자는 생건 오미자와 증숙 횃수를 달리한 오미자와의 생리활성 비교연구를 진행하였으며, 오미자의 대표성분인 schisandrin, gomisins 함량을 분석하였고, 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 측정하였고 이와 연계하여 항산화 활성을 DPPH 자유라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능을 분석하였다. 결과적으로 증숙 횃수 증가에 따라 schisandrin, gomisins 함량이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 아울러 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량도 증가되는 경향을 볼 수 있었다. 이러한 이화학적 성분 변화는 항산화 효과와 밀접한 관련이 있어, DPPH 자유라디칼 소거능은 5번 증숙 오미자와 7번 증숙 오미자 열수 추출물에서 유의성 있게 증가되었으며 ABTS 라디칼 소거능은 3번 증숙 오미자와 5번 증숙 오미자 열수 추출물에서 유의성 있게 증가되었다.

증숙 오미자의 항염증 활성을 알아보기 위해 마우스 대식세포주인 raw264.7 세포를 이용하여 세포독성을 측정할 결과, 400 μ g/ml 농도 처리 시 모든 오미자 열수 추출물 시료에서 독성은 보이지 않았으며, 이에 같은 농도로 raw264.7 세포에 LPS와 오미자 열수 추출물을 처리한 후 NO, PGE2 및 IL-1 β 발현량을 비교 분석한 결과, 증숙 횃수가 증가될수록 항염증 효능이 뛰어난 것으로 나타났다.

이러한 항염증 효능으로 *in vivo* 간보호 효과와 비교 분석하여 증숙 오미자의 약리작용을 분석한 결과, 알콜성 간손상 유발 대조군에 비해 생건 오미자 열수 추출물이 혈청 내 AST, ALT 및 gamma-GTP 함량이 감소되었으며, 증숙 오미자 열수 추출물의 혈청 내 AST, ALT 및 gamma-GTP 함량은 생건 오미자 열수 추출물의 혈청 내 AST, ALT 및 gamma-GTP 함량보다 더욱 감소되는 경향을 볼 수 있었다.

따라서 생건 오미자와 증숙 오미자의 생리활성을 *in vitro*와 *in vivo* 연구결과, 생건 오미자보다 증숙 오미자의 화학성분 용출량, 항산화 성분 함량 및 항염증 효능이 증가되었고, 동물 모델에서는 알코올로 인한 간손상이 증숙 오미자 열수 추출물 구강투여 시 생건 오미자 열수 추출물 구강투여보다 더 유효하다는 결론을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 증숙이론에 근거하여 뜨거운 증기를 가하면 오미자의 표피가 부풀어 올랐다가 겉껍질이 파열되고, 안으로는 조직이 성기게 되어 약재유효성분의 용출율에 변화가 오기 때문인 것으로 판단되며, 이에 대한 심층연구는 차후에 이루어져야 할 것이다.

결론

오미자의 증숙 횃수에 따른 이화학적 성분 분석, 항산화 성분 분석, 항산화 효능, 항염증 효능 및 급성 알코올성 간손상 모델의 간보호효능 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 증숙 횃수를 달리한 오미자 시료를 HPLC로 schisandrin, gomisins의 함량을 분석하였다. 분석결과, 증숙 횃수 증가에 따라 schisandrin, gomisins 함량이 증가되는 것을 확인하였다.
2. 항산화 활성에 매우 중요한 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 폴리페놀의 경우 3번, 5번, 7번 증숙 오미자에서 생건 오미자보다 유의성 있게 많이 함유되어 있었으며, 플라보노이드의 함량은 5번 및 7번에서 증숙 오미자에서 생건 오미자보다 유의성 있게 많은 함량을 보였다.
3. *In vitro* 상에서 DPPH radical 소거능은 5번 및 7번 증숙 오미자 열수 추출물에서 유의성 있게 억제되었고, ABTS 소거능은 3번 및 5번 증숙 오미자 열수 추출물에서 유의성 있게 증가되었다.
4. Raw264.7 대식세포에 세포독성, NO 생성, PGE2, IL-1 β 생성에 미치는 영향을 실험한 결과 모든 오미자 열수 추출물 시료에서 세포독성의 차이는 보이지 않았으며, NO 생성은 생건 오미자, 3번 오미자, 5번 오미자 및 7번 오미자 시료 모두 유의성 있게 억제되었고, PGE2 발현량은 3번 오미자, 5번 오미자 및 7번 오미자 시료 모두 유의성 있게 억제되었으며, IL-1 β 발현량은 5번 오미자 및 7번 증숙 오미자의 열수 추출물에서 대조군의 IL-1 β 발현량에 비해 유의성 있게 감소되었다.
5. 간세포 손상의 지표인 AST, ALT 및 gamma-GTP 혈청분석 한 결과 생건 오미자 열수 추출물보다 증숙 오미자 열수 추출물에서 유의성 있게 감소되었다.

