

물과 주정을 이용한 삼채 뿌리와 잎 추출물의 항산화 활성 및 항염증 효과 비교

이관욱^{1*} · 김연숙^{2*} · 박표집² · 정재현¹

¹한국교통대학교 식품공학과

²건국대학교 생명공학과

Comparison of Effect of Water and Ethanolic Extract from Roots and Leaves of *Allium hookeri*

Kwan-Wook Lee^{1*}, Yon-Suk Kim^{2*}, Pyo-Jam Park², and Jae-Hyun Jeong¹

¹Department of Food Science and Technology, Korea National University of Transportation

²Department of Biotechnology, Konkuk University

ABSTRACT The aim of this study was to evaluate the antioxidant activities and anti-inflammatory effects of water and ethanolic extracts from *Allium hookeri* roots and leaves. Antioxidant activities of *Allium hookeri* extracts were determined based on various radical scavenging activities using an ESR spectrophotometer, ferric reducing antioxidant power, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity, and oxygen radical absorbance capacity assays. In addition, we investigated anti-inflammatory effects of *Allium hookeri* extract on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW264.7 cells. We also explored the effects of extract from *Allium hookeri* root on suppression of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α against LPS-induced activation of RAW264.7 cells. Our results demonstrated superior antioxidant activity for leaf extract of *Allium hookeri* compared to extract from root of *Allium hookeri*. On the other hand, root extract of *Allium hookeri* showed better anti-inflammatory activity compared to leaf extract. Our study suggests that *Allium hookeri* extract exhibits strong antioxidant activity and anti-inflammatory effects and can be developed as a potential therapeutic candidate for diseases involving oxidative stress and inflammation.

Key words: antioxidant activity, anti-inflammatory effect, *Allium hookeri*, reactive oxygen species

서 론

생체 대사 과정 중에 끊임없이 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 노화, 암, 심장질환, 동맥경화, 염증 등 다양한 질병을 유발한다(1). 특히 산화적 스트레스는 체내 염증의 진행과정의 원인으로 알려져 있는데, 이와 관련된 ROS와 염증성 사이토카인은 염증성 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다(2). 따라서 연구자들은 이러한 산화적 스트레스의 발생을 억제하거나 생성된 ROS를 제거할 수 있는 항산화제의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다.

항산화 물질(antioxidant)은 불포화지방산의 자동산화에 의해 생성되는 지질과산화물을 억제하고, 생체 대사 과정 중에 생성되는 각종 활성산소종에 의한 지질과산화반응을 억

제하여 암, 동맥경화증, 염증, 당뇨 및 노화를 예방해주는 생리활성 물질로서 크게 각광을 받고 있다(3). 특히 천연에서 유래한 phytochemical은 합성 항산화제에 비해 부작용이 적을 뿐만 아니라 다양한 생리활성을 가지고 있기 때문에 이를 이용하여 기능성 소재로서 활용을 하고자 하는 많은 연구가 수행되고 있다(4-6).

삼채(三菜, *Allium hookeri*)는 *Allium* 속 식물로 뿌리 부추라고도 부르며, 인도, 부탄, 중국 남서부, 미얀마 등에 자생하며 현지에서는 식용 및 피로회복과 면역력 증강 등의 약용으로 사용되고 있는 유용한 채소이다.

우리나라에서 오래전부터 식용 및 약용으로 사용해 온 *Allium* 속 식물로는 양파, 부추, 마늘, 달래, 파 등이 있으며, 최근에 삼채를 한국에 들여와 재배에 성공하였다. 이러한 일상 식생활에 사용되고 있는 *Allium* 속 향신채소들은 항산화 활성 및 유해산소 소거작용뿐만 아니라 지질과산화 억제 효능들이 밝혀져 있다(7,8).

삼채는 단맛, 쓴맛, 매운맛이 난다고 하여 삼채(三菜)라고 부르며 인삼 맛이 난다고 하며 삼채(蔘菜)라고 부르기도 하는데, 이러한 삼채를 이용하여 삼채 분말 첨가 소고기 패티의 품질 특성 및 저장성의 연구(9), 삼채가루 첨가 식빵의

Received 3 September 2014; Accepted 21 October 2014

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Jae-Hyun Jeong, Department of Food and Biotechnology, Korea National University of Transportation, Chungju, Chungbuk 380-702, Korea
E-mail: jhjeong@ut.ac.kr, Phone: +82-43-820-5248

제조조건(10), 삼채뿌리를 첨가한 김치의 품질 특성에 관한 연구(11), 삼채 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과에 관한 연구(12) 등 여러 가지 연구들이 진행되고 있다. 특히 삼채뿌리 추출물은 대식세포를 이용한 실험에서 HO-1을 유도하고, p38의 활성을 억제하고 nitrite와 IL-1 β 의 생성을 억제하여 높은 항염증 효과가 있음이 보고되었다(7,13). 그러나 삼채에 관한 생리활성 규명 및 기능성 제품화에 관한 연구가 아직 부족한 실정하기에 본 연구는 삼채의 뿌리와 잎을 물과 주정으로 추출한 추출물 간의 항산화 활성 및 항염증 효과를 비교 분석하여 삼채의 항산화 및 항염증 소재개발의 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출

