

달맞이순과 다래순 에탄올 추출물의 *in vitro* 항산화효과 및 항염증효과

곽충실* · 이지연

서울대학교 노화고령사회연구소

In vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from Sprout of Evening Primrose (*Oenothera laciniata*) and Gooseberry (*Actinidia arguta*)

Chung Shil Kwak[†] and Ji Hyun Lee

Institute on Aging, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT To investigate the biological benefits of Korean traditional vegetables, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from blanched and dried sprouts of evening primrose (*Oenothera laciniata*, OL) and gooseberry (*Actinidia arguta*, AA) were measured. Total polyphenol and flavonoid contents of OL were higher than those of AA; OL contained 60.4 mg tannic acid/g dry weight and 31.9 mg rutin/g dry weight, while AA contained 33.0 mg tannic acid/g dry weight and 20.3 mg rutin/g dry weight. The IC₅₀ value for DPPH radical scavenging activity was 58.2 µg/mL for OL ethanol extract and 122.1 µg/mL for AA ethanol extract. The reducing power upon 500 µg/mL of ethanol extract treatment was as strong as 52.1 µg ascorbate eq./mL for OL and 45.3 µg ascorbate eq./mL for AA. Regarding anti-inflammatory effects, inhibition rate against 5-lipoxygenase (LOX) and cyclooxygenase (COX)-2 activities were 29.5% and 79.5% for OL, as well as 11.5% and 39.1% for AA, respectively at a concentration of 250 µg/mL. Lipopolysaccharide (1 µg/mL)-treated RAW 264.7 macrophage cells subjected to OL ethanol extract at various concentrations (0~25 µg/mL) showed significantly reduced synthesis of nitrite oxide (NO), prostaglandin (PG) E₂, and IL-6 in a dose-dependent manner without cytotoxicity, although TNF-α synthesis was not affected. In conclusion, both OL and AA sprouts showed strong antioxidative activity, whereas OL showed very strong anti-inflammatory activity via effective reduction of NO, PGE₂, and IL-6 synthesis in LPS-activated macrophage cells.

Key words: evening primrose, antioxidant, antiinflammation, nitric oxide, cytokines

서 론

암, 심뇌혈관계질환, 당뇨병, 치매 등 한국인의 수명과 삶의 질을 위협하는 주요 만성질환들의 병리기전은 산화적 스트레스 및 만성적 염증과 관련성이 깊다. 활성산소는 정상적인 대사과정에서도 소량씩 생성되며 세포기능유지에 필요한 물질이지만, 환경오염이나 화학물질에 대한 노출, 스트레스, 비만 등에 의하여 생성량이 증가하거나 제거시스템의 기능이 약화되는 경우 결과적으로 산화적 스트레스가 상승하여 여러 가지 질병을 야기할 수 있다. 지속적으로 과도하게 산화적 스트레스가 상승하면 세포막, DNA, 단백질, 지단백 등을 공격하여 손상을 초래할 뿐 아니라 염증반응의 신호전달계와 연결되어 있기 때문에 전신적으로 만성적 염증반응이 유도됨으로써 심혈관계질환, 암, 치매, 당뇨병, 자가면역 질환 및 노화를 촉진한다고 알려져 있다(1,2). 활성산소는 NF-κB를 활성화시켜 염증 촉진 사이토카인들과 케모카인, 성장인자들의 발현을 촉진하고 저밀도지단백의 과산화

(oxidized-LDL)를 증가시켜 여러 조직에서 tumor necrosis factor(TNF)-α와 interleukin(IL)-6 등의 염증촉진물질들을 증가하게 한다(3).

염증반응은 광범위한 외부 자극에 대하여 신체를 보호하기 위한 가장 중요한 면역작용 중의 하나이지만 그 정도가 과도하거나 장기화되면 여러 가지 질환을 유발하게 되는데 염증상태에서는 대식세포가 활성화되어 과도한 산화질소와 prostaglandin(PG) E₂, TNF-α 등의 염증촉진성 interleukin, 부착성 물질 등의 분비를 증가시키는 것이 특징이다(4). 활성산소 외에 산화적 스트레스를 증가시키는 또 다른 활성물질인 산화질소 역시 염증반응의 매개자로 작용하는데 염증반응이 활성화되면 여러 종류의 세포에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 발현이 촉진되고 그로 인하여 산화질소의 생성량이 증가된다. 또한 염증반응에서 중요한 역할을 하는 cyclooxygenase(COX)-2는 정상상태에서는 거의 검출되지 않다가 염증을 자극하는 신호가 오면 빠르게 발현이 유도되어 염증촉진물질인 PGE₂를 생성한다(5).

오랜 기간 스테로이드는 임상적으로 염증을 억제하는 약물로 사용되어 왔지만, 종종 간 손상, 암, 뇌졸중, 성장억제와 같은 부작용 등을 초래하여 사용 시 많은 주의와 제한성

Received 10 October 2013; Accepted 22 November 2013

[†]Corresponding author.

E-mail: kwakcs@snu.ac.kr, Phone: +82-2-740-8506

이 있으며, 아스피린, 인도메타신, 페닐부타존과 같은 비스테로이드성 항염제 역시 널리 사용되고 있지만 이 또한 위장관 출혈 등의 부작용이 있기 때문에(6) 많은 연구자들은 계속해서 보다 안전하고 효과적인 항염증 물질을 찾으려는 노력을 계속하고 있다.

국내 성인 비만율은 2011년 31.9%(남 35.2%, 여 28.6%)로 성인 3명 중 1명이 비만인 것으로 나타났는데, 이는 급격한 경제적인 성장과 함께 생활패턴 및 식생활이 서구화된 것이 주요 원인으로 생각된다(7). 비만율의 증가와 함께 빠르게 증가하는 대사증후군은 체내 산화적 스트레스 및 만성적 염증을 상승시키는 주된 요인으로 작용하여 한국인의 주요 사망원인인 암, 심뇌혈관계질환, 당뇨병과 치매 등의 발생을 촉진시키기 때문에 항산화 및 항염증 작용을 가진 천연의 식재료를 발굴하여 적극 활용할 필요가 있다.