이러한 실험 결과들로 보아 증숙 횃수가 증가함에 따라 오미자의 항산화, 항염증, 간보호효과가 좀 더 우수한 것으로 나타났다. 따라서 급성 알코올성 간손상뿐 아니라 만성 알코올성 간손상 예방 및 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2012년도 한의학연구원 '한의원 과학화 사업'에서 연구비 지원을 받아 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Choi GH, Kim JG, Kwon ST. Protective effects of

- Food Including *Hovenia dulcis* on Acute Alcohol Intoxication. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011 ; 40(8) : 1107-12.
2. World health organization, media centre alcohol, Retrieved Feb, 8, 2012, from [Http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/index.html).
 3. Statistics Korea, News data, preservation of health Society, 2011 statistics of mortality. Retrieved Feb, 8, 2012, from http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/6/2/index.board?bmode=read&bSeq=&aSeq=260046&pageNo=1&rowNum=10&navCount=10&currPg=&sTarget=title&sTxt=.
 4. Liber CS. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1993 ; 7(3) : 581-608.
 5. Kim MJ, Lee JS, Ha OM, Jang JY, Cho SY. Effects of *Pueraria thunbergiana* Bentham Water Extracts on Hepatic Alcohol Metabolic Enzyme System in Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2002 ; 31(1) : 92-7.
 6. Liber CS. Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacol Ther.* 1990 ; 46(1) : 1-41.
 7. Zhu M, Lin KF, Yeung RY, Li RC. Evaluation of the protective effects of *Schizandra chinensis* on phase I drug metabolism using a CCl₄ intoxication model. *J Ethnopharmacol.* 2000 ; 67 : 928-35.
 8. Xing J, Guo Y, Hu H, Qu XL, Sun XZ, Liu SH, Wang H. A Herbal Composition of Semen *Hoveniae*, Radix *Puerariae* and Fructus *Schisandrae* Shows Potent Protective Effects on Acute Alcoholic Intoxication in Rodent Models. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012 ; 2012 : Article ID 638197, 7 pages
 9. Cheng N, Ren N, Gao H, Lei X, Zheng J, Cao W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 2012 ; 28(55C) : 234-40.
 10. Hikino H, Kiso Y, Taguchi H, Ikeya Y. Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits. *Planta Med.* 1984 ; 50(3): 213-7.
 11. Yeo SG, Ahn CW, Lee YW, Lee TG, Park YH, Kim SB. Antioxidative Effect of Tea Extracts from Green Tea, Oolong Tea and Black Tea. *J Korean Soc Food Nutr.* 1995 ; 24(2) : 299-304.
 12. Toda S, Kimura M, Ohnishi M, Nakashima K, Ikeya Y, Taguchi H, Mitsuhashi H. Natural antioxidants. IV. Antioxidative compounds isolated from *Schisandra* fruit. *Jpn J Pharmacognosy.* 1988 ; 42(2) : 156-9.
 13. Huang YS, He Y, Zhang JT. Antioxidative effects of three components isolated from fruit of *Schisandrae*. *Chinese J Pharmacol Toxicol.* 1990 ; 4(4) : 275-7.
 14. Chung Kt, Lee SH, Lee YC, Kim JT. Antimicrobial activity of Omija (*Schizandra chinensis*) extracts. *Kor J Food Sci Nutrition.* 2001 ; 30(1) : 127-32.
 15. Lee JY, Min YK, Kim HY. Isolation of antimicrobial substance from *Schizandra chinensis* Baillon and antimicrobial effect. *Kor J Food Sci Techn.* 2001 ; 33(3) : 389-94.
 16. Park JH, Kim JH, Kim DH, Mun HC, Lee HJ, Seo SM, Paik KH, Ryu LH, Park JI, Lee HY. Comparison of immuno-stimulatory activities by purification process of *Schizandra chinensis* Baillon fruits. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 2004 ; 12 : 141-8.
 17. Ko, BS, Park, SK, Choi, SB, Jun, DW, Choi, MK, Park, SM. A study on hypoglycemic effects of crude extracts of *Schizandrae Fructus*. *J Kor Soc Appl Biol Chem.* 2004 ; 47(2) : 258-64.
 18. Sung KC. A study on the Pharmaceutical & Chemical Characteristics and Analysis of Natural Omija Extract. *J Korean Oil Chemists' Soc.* 2011 ; 28(3) : 290-8.
 19. Kim KS, Kang SS, Ryu SN. Quantitative Analysis of Lignans from Fruits of *Schizandra chinensis*. *Kor J Pharmacogn.* 2002 ; 33(4) : 272-6.
 20. MacRae WD, Towers GH. Biological activities of lignans. *Phytochem.* 1984 ; 23(6) : 1207-13.
 21. Kim JS, Choi SY. Physicochemical Properties and Antioxidative Activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon). *Korean J Food Nutr.* 2008 ; 21(1) : 35-42.
 22. Nakagiri R, Oda H, Kamiya T. Small scale rat hepatocyte primary culture with applications for screening hepatoprotective substances. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003 ; 67(8) : 1629-35.
 23. Choi HS, Beik KY, Kim JB. Studies on Antioxidative Effects of *Schisandra chinensis* Seed Extract. *J Kor Soc Cosm.* 2012 ; 18(4) : 908-15.
 24. Lee JS, Lee SW. Effects of water extracts in fruits of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) on Alcohol Metabolism. *Korean J Dietary culture.* 1990 ; 5(2) : 259-63.
 25. Moon JM, Seok GH, Cho SI. Antiproliferative effect of *Schisandrae Fructus* extract on PC-3 human prostate cancer cells. *Kor J herbology.* 2012 ; 27(4) : 17-23.
 26. Kim HK, Ji YU, Seo HS, Lee AY, Chun JM, Moon BC. Molecular Authentication of *Schisandrae Fructus* and Analysis of Phylogenetic Relationship based on nrDNA-ITS sequences. *Kor J herbology.* 2010 ; 25(4) : 47-54.
 27. Shin IS, Hwang SJ, Kim SO, Heo D, Kim MR. Antioxidative Activities of Mixture of *Schisandrae Fructus* (SF) and *Perilae Folium* (PF) using Natural Color fixation technic. *Kor J herbology.* 2011 ;