본 연구에 사용한 삼채는 청원삼채영농조합법인에서 2014년 4월에 수확한 것을 제공받아 사용하였다. Folin-Ciocalteu's reagent, ferrous chloride(FeCl₂), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), potassium persulfate, lipopolysaccharide(LPS), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외에 사용된 시약은 특급 및 일급을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시료 추출은 동결 건조된 삼채를 잎과 뿌리로 나누고, 물 추출은 건조 분말 시료 100 g을 3차 증류수 1 L를 첨가하여 95°C에서 120분 동안 추출하였다. 주정 추출은 건조 분말 시료 100 g을 80% 주정 1 L에 넣어 95°C에서 8시간 환류냉각 추출방법으로 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 41, Whatman, Maidstone, UK)로 잔사를 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 동결 건조하였으며, 건조된 추출물은 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(14)을 약간 변형하여, 추출물 1.0 mL에 1.0 N Folin-Ciocalteu 시약 및 20% Na₂CO₃ 용액을 각 1.0 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 30분 정치한 후 분광광도계(SECOMAM, Ales, France)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 0~200 μ g/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였고 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량(total flavonoid content)은 Jia 등(15)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시료액 250 μ L에 5% NaNO₂ 75 μ L를 첨가하여 상온에서 5분간 반응시킨 후

에 10% AlCl₃ 150 μ L를 첨가하였다. 이 용액에 1 M NaOH 0.5 mL와 증류수 275 μ L를 첨가한 후에 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며, catechin(Sigma-Aldrich Co.)을 표준물질로 하여 0~1 mg/mL의 농도 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 DPPH radical 소거능 측정

라디칼 소거능 측정은 Lee 등(16)의 방법에 따라 메탄올에 용해시킨 60 μ M DPPH 60 μ L와 농도별로 준비한 시료 60 μ L를 섞은 후 10초간 강하게 교반하여 2분간 실온에서 반응시킨 후 capillary tube에 옮겨 ESR spectrometer(Jeol Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 측정하였으며, 그 측정 조건은 central field 3475 G, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 2 G, microwave power 5 mW, gain 6.3×10^5 , temperature 298 K였다.

전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 alkyl radical 소거능 측정

20 μ L의 PBS, 20 μ L의 농도별 시료, 20 μ L의 40 mM AAPH, 20 μ L의 40 mM 4-POBN을 차례로 첨가하여 10초간 강하게 교반한 후 37°C 항온 수조에서 30분간 반응시킨 다음, capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer로 alkyl radical 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field 3475 G, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 2 G, microwave power 10 mW, gain 6.3×10^5 , temperature 298 K였다.

전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 hydroxyl radical 소거능 측정

농도별 시료 0.2 mL에 0.3 M의 DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 0.2 mL, 10 mM의 FeSO₄ 0.2 mL 및 10 mM의 H₂O₂ 0.2 mL를 차례로 첨가한 후 10초간 강하게 교반한 다음, 2.5분간 실온에서 반응시키고 반응 혼합물을 capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer에서 하이드록실 라디칼 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field 3475 G, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 2 G, microwave power 1 mW, gain 6.3×10^5 , 온도 298 K였다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Park과 Kim(17)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.6 mM potassium persulfate를 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 734 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록

록 증류수로 조정한 후 200 μ L를 취하고 삼채 추출물을 농도별로 20 μ L를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FRAP(ferric reducing antioxidant power)을 이용한 총항산화력 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(18)의 방법을 사용하였다. 즉 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 및 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 이어서 여러 가지 농도의 시료액 0.15 mL와 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 표준물질로 환산하여 FRAP value(mM)로 나타내었다.

Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) 측정

삼채 추출물의 항산화 활성을 과산화 라디칼의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율로 측정하였다. 과산화 라디칼의 생성을 위해 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였고, 항산화 활성 비교 표준액으로 20 μ M trolox를 사용하였다. Fluorescent 표준용액은 Ou 등(19)의 방법에 따라 fluorescein sodium salt(Sigma-Aldrich Co.)를 75 mM phosphate buffer에 가하여 78 μ M 농도로 제조하였다. 항산화 활성의 측정은 1 mg/mL 농도의 삼채 추출물과 표준액 50 μ L에 fluorescent 표준용액 50 μ L를 가하고, 과산화 라디칼 유발물질인 AAPH를 인산완충액에 가해 221 mM로 희석한 후 25 μ L를 가하여 반응시킨 후, spectrofluorometer(SpectraMax M2/M2e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 excitation 485 nm, emission 538 nm에서 2시간 동안 5분마다 형광을 측정하였다. ORAC는 trolox를 이용하여 산출하였는데, 그 식은 다음과 같다.

$$\text{ORAC}(\mu\text{M TE}) = \frac{C_{\text{trolox}} \cdot (\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{Blank}})}{C_{\text{sample}} \cdot (\text{AUC}_{\text{trolox}} - \text{AUC}_{\text{Blank}})} \times 100$$

C_{trolox} 는 trolox의 농도(20 μ M), C_{sample} 는 샘플의 농도(g/L)이며 AUC(area under curve) 계산식은 다음과 같다.

$$\text{AUC} = 1 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_{n+5}/f_0$$

세포 배양

정상 간세포(human liver cells, Chang) 및 RAW264.7 대식세포는 불활성화한 10% fetal bovine serum(FBS)과 1.0% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