예로부터 자연에서 다양한 식물성 식재료를 활용하여 왔던 우리나라에서는 철 따라 산과 들에 자생하는 식물의 새순, 잎, 줄기나 꽃 등을 채취하여 여러 방법으로 음식에 이용하였기 때문에 그로부터 비타민, 무기질, 섬유소 및 다양한 약리작용을 하는 생리활성물질들을 다량 섭취할 수 있었으나 환경의 변화와 식품산업의 발달 등으로 인하여 그 섭취량과 다양성이 점차 줄어들고 있다.

우리나라의 일부 남부지방에서는 달맞이꽃(*Oenothera lacinata*)과 다래(*Actinidia arguta*)의 어린잎과 줄기를 포함하는 새순을 봄철에 채취하여 삶아서 나물로 무쳐 먹거나 건조시켜 두었다가 채소가 귀한 겨울철에 주로 이용하여 왔다. 달맞이꽃은 바늘꽃과(*Onagraceae*)에 속하는 2년생 초본으로 남아메리카가 원산지이며, 우리나라에는 큰달맞이꽃, 겹달맞이꽃, 애기달맞이꽃, 긴잎달맞이꽃 등 4종이 발견된다(8). 한방에서는 뿌리와 전초를 해열 및 소염제로 사용하였고 민간요법으로는 전초를 달인 물을 피부의 염증 또는 발진 부위에 바르기도 하였으며 감기, 열, 인후염 등의 치료제로 사용하였다(9).

참다래(키위)는 중국이 원산지로서 뉴질랜드가 중국에서 들여온 종자를 개량하여 세계적인 상품화에 성공한 것으로 유명하다. 국내에서 자생하는 다래는 일반다래, 개다래, 쥐다래, 섬다래 4종으로 내륙 전 지역의 강가와 계곡에서 볼 수 있으며, 섬다래는 전남 해안 도서지역과 남해안, 울릉도, 제주 등에서 발견된다(10). 열매는 9월경에 완숙되지만 봄철에 어린 다래순이나 잎을 채취하여 덩어서 차로 음용하기도 하고 데쳐서 장아찌를 담거나 건조시켜 두었다가 겨울에 묵나물로 먹는다. 한방에서 다래의 뿌리는 항암 및 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 간종양, 폐종양, 골수종 등의 치료에 사용되어 왔으며(11), 민간에서 다래순이나 잎은 소화불량, 급성위염, 구토, 류머티즘, 중풍 치료제 및 이뇨제로 사용되어 왔다(12).

지금까지 달맞이꽃 종자유와 다래열매에 대한 국내 연구 보고는 다소 있었으나 달맞이순과 다래순에 대한 생리활성 실험 연구보고는 거의 없기에 본 연구에서는 연중 활용할

수 있는 달맞이순과 다래순 건나물을 대상으로 *in vitro* 항산화 효과 및 항염증효과를 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

추출용 에탄올(Ducksan, Ansan, Korea), 실험용 에탄올(Merck, Darmstadt, Germany), KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 (Ducksan), COX-2(Cayman, Ann Arbor, MI, USA) 및 세포 배양액으로 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Rockville, MD, USA)을 사용하였으며, 그 외에 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH), Folin-Ciocalteu reagent, diethylene glycol, rutin, tannic acid, trichloroacetic acid(TCA), potassium ferricyanide, lipopolysaccharide(LPS, phenolic extraction from *E. coli*), phosphatidic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), sodium nitrite, N-(1-naphthyl)ethylenediamine(NEDD), sulfanilamide, *N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine(TMPD), epigallocatechin gallate(EGCG), fetal bovine serum(FBS), soybean lipoxygenase(type V), linoleic acid 등 대부분의 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

시료의 구입, 전처리 및 에탄올 추출

전라북도 진안군에서 봄에 자연산 달맞이순과 다래순을 채취하여 끓는 물에 데쳐서 자연건조 시킨 제품을 로컬푸드 사업단인 진안마을(주)로부터 구입하였고, 실험실로 가져와 동결건조기(Samwon, Sungnam, Korea)에서 감압 하에 1일간 더 건조시킨 후 가정용 식품분쇄기(Hibell, Whasung, Korea)를 이용하여 곱게 분쇄하여 냉동실에 보관하였다. 시료로부터 에탄올 추출액을 얻기 위하여 건조시료 일정량에 20배 부피의 에탄올(Ducksan)을 플라스크에 붓고 입구를 봉한 다음 shaking water bath를 이용하여 30°C, 150 rpm으로 24시간 동안 2회 반복 추출하였다. 추출용액을 모아 Whatman 여과지(No.2, Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK)로 거른 후 여과액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 40°C, 감압 하에 에탄올을 증발시킨 농축액을 냉장 보관하였다가 항산화 및 항염증 효과 실험에 이용하였다.

총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정

비커에 동결건조한 건조시료 1 g과 50 mL의 75% 에탄올을 넣고 stirring bar를 이용하여 24시간 동안 교반한 후 Whatman 여과지(No.2)로 여과하여 폴리페놀과 플라보노이드 농도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 Singleton 등(13)의 방법에 따라 75% 에탄올 추출액 100 μL 에 Folin-Ciocalteu reagent 1 mL, 7.5%의 sodium carbonate

(Na₂CO₃) 800 µL를 가하고 빛을 차단하여 실온에서 30분간 방치한 후 spectrophotometer(Ultrospec 2100Pro, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 총 플라보노이드 함량은 AOAC에서 공인된 방법을 약간 수정한 Chae 등의 방법(14)에 따라 75% 에탄올 추출액 100 µL에 90% diethylene glycol 900 µL를 첨가하고, 다시 1 N NaOH를 20 µL 가한 후 37°C water bath에서 1시간 동안 둔 다음 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능

대표적인 항산화능의 지표로 이용되는 DPPH 라디칼 소거능은 Senba 등의 방법(15)에 따라 측정하였다. 시료의 에탄올 추출 농축액을 DMSO에 녹여 stock(100 mg/mL)을 만든 후 다시 에탄올로 여러 농도의 시료를 만들어 각각 200 µL씩을 취하고 에탄올에 녹인 200 µM의 DPPH 용액 800 µL를 넣어 37°C에서 30분간 incubation 한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 넣지 않은 대조군의 흡광도에 비하여 시료 처리군의 감소한 흡광도의 비율에 의하여 DPPH 라디칼 소거율을 계산하였고, 농도와 소거율과의 관계식을 이용하여 소거율이 50%에 해당하는 시료농도(IC₅₀)를 계산하였다. 양성대조군 시약으로 ascorbic acid를 사용하였다.