- 26(3) : 37-45.
28. Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY, An BJ. Anti-oxidant and Anti-inflammation Activity of Fractions from *Aster glehni* Fr. *Schm Kor J Microbiol Biotechnol.* 2010 ; 38(4) : 434-41.
 29. Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T. Antitumor promoting activity of (-)epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother Res.* 1987 ; 1(1) : 44-7.
 30. Blois MS. Antioxidants determination by the use a stable free radical. *Nature.* 1958 ; 4617 : 1199-200.
 31. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. A study of Antioxidative and Hypoglycemic Activities of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) Extract under Variable Extract Conditions. *Korean J Food Nutr.* 2009 ; 22(1) : 41-7.
 32. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999 ; 26(9-10) : 1231-7.
 33. Posadas I, Terencio MC, Guillen I, Ferrandiz ML, Coloma J, Paya M, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000 ; 361(1) : 98-106.
 34. Kim MY, Son IP, Kim SY, Song YS, Chang HK, Yoo SJ, Baek SY, Kang HH, Kim BJ. Anti-inflammatory Effect of Green Tea Cell Water in Activated Raw 264.7 cells with Lipopolysaccharide. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol.* 2012 ; 32(2) : 115-21.
 35. Hermann M, Flammer A, Lüscher TF. Nitric oxide in hypertension. *J Clin Hypertens.* 2006 ; 8(12 Suppl 4) : 17-29.
 36. Traub O, Van Bibber R. Role of nitric oxide in insulin-dependent diabetes mellitus-related vascular complications. *West J Med.* 1995 ; 162(5) : 439-45.
 37. Williams RH, Nollert MU. Platelet-derived NO slows thrombus growth on a collagen type III surface. *Thromb J.* 2004 ; 2 : 11.
 38. Scapigliati G, Buonocore F, Mazzini M. Biological Activity of Cytokines: An Evolutionary Perspective. *Current Pharmaceutical Design.* 2006 ; 12(14) : 3071-81.