세포 독성 측정

간세포를 이용한 세포독성 측정은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide,

Sigma-Aldrich Co.) 방법을 이용하여 세포의 생존율로 측정하였다(20). Chang 세포를 48-well plates에 7×10^3 cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액을 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. DMSO를 200 μ L 넣어 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide(NO) 함량 및 세포의 생존율 측정

RAW264.7 대식세포를 5×10^4 cells/well의 농도로 24 well plate에 분주하여 12시간 배양한 후에 삼채 추출물 농도별(0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)로 처리한 다음, 한 시간 후 100 ng/mL의 LPS를 처리하고 20시간 더 배양하였다. 세포 배양액을 회수한 후 MTT 용액을 넣고 37°C에서 3시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 formazan이 생성되도록 하였다. 생성된 formazan이 배지에서 떨어져 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거한 후 DMSO를 넣어 20분 동안 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율을 측정하였다. 회수한 세포 배양액 100 μ L와 Griess 시약 100 μ L를 혼합하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader (SECOMAM)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였고 sodium nitrate로 표준 곡선을 작성하여 NO 함량을 산출하였다(21).

염증성 사이토카인 측정

12 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 RAW264.7 세포를 분주한 후 12시간 동안 배양하고 농도별 삼채 추출물을 처리하였다. 한 시간 후 LPS(100 ng/mL)를 처리하고 20시간 배양하였다. 이후 배양액을 회수하여 TNF- α 및 IL-6의 사이토카인 측정에 사용하였으며 측정방법은 다음과 같다. 각 사이토카인에 반응하는 항체가 코팅된 96 well plate에 각 standard와 샘플들을 각 50 μ L씩 분주하여 overnight 하였다. 3회 세척한 후 Streptavidin-HRP solution을 well당 100 μ L씩 분주하여 30분간 반응시키고, 3회 세척 후 마지막으로 TMB substrate solution을 각 well당 100 μ L씩 분주하여 실온 암소에서 반응시켰다. Stop solution 100 μ L씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

세포내 활성산소종 소거능

12 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 RAW264.7 세포를 분주한 후 12시간 동안 배양하고 농도별 삼채 추출물을 처리하였다. 한 시간 후 LPS(100 ng/mL)를 처리하고 20시간 후 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 최종 농도 10 μ g/mL가 되도록 넣고 37°C에서 30분

간 더 배양하였다. 세포를 회수한 후 유세포 분석기로 측정하고 CellQuest software(Becton & Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

통계분석

각 군 간의 유의성의 검증은 GraphPad Prism 5.0 version(San Diego, CA, USA)을 이용하여 One-way ANOVA 중 Tukey test 및 Dunnett test로 검증하여 *P*값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

삼채뿌리의 물 추출물과 주정 추출물의 수율은 56.09%, 20.78%, 삼채잎의 물 추출물과 주정 추출물의 수율은 31.79%, 27.40%를 나타내었다. 삼채의 뿌리 및 잎 모두 물 추출물의 수율이 높게 나타났다. 삼채 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드의 함량을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 총 폴리페놀의 함량을 비교한 결과 삼채뿌리의 물 추출물은 6 ± 0.2 mg GAE/g extract, 주정 추출물은 21 ± 0.1 mg GAE/g extract, 삼채잎의 물 추출물은 23 ± 0.3 mg GAE/g extract, 주정 추출물은 30 ± 0.3 mg GAE/g extract를 각각 나타내었다. 삼채 뿌리 및 잎 모두 주정 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났다.

총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 삼채 추출물에서는 총 플라보노이드 함량이 없는 것으로 나타났으며, 이는 삼채 추출물에는 비플라보노이드계 폴리페놀이 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다.

ESR을 이용한 라디칼 소거 활성

전자스핀공명기기(ESR)을 이용하여 DPPH, alkyl, hydroxyl 라디칼 소거 활성을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. DPPH 라디칼은 라디칼 중에서 안정한 프리 라디칼에 속하기에 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 삼채뿌리 물 추출물과 주정 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, IC₅₀ 값이 각각 1.828 ± 0.022 mg/mL, 0.485 ± 0.026 mg/mL를 나타내었다. 삼채잎의 물 추출물과 주정 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 IC₅₀ 값이 각각 0.418 ± 0.023 mg/mL, 0.633 ± 0.012 mg/mL를 나타내었으며, 삼채잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 삼채뿌리 추출물보다 높게 나타났다. 삼채뿌리 물 추출물과 주정 추출물의 alkyl 라디칼 소거 활성 IC₅₀ 값은 각각 0.457 ± 0.023 mg/mL, 0.297 ± 0.021 mg/mL를 나타내었으며, 삼채잎의 물 추출물과 주정 추출물의 alkyl 라디칼 소거 활성 IC₅₀ 값은 0.218 ± 0.014 mg/mL, 0.199 ± 0.004 mg/mL를 각각 나타내었다.

또한 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 비교한 결과 삼채뿌리 물 추출물과 주정 추출물의 IC₅₀ 값이 각각 5.086 ± 0.152 mg/mL, 6.762 ± 0.226 mg/mL를 나타내었으며, 삼채잎 물 추출물과 주정 추출물의 hydroxyl 라디칼 소거 활성 IC₅₀ 값은 각각 4.501 ± 0.262 mg/mL, 6.429 ± 0.314 mg/mL를 각각 나타내었다.