환원력 측정

시료의 환원력은 철 이온을 Fe⁺⁺⁺에서 Fe⁺⁺로 환원시키는 강도가 클수록 발색의 정도가 증가하는 원리를 이용하여 측정하였다(16). 에탄올 추출 농축액을 DMSO(100 mg/mL)에 녹인 후 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6)로 희석하여 100, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 만들어 0.2 mL씩을 취하고 여기에 0.5 mL의 0.2 M phosphate buffer와 0.5 mL의 potassium ferricyanide(1%, w/v)를 넣어 섞은 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액에 0.5 mL의 trichloroacetic acid(10%, w/v)를 가한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 0.5 mL를 취하여 시험관에 담고 0.5 mL의 증류수와 0.1 mL의 FeCl₃(0.1%, w/v)를 가한 후 흡광도를 700 nm에서 측정하였다. Ascorbate(AA)를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 그린 후 각 시료의 흡광도에 해당하는 ascorbic acid 농도를 계산하여 µg AA eq./mL 단위로 표시하였다.

5-Lipoxygenase(LOX) 활성 억제효과

알레르기 및 염증반응과 관련이 있는 5-LOX의 활성을 저해하는 효과를 측정하기 위하여 Coulibaly 등(17)의 방법을 이용하였다. DMSO에 녹인 에탄올 추출 농축액(100 mg/mL)을 이용하여 최종 반응액의 농도가 100, 250 µg/

mL가 되도록 0.2 M boric acid buffer(pH 9.0)로 희석하여 시료를 준비하였다. 일정량의 시료에 buffer에 용해시킨 LOX(최종 농도 160 U/mL) 용액을 가하고 25°C에서 3분간 반응시킨 후 기질인 linoleic acid(최종 농도 100 µM)를 가한 다음 곧바로 2분간 234 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 양성대조시약으로는 녹차가테킨(EGCG)을 사용하였다. 5-LOX 없이 시료만 처리한 상태의 blank 값을 얻어 실험군의 흡광도를 보정한 후 5-LOX 활성 억제율을 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Cyclooxygenase(COX)-2 활성 억제효과

항염증효과를 알아보기 위하여 Yoo와 Jeong(18)의 방법에 따라 COX-2 활성 저해효과를 측정하였다. DMSO에 녹인 에탄올 추출 농축액(100 mg/mL)을 이용하여 최종 반응액의 시료농도가 100, 250 µg/mL가 되도록 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 희석하여 시료를 준비하였다. 100 mM Tris-HCl buffer 450 µL, 30 µM EDTA 100 µL, 150 µM hematin 100 µL, COX-2(40 U/mL) 200 µL, 시료 100 µL 혼합한 다음 25°C에서 5분간 반응시킨 후 10 mM TMPD 25 µL와 20 mM 아라키돈산 용액 25 µL를 넣고 5분 후에 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군 시약으로는 EGCG를 사용하였다. COX-2 없이 시료만 처리한 상태의 blank 값을 얻어 실험군의 흡광도를 보정한 후 COX-2 활성 억제율을 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

세포배양 및 시료준비

마우스 대식세포주 RAW 264.7을 100 φ 세포배양접시에서 10% FBS(v/v), 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 함유하는 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기(Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany)에서 계대배양 하였다. 달맞이순 에탄올 추출 농축시료를 DMSO(100 mg/mL)에 용해시킨 다음 0.2 µm syringe filter로 여과하고 멸균한 DMEM 배지로 희석하여 다양한 농도의 시료를 준비하였다.

세포 독성 측정

세포에 대한 시료의 독성을 알아보기 위하여 MTT assay 방법(19)으로 분석하였다. 먼저 세포를 10% FBS를 함유하는 DMEM 배양액으로 2.5×10⁴/mL의 밀도가 되도록 준비하여 96 well plate에 각 well당 200 µL씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂의 세포배양기에서 24시간 배양하여 부착시킨 다음 무혈청 DMEM 배양액으로 교환하면서 시료를 여러 농도(0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리하고 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 MTT 용액(5 mg/mL in PBS)을 각 well에 20 µL씩 첨가하고 4시간 동안 37°C incubator(Kendro Laboratory Products)에서 반응시킨 다음 MTT 용액을 제거하고 200 µL DMSO를 첨가하

여 MTT를 환원하여 생성된 formazan을 용해시킨 후 plate reader(Emax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소(NO), PGE2, IL-6, TNF- α 생성량 측정

무혈청, 무페놀 DMEM 배지를 이용하여 RAW 264.7 세포를 12 well plate에 5×10^5 /mL의 농도로 심고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하여 부착시킨 다음 시료를 다양한 농도(0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 μ g/mL)로 처리하고 1시간 배양 후 LPS(1 μ g/mL)를 처리하여 염증반응을 촉발시키고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 다음 배양액을 취하여 NO, PGE2, IL-6, TNF- α 의 농도를 측정하였다. NO 농도는 Griess 반응법(20)으로 측정하였는데 96 well plate의 각 well에 세포배양액 100 μ L와 Griess 용액(1% SULF in 5% HCl과 0.1% NEDD를 1:1로 혼합) 100 μ L를 넣고 실온의 어두운 곳에서 20분간 두었다가 plate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 sodium nitrite를 사용하였다.