이상의 결과는 삼채잎 추출물이 뿌리의 추출물보다 라디칼 소거 활성이 높은 것으로 나타났으며, 이는 삼채잎 추출물이 뿌리 추출물보다 총 폴리페놀 함량이 높기 때문인 것으로 판단된다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력

삼채 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 평가한 결과를

Table 1. Extraction yields, total polyphenol, and total flavonoid contents of *Allium hookeri* extracts

Sample		Extraction yields (%, w/w)	Total polyphenol (mg GAE/g extract)	Total flavonoid (mg CE/g extract)
Root	Water extract	56.09	6 ± 0.2 ¹⁾	ND
	80% ethanolic extract	20.78	21 ± 0.1	ND
Leaf	Water extract	31.79	23 ± 0.3	ND
	80% ethanolic extract	27.40	30 ± 0.3	ND

GAE, gallic acid equivalents; CE, catechin equivalents.

ND is an abbreviation for not detected.

¹⁾Values represent means±SD (*n*=4).

Table 2. DPPH, alkyl, and hydroxyl radical scavenging activity of the *Allium hookeri* extracts measured by an ESR spectrophotometer

Sample		DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)	Alkyl radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)	Hydroxyl radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)
Root	Water extract	1.828 ± 0.022 ¹⁾	0.457 ± 0.023	5.086 ± 0.152
	80% ethanolic extract	0.485 ± 0.026	0.297 ± 0.021	6.762 ± 0.226
Leaf	Water extract	0.418 ± 0.023	0.218 ± 0.014	4.501 ± 0.262
	80% ethanolic extract	0.633 ± 0.012	0.199 ± 0.004	6.429 ± 0.314

¹⁾Values represent means±SD (*n*=3).

Table 3. ABTS radical scavenging activity, FRAP (ferric reducing antioxidant potential), and ORAC of the *Allium hookeri* extracts

Sample		ABTS radical scavenging activity (%)	FRAP value (mM)	ORAC ($\mu\text{M TE/mg extract}$)
Root	Water extract	29.32 \pm 0.02 ¹⁾	0.20 \pm 0.01	77.04 \pm 3.61
	80% ethanolic extract	64.58 \pm 0.12	0.51 \pm 0.06	92.63 \pm 4.68
Leaf	Water extract	71.12 \pm 0.23	0.56 \pm 0.02	94.08 \pm 0.72
	80% ethanolic extract	60.89 \pm 0.16	0.70 \pm 0.01	95.25 \pm 0.44

ORAC, oxygen radical absorbance capacity; TE, trolox equivalents.

¹⁾Values represent means \pm SD ($n=3$).

Table 3에 나타내었다. 삼채뿌리 물 추출물은 10 mg/mL의 농도에서 29.32 \pm 0.02%의 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 삼채뿌리 주정 추출물은 64.58 \pm 0.12%의 소거활성을 나타내었다. 삼채잎 물 추출물은 10 mg/mL의 농도에서 71.12 \pm 0.23%, 삼채잎 주정 추출물은 60.89 \pm 0.16%의 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

FRAP을 이용한 총 항산화력

삼채 추출물의 FRAP법을 이용한 총 항산화력 평가 결과를 Table 3에 나타내었다. 삼채뿌리 물 추출물의 FRAP value는 0.20 \pm 0.01 mM, 삼채뿌리 주정 추출물은 0.51 \pm 0.06 mM을 나타내었다. 삼채잎 물 추출물의 FRAP value는 0.56 \pm 0.02 mM, 삼채잎 주정 추출물은 0.70 \pm 0.01 mM을 나타내었다. 실험 결과 삼채잎의 주정 추출물 > 삼채잎의 물 추출물 > 삼채뿌리의 주정 추출물 > 삼채뿌리의 물 추출물 순으로 FRAP value가 높았다. 이는 총 폴리페놀 함량과 ORAC의 결과와 비슷한 경향을 나타내었는데, 총 폴리페놀 함량과 FRAP value와 밀접한 관계가 있다고 보고한 Kim 등(22)과 유사한 결과를 나타낸다.

ORAC에 의한 항산화 활성 측정

ORAC assay를 통하여 AAPH에 의해 생성된 free radical에 대한 항산화 물질의 소거 활성을 형광도로 측정된 결과, 삼채 추출물의 항산화 활성은 Table 3에 나타낸 바와 같이 삼채뿌리 물 추출물의 ORAC는 77.04 \pm 3.61 $\mu\text{M TE}$ (trolox equivalents)/mg extract, 삼채뿌리 주정 추출물은 92.63 \pm 4.68 $\mu\text{M TE/mg extract}$ 를 나타냈다. 삼채잎 물 추출물의 ORAC는 94.08 \pm 0.72 $\mu\text{M TE/mg extract}$, 삼채잎 주정 추출물은 95.25 \pm 0.44 $\mu\text{M TE/mg extract}$ 를 나타냈다. Cai 등(23)은 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성과 높은 상관관계를 나타낸다고 보고하였는데, 삼채 추출물의 ORAC 결과는 이와 유사한 경향을 나타내었다.