PGE2, IL-6, TNF- α 생성량 역시 배양액을 취하여 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 각각의 농도를 측정하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 3회 이상 반복하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 또한 시료들 간의 실험 측정치를 비교하기 위하여 Statistics Analysis Systems(SAS) 통계프로그램(ver 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 *t*-test 또는 ANOVA-test 실시 후 Tukey test를 실시하여 $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량

달맞이순과 다래순 건나물의 총 폴리페놀 함량은 각각 60.4 mg/g과 33.0 g tannic acid/g으로 달맞이순이 더 높았고($P < 0.001$), 총 플라보노이드 함량은 각각 31.9 mg ru-

Table 1. Polyphenol and flavonoid content of samples

	Total polyphenol content (mg tannic acid/g dry wt)	Total flavonoid content (mg rutin/g dry wt)
OL	60.42 \pm 2.13 ^{***}	31.92 \pm 1.10 [*]
AA	32.99 \pm 1.04	29.32 \pm 0.71

OL: *Oenothera laciniata*, AA: *Actinidia arguta*. Significantly different between OL and AA at ^{*} $P < 0.05$ or ^{***} $P < 0.001$, determined by *t*-test.

tin/g, 29.3 mg rutin/g으로 역시 달맞이순이 더 높았다($P < 0.05$)(Table 1).

Lee 등(8)은 제주도 해안가에 자생하는 애기달맞이꽃 전초를 음진한 후 얻은 80% 에탄올 추출액의 총 폴리페놀 함량이 63.96 mg/g이라 보고한 바 있는데 어린순만 이용한 본 연구 결과와 거의 비슷한 수준이었다.

식물계에 널리 분포하는 페놀 화합물은 다양한 구조와 분자량을 갖고 있으며, phenolic hydroxy기가 단백질 등의 분자와 결합함으로써 항산화, 항암, 항균, 항염증 효과 등의 다양한 생리활성을 나타낸다(21). 폴리페놀의 항산화효과는 강한 환원력 때문이며 활성산소에 의한 세포손상을 막아 주고 박테리아의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며(22,23), anthocyanidines, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등의 플라보노이드는 그 구조에 따라 항산화효과 또는 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다(24).

DPPH 라디칼 소거능

달맞이순과 다래순 건나물의 에탄올 추출 시료를 0~200 μ g/mL 범위에서 처리하였을 때 시료농도에 따른 DPPH 라디칼 소거율은 Fig. 1과 같으며 농도와 저해율과의 관계식으로부터 DPPH 라디칼을 50% 제거시키는 시료의 농도(IC₅₀)를 구한 결과 각각 58.2 μ g/mL와 122.1 μ g/mL로 두 시료 모두 항산화효과는 높은 수준이었지만 달맞이순의 효과가 상대적으로 더 우수하였다. 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid의 IC₅₀은 6.92 μ g/mL이었다.

본 연구에서 측정된 달맞이순 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼에 대한 IC₅₀은 제주도산 애기달맞이꽃 전초의 에탄올 추출물에서 측정된 결과인 44.21 μ g/mL(8)에 비하여 다소 높았다. Marzouk 등(25)은 달맞이꽃의 잎과 줄기를 80%

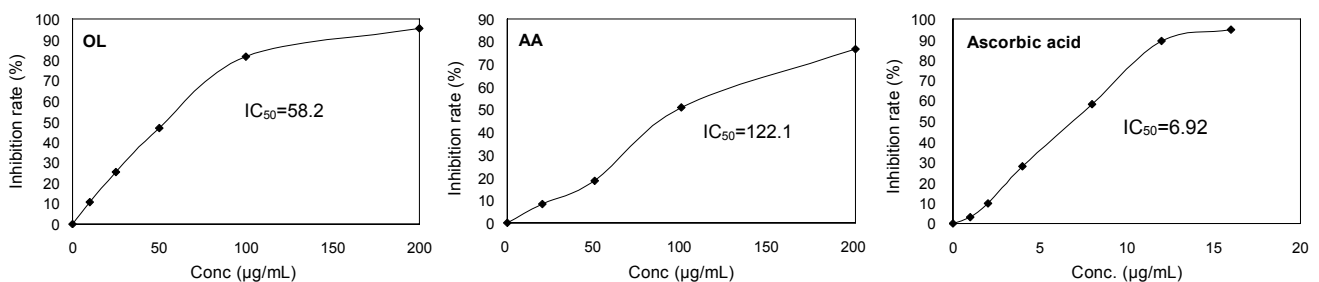


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of ethanol extract of samples. OL: *Oenothera laciniata*, AA: *Actinidia arguta*. Ascorbate was used as a positive control. IC₅₀: concentration presenting 50% inhibition effect.

Table 2. Reducing power of ethanol extract of samples

	Reducing power (μg ascorbate eq./mL)		
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
OL	11.8 \pm 0.1	52.1 \pm 0.5 ^{***}	97.0 \pm 1.8 ^{***}
AA	11.3 \pm 0.0 ^{NS}	45.3 \pm 0.7	82.2 \pm 2.1

OL: *Oenothera laciniata*, AA: *Actinidia arguta*.

NS: not significant.

Significantly different between OL and AA at the same concentration at ^{***} $P < 0.001$, determined by *t*-test.

에탄올로 추출한 추출액에서 myricitrin과 hyperin을 분리하였는데 이들은 DPPH 라디칼 소거능 실험 결과 강력한 항산화활성을 나타내었다고 하였다.

활성 라디칼인 DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy phenol 화합물 및 방향성 아민 등에 의하여 환원되어 탈색이 되는 성질을 이용하여 식물체 추출물의 항산화효과를 신속하고 간단하게 측정하는데 널리 사용되고 있으며(26), 여러 연구에서 DPPH 라디칼 소거능 및 lip-oxygenase 활성 억제 효과는 총 폴리페놀 함량과 상호 관련성이 매우 높은 것으로 보고되었다(27-29).

환원력

달맞이순과 다래순 에탄올 추출 시료를 이용하여 항산화 효과의 지표로 이용되는 환원력을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 에탄올 추출 시료를 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 달맞이순의 환원력은 각각 11.8 μg AA eq./mL, 52.1 μg AA eq./mL, 97.0 μg AA eq./mL이었고, 다래순의 환원력은 각각 11.3 μg AA eq./mL, 45.3 μg AA eq./mL, 82.2 μg AA eq./mL로 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 농도에서는 두 시료의 환원력이 비슷하였으나 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 달맞이순의 환원력이 다래순보다 더 우수하였다($P < 0.001$).

5-LOX 및 COX-2 활성 억제효과

달맞이순 에탄올 추출 시료를 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 5-LOX 활성 억제율은 각각 24.8%, 29.5%였으며, 다래순은 각각 0%, 11.5%로 달맞이순이 다래순보다 더 우수한 효과를 보였다($P < 0.05$ or $P < 0.001$). 양성 대조물질로 사용한 EGCG는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 94.4%의 5-LOX 활성 억제율을 나타내었다(Table 3).

달맞이순 에탄올 추출 시료를 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 COX-2 활성 억제율은 각각 60.8%와 79.5%이었고, 다래순은 각각 19.8%, 39.1%로 달맞이순의 효과가 훨씬 더 높았다($P < 0.001$ or $P < 0.05$). 양성 대조물질로 사용한 EGCG는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 83.4%의 COX-2 활성 억제율을 나타내었다(Table 3).

본 연구 결과 다래순과 달맞이순의 총 플라보노이드 함량은 별 차이가 없었지만 폴리페놀 함량에 있어서는 달맞이순이 월등하게 높았는데, 달맞이순이 다래순에 비하여 DPPH

Table 3. Inhibition effect of 5-LOX and COX-2 activities of ethanol extract of samples

	LOX activity inhibition rate (%)	
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
OL	24.8 \pm 4.4*	29.5 \pm 2.9 ^{***}
AA	-	11.5 \pm 1.9
EGCG	94.4 \pm 1.2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	

	COX-2 activity inhibition rate (%)	
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
OL	60.8 \pm 1.0 ^{***}	79.5 \pm 0.9*
AA	19.8 \pm 1.1	39.1 \pm 7.5
EGCG	83.4 \pm 1.0 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	

OL: *Oenothera laciniata*, AA: *Actinidia arguta*.

Significantly different between OL and AA at the same concentration at * $P < 0.05$ or ^{***} $P < 0.001$, determined by *t*-test.

라디칼 소거능, 환원력, 5-LOX 활성 억제효과 그리고 COX-2 활성 억제효과에 있어서 모두 더 우수한 결과를 보임으로써 총 폴리페놀 함량과 항산화 및 항염증 효과 간의 관련성을 예상할 수 있었다.

현대인에게 매우 흔한 질병으로 삶의 질을 떨어뜨리는 알레르기성 비염, 천식, 아토피와 같은 제1형 알레르기 반응은 생체 내 결합조직, 피부, 호흡기 등에 분포하는 비만세포가 면역글로블린(Ig) E에 의해 탈과립이 유도되면서 나타난다. 특히 포유동물의 비만세포 내에 있는 LOX에 의해 생성된 leukotriens(LTs)는 염증과 알레르기 반응을 동시에 매개하여 제1형 알레르기 증상 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(30). 본 연구에서는 LTs의 생성량을 측정하지는 않았지만 달맞이순 추출물이 5-LOX 활성을 다소 억제시키는 결과를 보였기 때문에 LTs 생성을 감소시킴으로써 알레르기로 인한 염증반응을 억제시킬 가능성을 보였다.

RAW 264.7 대식세포에 대한 달맞이순 에탄올 추출물의 세포독성

항산화효과 및 COX-2 활성 억제효과에서 더 우수한 결과를 보인 달맞이순의 에탄올 추출 시료를 RAW 264.7 대식세포에 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 MTT assay를 수행한 결과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 세포의 생존율이 유의하게 감소하였다($P < 0.001$)(Fig. 2). 따라서 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

LPS 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 달맞이순 에탄올 추출물이 NO와 PGE2 생성에 미치는 영향

NO는 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 물질로 체내방어기능, 신호전달기능, 혈관확장 등 다양한 생리기능을 나타낸다. 그러나 NO의 생성량이 정상 이상으로 지속적으로 상승하게 되면 염증성 질환이 발생할 수 있으며, 산소와 결합하여 생성된 peroxynitrite(ONOO⁻)는 세포와 조직에 산화적 손상을 주고 유전

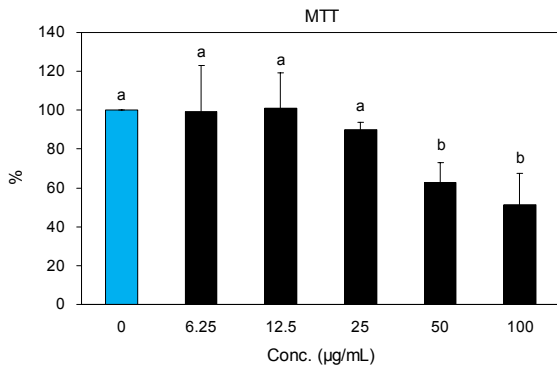


Fig. 2. Effect of *Oenothera laciniata* sprout ethanol extracts on viability of RAW 264.7 macrophage cell. After serum deprivation, cells were treated with various concentrations (0~100 µg/mL) of evening primrose (*Oenothera laciniata*) sprout ethanol extract for 24 hr. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean±SD (n=5). Means with the same letter are not significantly different at $P<0.05$, determined by ANOVA and Tukey's multiple test.

자 변이, 패혈성 쇼크 및 신경손상 등을 일으키기도 하기 때문에 생리적 수준의 NO 농도를 유지하는 것은 매우 중요하다(30,31).