세포독성 측정

삼채 추출물의 독성 평가는 정상 간세포주인 Chang 세포를 이용하여 MTT assay로 측정하였다. 삼채뿌리의 물 추출물과 주정 추출물 및 삼채잎의 주정 추출물은 1.0 mg/mL의 농도 이하에서 간세포의 생존율이 100% 이상을 나타내어 전혀 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 그러나 삼채잎 물

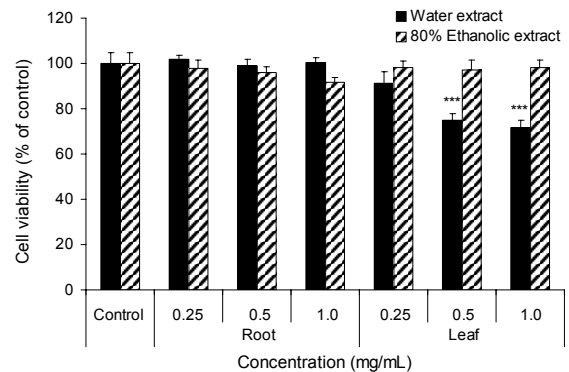


Fig. 1. Cytotoxicity of *Allium hookeri* extracts on Chang cells. *Allium hookeri* extracts were treated with various concentrations on Chang cells for 24 hr. Values are expressed as the mean \pm SD of determinations made in triplicate experiments. *** $P<0.001$, versus control group.

추출물을 농도별로 처리한 결과 0.5 mg/mL 농도까지는 세포독성이 나타났으며, 0.25 mg/mL 농도 이하에서는 세포독성이 나타나지 않았다.

NO 생성 억제 효과 및 세포 생존율 측정

대식세포는 LPS를 toll like receptor 4(TLR4)를 인식하여 세포내 전사요소인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)의 활성화를 유도하는데, 활성화된 NF- κ B는 염증성 cytokine과 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현을 유도하고 염증반응의 지표물질인 NO를 다량으로 생성한다(24). 과다한 NO의 생성은 염증반응을 심화시켜 조직의 손상 및 신경손상 등을 일으킨다(25). 따라서 RAW264.7 대식세포에서 삼채 추출물을 한 시간 전 처리한 후 LPS를 20시간 처리하여 삼채 추출물이 LPS에 의해 유도되는 염증매개인자인 NO의 생성에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 100 ng/mL의 LPS 처리에 의해 10배 이상 증가된 NO 양이 삼채 추출물의 전처리에 의해 억제되었다. 특히 삼채뿌리의 물 추출물과 주정 추출물 모두 높은 NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 삼채뿌리의 물 추출물은 0.05 mg/mL의 농도에서 50% 이상의 NO 생성을 억제하였으며, 삼채잎의 주정 추출물 또한 0.2 mg/mL의 농도에서 약 50% 정도 NO 생성을 억제하였다. 삼채뿌리의 주정 추출물과 삼채잎의 물 추출물은 농도의존적으로 NO 생성을 억제하였으며, 삼채뿌리의 물 추출

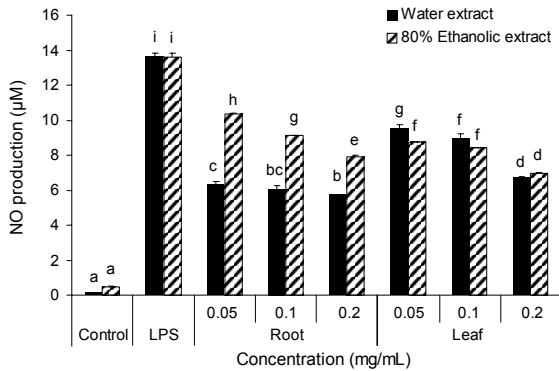


Fig. 2. NO production of *Allium hookeri* extracts on RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were preincubated with 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL of *Allium hookeri* extracts for 1 hr. And then the cells were treated with LPS (100 ng/mL) to induce NO production for 20 hr. The NO production was measured by Griess reagent as described in Materials and Methods. Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$).

물이 가장 높은 NO 생성 억제를 나타내었다. 삼채뿌리의 경우는 물 추출물이 주정 추출물보다 NO 생성 억제가 우수하였으며, 삼채잎의 경우는 주정 추출물이 물 추출보다 NO 생성 억제가 우수하였다.

삼채의 뿌리와 잎의 추출 방법에 따라 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 NO 생성 억제능에 미치는 영향을 살펴본 결과, 삼채뿌리의 물 추출물 > 삼채잎의 주정 추출물 > 삼채뿌리의 주정 추출물 > 삼채잎의 물 추출물 순으로 NO 생성 억제능이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 0.2 mg/mL의 농도까지 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았기 때문에 RAW264.7 세포에 독성을 나타내지 않은 것을 확인하였다(Fig. 3).

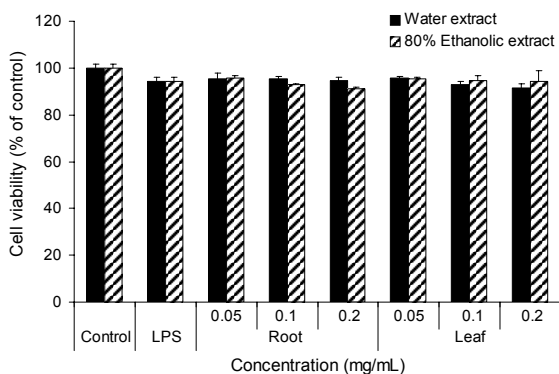


Fig. 3. Cytotoxicity of *Allium hookeri* extracts on RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were preincubated with 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL of *Allium hookeri* extracts for 1 hr. And then the cells were treated with LPS (100 ng/mL) for 20 hr. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments.