PGE2는 NO와 함께 염증성 질환의 병리기전에서 가장 중요한 염증 촉진 물질 중의 하나이다. 인체는 염증을 유도하는 어떤 자극이나 물질에 노출되면 대식세포에서 iNOS와 COX-2의 발현이 크게 유도되어 매우 빠르게 NO와 PGs의

분비가 증가한다(21,32). NO는 백혈구가 염증부위로 이동하는 초기단계에 많은 역할을 하는 반면 PGE2는 발열과 통증이 나타나는 후반부에 주로 작용한다고 알려져 있다(27,33). COX-2의 작용과정은 여러 염증반응 경로의 후반부에 공통적으로 포함되는 경로이기 때문에 급성적이든 만성적이든 대부분의 항염증 약물개발 과정에서는 COX-2를 선택적으로 억제함으로써 PGE2의 생성을 억제하는 것을 목표로 한다(34).

본 실험에서 RAW 264.7 대식세포에 25 µg/mL 이하의 여러 농도(0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL)로 달맞이순 에탄올 추출물을 처리하고 LPS를 처리한 후 배지의 NO와 PGE2의 농도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

LPS 처리군(LPS+)의 NO 농도는 53.1 µM로 무처리군(LPS-)의 1.2 µM에 비하여 NO 생성량이 50배 이상 증가($P<0.001$)한 것으로 보아 LPS에 의하여 염증반응이 충분히 활성화가 된 것을 알 수 있었다. 또한 LPS 처리 전에 달맞이순 에탄올 추출물을 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL 농도로 처리하였을 때 3.125 µg/mL 처리군의 NO 농도는 51.4 µM로 시료를 처리하지 않은 대조군(LPS+)의 96.8%로 별 차이가 없었으나, 6.25, 12.5, 25 µg/mL 처리군의 NO 농도는 각각 40.6 µM, 32.3 µM, 22.6 µM로 이는 대조군(LPS+)의 76.5%, 60.7%, 42.6%에 해당하여 시료농도가 높을수록 농도 의존적으로 NO의 생성량이 유의하게 감소하는 패턴을 보였다($P<0.001$).

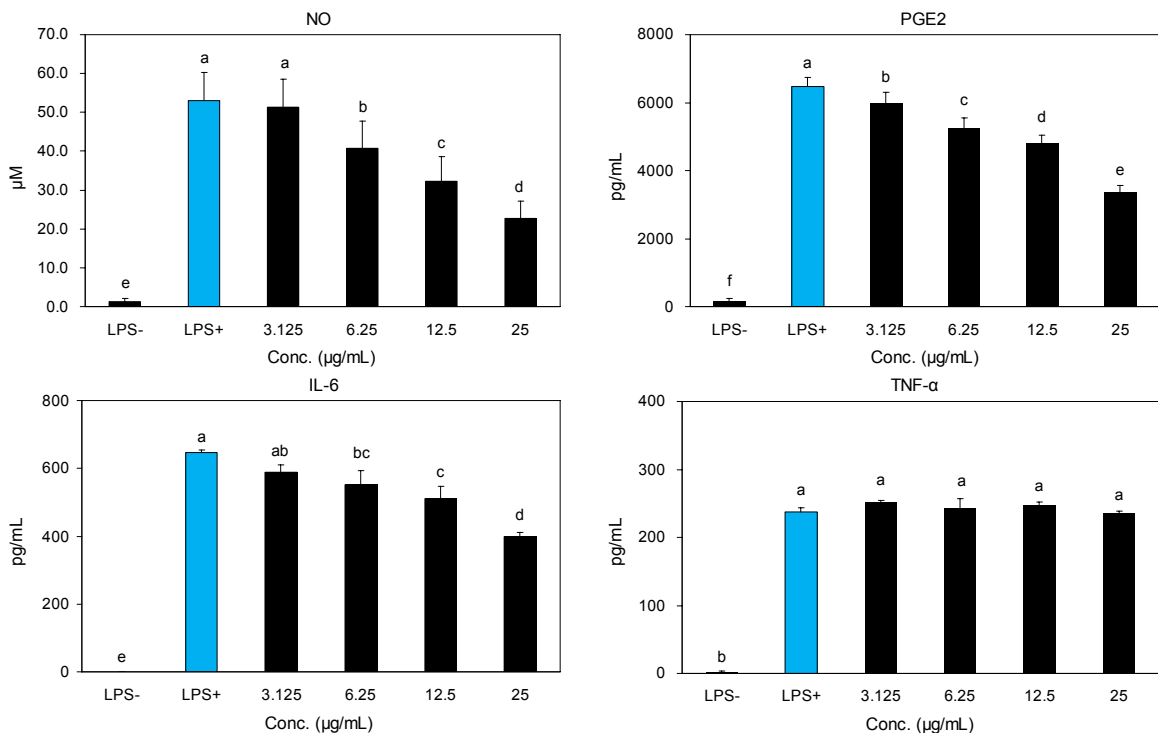


Fig. 3. Effect of *Oenothera laciniata* sprout ethanol extract on nitrite, PGE2, IL-6, and TNF-α synthesis in LPS-treated RAW 264.7 macrophage cell. After serum deprivation, cells were pretreated with various concentrations (0~25 µg/mL) of *Oenothera laciniata* sprout ethanol extract for 1 hr to LPS treatment (1 µg/mL). After 24 hr incubation, media was collected for the assay. Means with the same letter are not significantly different at $P<0.05$, determined by ANOVA and Tukey's multiple test.

또한 LPS 처리군(LPS+)의 PGE2 농도는 6,479.1 pg/mL로 무처리군(LPS-)의 171.4 pg/mL에 비하여 약 38배로 증가하였다($P < 0.001$). 달맞이순의 에탄올 추출 시료를 3.125, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 LPS를 처리한 군의 PGE2 농도는 시료를 처리하지 않은 대조군(LPS+)에 비하여 각각 92.6%, 81.2%, 74.0%, 52.0%로 나타나 시료농도가 높을수록 점차적으로 PGE2 생성량이 감소한 결과를 보였다($P < 0.001$).

RAW 264.7 대식세포에 독성을 나타내지 않는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도로 달맞이순 에탄올 추출물을 처리하였을 때 농도가 높을수록 LPS에 의해 증가된 NO 및 PGE2의 생성을 감소시키는 효과가 매우 높았기 때문에 달맞이순은 염증성 자극에 의한 대식세포의 iNOS와 COX-2의 발현 및 활성증가를 억제시킴으로써 항염증효과를 보일 것으로 기대된다.

LPS 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 달맞이순 에탄올 추출물이 IL-6와 TNF- α 생성에 미치는 영향

TNF- α , IL-6, IL-1 β 등은 선천적 면역반응에서 나타나는 가장 중요한 염증매개물질로 과도하게 생성되면 전신적인 염증질환을 초래할 수 있다. 본 실험에서 염증유도물질로 사용한 LPS는 그람 음성 박테리아 세포막의 주성분으로 단핵구와 대식세포, 내피세포 등 포유동물의 여러 세포들이 이 물질을 인지하게 되면(35) TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO, PGE2와 같은 염증촉진물질들의 생성을 빠르게 증가시키고, 심한 경우 조직이 손상되고 다발성 기관 기능저하 및 패혈성 쇼크를 초래하기도 한다(34).

본 실험에서 RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하였을 때(LPS+) 염증촉진 매개물질인 IL-6와 TNF- α 의 농도는 LPS 무처리군(LPS-)에 비하여 모두 100배 이상 크게 증가하였다($P < 0.001$). 그런데 달맞이순 에탄올 추출 시료를 LPS 처리 1시간 전에 3.125, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 전처리하였을 때 IL-6 농도는 대조군(LPS+)에 비하여 각각 91.2%, 85.5%, 79.0%, 61.7%로 감소하여 시료농도가 높을수록 IL-6 생성은 점차적으로 감소되는 결과를 보였다($P < 0.001$). 그러나 동일한 조건에서 TNF- α 의 농도에는 아무런 영향을 나타내지 않았다.

Yoon 등(36)은 LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포에 달맞이꽃 전초로부터 얻은 순차적 분획추출물을 처리한 결과 디클로로메탄 추출물이 NO, PGE2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성을 모두 가장 효과적으로 감소시켜 우수한 항염증효과를 보인 반면, 80% 에탄올 추출물은 NO와 PGE2의 생성은 감소시켰으나 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성은 감소시키지 못하였다고 하였다.

달맞이꽃의 잎에 함유되어 있는 파이토케미컬로는 quercetin, kaempferol, myricetin 등의 플라보노이드와 myricitrin, quercitrin, hyperin, caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, ellagic acid 등의 페놀화합물, salicylic acid, ferulic acid, syringic acid, vanillic acid, *p*-couma-

ric acid, gallic acid 등의 페놀산 그리고 cheiranthic acid, arjunolic acid, asiatic acid 등의 테르펜 등이 알려져 있다(37). 그러나 이들 중 어떤 성분이 항산화 및 항염증의 생리활성효과를 나타내는 유효성분인지 또 그 작용기전에 대한 연구보고는 없으므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

달맞이꽃의 잎과는 달리 연구보고가 비교적 많은 달맞이꽃 종자유는 감마리놀렌산(γ -linolenic acid, 18:3n-6)을 7~10% 정도로 다량 함유하고 있는데, 감마리놀렌산은 아토피성 피부염을 비롯한 피부질환, 류마티스 관절염, 아토피성 피부염 및 노화를 지연시키는 효과가 있을 뿐 아니라 여성의 갱년기 증상완화(38)와 심혈관계질환 예방효과(39, 40)가 있어 화장품, 의약품 및 건강보조식품 등의 소재로 이용되고 있다(41). 불포화지방산의 하나인 아라키돈산(20:4n-6)은 체내에서 COX-2와 5-LOX의 작용을 받아 염증촉진 물질인 PGs 2 계열과 LTs 4 계열이 생성되는 반면, 감마리놀렌산(18:3n-6)은 dihomogamma-linolenic acid(DGLA, 20:3n-6)로 전환된 후 LTs 4 계열의 생성을 억제하는 PGs 1 계열을 생성하기 때문에 항염증효과를 나타낸다고 보고되었다(42). 또한 달맞이꽃 종자유는 1.5~2.0%는 불검화유로 β -sitosterol과 campesterol을 비롯한 스테롤과 토크페롤, 탄화수소 및 알코올이 다량 함유되어 있는데 특히 스테롤은 혈중콜레스테롤을 낮추고 항암효과가 있으며(43) 염증촉진 물질인 NO, TNF- α , IL-1 β , thromboxane B2의 생성을 억제함으로써 항염증효과 및 염증으로 인한 손상을 막아주는 중요한 역할을 한다고 보고되었다(44). 따라서 달맞이순에도 소량이지만 감마리놀렌산이 함유되어 있을 가능성을 배제할 수 없으며 이는 후속연구를 통한 연구분석이 필요하겠다.

그 밖에 달맞이꽃의 꽃 열수추출물은 다양한 그람음성균과 그람양성균에 대하여 광범위하게 항균작용이 뛰어나고, 잎과 종자의 열수추출물도 일부 그람음성균에 대하여 항균 효과가 있다고 보고된 바 있다(45).