염증성 사이토카인 측정

여러 가지 사이토카인 중에서 IL-6과 TNF- α 는 대표적인 염증성 사이토카인으로 활성화된 대식세포에 의해 주로 생산되는데, TNF- α 의 과다 생성은 발열, 세포사멸 및 염증을 유도하며 IL-1 및 IL-6를 생산하여 다양한 질병의 요인이라고 알려져 있다(26). 따라서 이러한 염증성 사이토카인을 조절하는 물질은 염증반응으로 유도된 다양한 질병을 조절할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있다. Fig. 4와 Fig. 5는 삼채 추출물이 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 나타낸다.

본 실험에서 RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리하였을 때 LPS 무처리군에 비하여 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 가 현저히 증가하였다. 그러나 삼채 추출물을 한 시간 전 처리하였을 때 IL-6와 TNF- α 가 감소하였으며, 시료 농도가 높을수록 IL-6와 TNF- α 가 유의적으로 억제되었다.

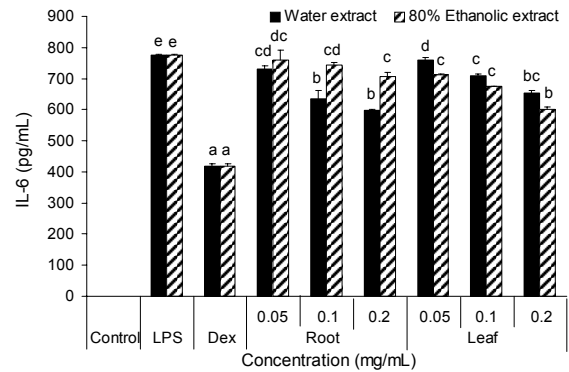


Fig. 4. Inhibitory effects on IL-6 production of *Allium hookeri* extracts on RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were preincubated with 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL of *Allium hookeri* extracts for 1 hr. And then the cells were treated with LPS (100 ng/mL) for 20 hr. Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$). Dex: dexamethasone.

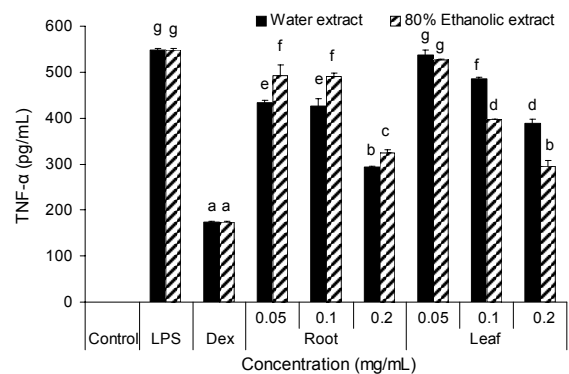


Fig. 5. Inhibitory effects on TNF- α production of *Allium hookeri* extracts on RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were preincubated with 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL of *Allium hookeri* extracts for 1 hr. And then the cells were treated with LPS (100 ng/mL) for 20 hr. Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$). Dex: dexamethasone.

특히 IL-6와 TNF- α 는 삼채뿌리의 물 추출물의 경우가 가장 높은 억제력을 보여주었다. 삼채뿌리의 경우는 물 추출물이 주정 추출물에 비해 염증성 사이토카인의 억제력이 높았으며 삼채잎의 경우는 주정 추출물이 물 추출물에 비해 염증성 사이토카인의 억제력이 높게 나타났는데, 이는 NO 생성 억제 결과와 같은 경향을 나타내었다. Kwak과 Lee(27)는 LPS를 처리한 RAW264.7 대식세포에 달맞이순 에탄올 추출 시료를 처리한 결과 농도 의존적으로 IL-6 생성을 감소시키는 결과를 나타내었으나, 동일조건에서 TNF- α 에는 영

향을 나타내지 않았다고 보고하였다. 그러나 삼채 추출물은 IL-6보다는 TNF- α 의 생성을 훨씬 감소시켰으며, 삼채뿌리 물 추출물 > 삼채잎의 주정 추출물 > 삼채뿌리의 주정 추출물 > 삼채잎의 물 추출물 순으로 사이토카인을 억제하였다.

세포내 활성산소종(ROS) 소거능 측정

RAW264.7 대식세포에서 LPS로 ROS를 유도하였을 때 삼채 추출물이 세포내 ROS에 미치는 영향을 확인하였다. 삼채 뿌리 및 잎의 물 추출물과 주정 추출물을 한 시간 전처

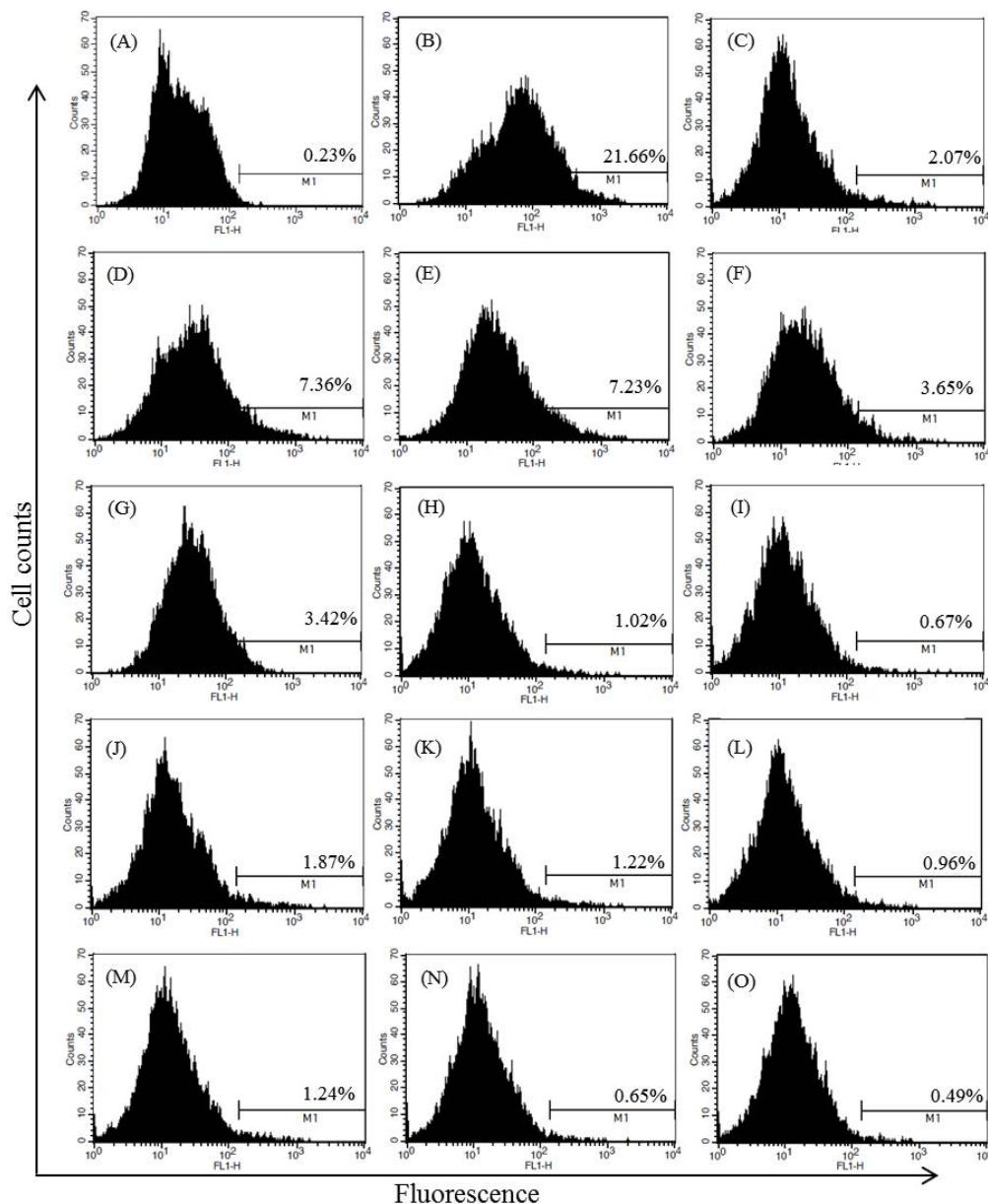


Fig. 6. Intracellular ROS production in RAW264.7 cells by a flow cytometer. *Allium hookeri* extracts were treated in RAW264.7 cells for 1 hr prior to LPS (100 ng/mL) treatment 20 hr. (A) Control, (B) LPS, (C) LPS+dexamethasone, (D) LPS+0.05 mg/mL (root, water extract), (E) LPS+0.1 mg/mL (root, water extract), (F) LPS+0.2 mg/mL (root, water extract), (G) LPS+0.05 mg/mL (root, ethanolic extract), (H) LPS+0.1 mg/mL (root, ethanolic extract), (I) LPS+0.2 mg/mL (root, ethanolic extract), (J) LPS+0.05 mg/mL (leaf, water extract), (K) LPS+0.1 mg/mL (leaf, water extract), (L) LPS+0.2 mg/mL (leaf, water extract), (M) LPS+0.05 mg/mL (leaf, ethanolic extract), (N) LPS+0.1 mg/mL (leaf, ethanolic extract), (O) LPS+0.2 mg/mL (leaf, ethanolic extract).

리하고 LPS를 처리하여 유도된 ROS를 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 아무 것도 처리하지 않은 무처리군의 ROS의 양에 비해 LPS를 처리한 대조군의 ROS의 양은 22.66%로 현저히 증가하였다. 그러나 삼채 뿌리 및 잎의 물 추출물과 주정 추출물을 전처리한 군은 모두 7.36%에서 0.49%로 ROS의 양이 모두 농도 의존적으로 감소됨을 보여주었으며, 양성대조군으로 사용한 dexamethasone과도 비슷한 효과를 나타내었다. Jeong 등(28)은 소목 추출물이 세포내 ROS 억제제를 통하여 NO 생성을 저해한다고 보고하였는데, 삼채 추출물은 세포내 ROS를 효과적으로 소거하지만 NO 생성 억제와 일치하지는 않았다.

요 약

본 연구는 삼채의 뿌리와 잎을 물과 주정을 이용하여 추출하여 항산화 활성 및 항염증 효과를 비교 평가하였다. 삼채의 추출물에 포함된 총 폴리페놀 함량과 전자스핀공명기기를 이용한 DPPH, alkyl, hydroxyl 라디칼 소거능, ABTS를 이용한 라디칼 소거 활성 및 FRAP 및 ORAC을 이용한 항산화 활성을 평가하였는데, 삼채뿌리 추출물보다는 삼채잎 추출물의 항산화 활성이 높았으며 이는 잎에 포함된 총 폴리페놀 함량과 관련이 있을 것으로 판단된다. 물 추출의 경우가 뿌리와 잎 모두 수율이 높았으며 폴리페놀 함량과 ORAC value와 alkyl 라디칼 소거 활성은 비슷한 경향을 나타내었으나 DPPH와 hydroxyl 라디칼 소거 활성과는 다른 결과를 나타내었다. 또한 간세포를 이용한 세포 독성 평가 실험 수행 결과, 0.25 mg/mL의 농도까지는 삼채의 뿌리와 잎의 물 추출물 및 주정 추출물 모두 독성을 나타내지 않았다. RAW264.7 세포를 이용하여 독성을 나타내지 않는 농도인 0.2 mg/mL 이하에서 항염증 활성 평가를 수행한 결과 삼채 뿌리 및 삼채잎의 물과 주정 추출물은 모두 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 나타내었다. 뿐만 아니라 삼채 추출물은 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 의 생성을 감소시켰으며, 특히 삼채뿌리 물 추출물은 가장 높은 IL-6와 TNF- α 의 생성 억제를 나타내었다. 또한 삼채 추출물이 LPS로 유도한 세포내 활성산소종을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 위의 결과로 삼채잎 추출물은 항산화 활성이 우수하고 삼채뿌리 추출물은 항염증 활성이 높음을 확인하였다. 따라서 삼채 추출물이 우수한 항산화 및 항염증 활성을 가지고 있는 것으로 판단되며, 이와 관련된 항산화 및 항염증 생리활성 물질에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 한국교통대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Fukuzawa K, Takaoshi Y. 1990. Antioxidants. *J Act Oxyg Free Rad* 1: 55-70.
2. Chung EK, Seo EH, Park JH, Shim HR, Kim KH, Lee BR. 2011. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Korean J Org Agric* 19: 245-253.
3. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1361-1370.
4. Grice HC. 1988. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol* 26: 717-723.
5. Patel VR, Patel PR, Kajal SS. 2010. Antioxidant activity of some selected medicinal plants in western region of India. *Advan Biol Res* 4: 23-26.
6. Jin KS, Oh YN, Park JA, Lee JY, Jin SJ, Hyun SK, Hwang HJ, Kwon HJ, Kim BW. 2012. Anti-oxidant, anti-melanogenic, and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract and its solvent fractions. *Korean J Microbiol Biotechnol* 40: 371-379.
7. Bae GC, Bae DY. 2012. The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium hookeri* cultivated in South Korea. *Kor J Herbology* 27: 55-61.
8. Jung HS, Noh KH, Cho HY, Park JY, Choi CY, Kwon TW, Song YS. 2003. Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Life Sci* 13: 333-342.
9. Kim DS. 2014. Quality characteristics and storage stability of beef patty with the addition of juumyit (*Allium hookeri*) powder. *MS Thesis*. Sookmyung University, Seoul, Korea.
10. Lee HJ, Baik JE, Joo NM. 2014. Quality characteristics and storage stability of bread with *Allium hookeri* powder. *Korean J Food & Nutr* 27: 318-329.
11. You BR, Kim HJ. 2013. Quality characteristics of kimchi added with *Allium hookeri* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1649-1655.
12. Choe YS, Choe TB. 2014. Melanogenesis inhibitory effects of *Allium hookeri* extract in B16F10 mouse melanoma cell. *Kor J Aesthet Cosmetol* 12: 163-168.
13. Kim CH, Lee MA, Kim TW, Jang JY, Kim HJ. 2012. Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1645-1648.
14. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive olis. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
15. Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
16. Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Yang SI, Lee SJ, Jeon BT, Kim SK, Park PJ. 2009. Free radical scavenging activity of β -chitooligosaccharides. *J Chitin Chitosan* 14: 24-28.
17. Park MK, Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 535-540.
18. Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
19. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development

- and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
20. Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1205-1210.
 21. Kim KH, Kim HJ, Byun MW, Yook HS. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 57-583.
 22. Kim MJ, Hong CO, Nam MH, Lee KW. 2011. Antioxidant effects and physiological activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) extract from different aerial parts. *Korean J Food Sci Technol* 43: 195-199.
 23. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
 24. Jung YS, Eun CS, Jung YT, Kim HJ, Yu MH. 2013. Anti-inflammatory effects of *Picrasma quassioides* (D.DON) BENN leaves extracts. *J Life Sci* 23: 629-636.
 25. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10: 291-316.
 26. Lee HN, Lim DY, Lim SS, Kim JD, Yoon JH. 2011. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. *Korean J Food Sci Technol* 43: 65-71.
 27. Kwak CS, Lee JH. 2014. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from sprout of evening primrose (*Oenothera laciniata*) and gooseberry (*Actinidia arguta*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 207-215.
 28. Jeong IY, Jin CH, Park YD, Lee HJ, Choi DS, Byun MW, Kim YJ. 2008. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Caesalpinia sappan* L. in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Food Sci Nutr* 13: 253-258.