요 약

예로부터 봄에 채취하여 즐겨 섭취하던 달맞이순과 다래순을 전라북도 진안지역에서 건나물 상품으로 구입하여 항산화효과 및 항염증효과를 측정하였다. 달맞이순과 다래순의 총 폴리페놀 함량은 각각 60.4와 33.0 mg tannin acid/g dry wt였으며, 플라보노이드 함량은 각각 31.9와 29.3 mg rutin/g dry wt였다. 항산화효과의 지표로 에탄올 추출 시료의 DPPH 라디칼 소거능과 환원력을 측정한 결과 달맞이순과 다래순의 DPPH 라디칼에 대한 IC₅₀은 각각 58.2와 122.1 $\mu\text{g/mL}$ 였고, 환원력은 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리농도에서 각각 52.1과 45.3 ascorbate eq./mL로 2 시료 모두 우수하였지만 상대적으로 달맞이순이 더 우수하였다. 한편 항염증효과의 지표로 5-LOX와 COX-2 활성에 대한 억제율을 측정하였는데 달맞이순과 다래순 에탄올 추출 시료 250 $\mu\text{g/}$

mL 처리 시 5-LOX 활성 억제율은 각각 29.5%와 11.5%였으며, COX-2 활성 억제율은 각각 79.5%와 39.1%로 달맞이순이 더 우수하였다. 이어서 달맞이순의 항염증효과의 기전을 살펴보기 위하여 에탄올 추출 시료를 세포 독성이 없는 농도 범위에서 RAW 264.7 대식세포에 처리하고 LPS(1 µg/mL)로 염증반응을 유도한 결과, 처리농도가 높아질수록 NO, PGE2, IL-6 생성량은 점차 감소하였지만 TNF-α의 생성량은 변화가 없었다. 본 실험 결과 달맞이순과 다래순은 나물류 중에서 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 비교적 높은 편으로 항산화효과가 우수하였으며 특히 달맞이순은 항염증효과도 매우 우수한 것으로 나타났다. 따라서 달맞이순의 항염증효과 및 활성 유효성분 분석 등의 심도 있는 후속 연구와 함께 다양한 섭취방안을 강구함으로써 중노년기에 증가하기 쉬운 산화적 스트레스와 만성적 염증반응을 억제하여 만성질환을 예방하는 데 기여할 수 있기를 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 2011년 한식세계화홍역연구사업, 한식 우수성·기능성 연구(911007)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P. 2001. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem Toxicol* 39: 1205-1210.
- Kim SH, Choi JH, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. 2008. Cytoprotective effect of antioxidant activity of *Codomopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol* 40: 696-701.
- Boden G. 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18: 139-143.
- Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD. 2002. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1921-1925.
- Jung SH, Kim SJ, Jun BG, Lee KT, Hong SP, Oh MS, Jang DS, Choi JH. 2013. α-Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NFκB signalling in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 147: 208-214.
- Rainsford KD. 2007. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Sub-cell Biochem* 42: 3-27.
- Ministry of Health and Welfare & Korea Center for Disease Control and Prevention. 2012. Korea Health Statistics 2011: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES v-2). Korean Center for Disease Control and Prevention, Seoul, Korea.
- Lee JA, Kim JY, Yoon WJ, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, Park SY. 2006. Biological activities of *Oenothera laciniata* extracts (Onagraceae, Myrtales). *Korean J Food Sci Technol* 38: 810-815.
- Kim JY, Lee JA, Park SY. 2007. Antibacterial activities of *Oenothera laciniata* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 255-261.
- Hong ES, Kim MJ, Kwon EJ, Kim L, Kim DH, Eo HK, Park EJ, Kim S, Kim SH. 2008. Subacute toxicological study of PG102, a water-soluble extract derived from *Actinidia arguta*, in SD rats. *Korean J Vet Res* 48: 413-421.
- Xin HL, Wu YC, Su YH, Sheng JY, Ling CQ. 2011. Novel flavonoids from the leaves of *Actinidia valvata* Dunn: structural elucidation and antioxidant activity. *Planta Med* 77: 70-73.
- Park JH, Lee YJ, Choi JK. 2005. Pharmacognostical study on the Korean folk medicine "Da Rae Lip". *Kor J Pharmacogn* 36: 26-33.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
- Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH. 2002. *Standard food analysis*. Jigu-moonwha Sa, Seoul, Korea. p 381-382.
- Senba Y, Nishishita T, Saito K, Yoshioka H, Yoshioka H. 1999. Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound. *Chem Pharm Bull* 47: 1369-1374.
- Yildirim A, Mavi A, Kara AA. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem* 49: 4093-4089.
- Coulibaly AY, Kiendrebeogo M, Kehoe PG, Sombie PA, Lamien CE, Millogo JF, Nacoulma OG. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. *J Med Food* 14: 1576-1582.
- Yoo KH, Jeong JM. 2009. Antioxidative and antiallergic effect of persimmon leaf extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1691-1698.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
- Rice-Evance C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2: 152-159.
- Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S. 1992. The protective role of polyphenols cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res* 281: 77-80.
- Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. 1989. The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett Appl Microbiol* 8: 123-125.
- Middleton E, Kandaswami C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol* 48: 5-19.
- Marzouk MS, Moharram FA, El Dib RA, El-Shenawy SM, Tawfike AF. 2009. Polyphenolic profile and bioactivity study of *Oenothera speciosa* Nutt. aerial parts. *Molecules* 14: 1456-1467.
- Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM. 1998. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta* 1392: 291-299.
- Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49: 3420-3424.

28. Bekir J, Mars M, Souchard JP, Bouajila J. 2013. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food Chem Toxicol* 55: 470-475.
29. Kwak CS, Lee KJ, Chang JH, Park JH, Cho JH, Park JH, Kim KM, Lee MS. 2013. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from Korean sweet potato leaves and stalks. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 369-377.
30. Epe B, Ballmaier D, Roussyn I, Briviba K, Sies H. 1996. DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res* 24: 4105-4110.
31. Bordan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.
32. Guo JY, Huo HR, Yang YX, Li CH, Liu HB, Zhao BS. 2006. 2-Methoxycinnamaldehyde reduces IL-1 beta-induced prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 29: 2214-2221.
33. Monzon ME, Casalino-Matsuda SM, Forteza RM. 2006. Identification of glycosaminoglycans in human airway secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 135-141.
34. Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9: 1042-1048.
35. Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13: 85-94.
36. Yoon WJ, Ham YM, Yoo BS, Moon JY, Koh J, Hyun CG. 2009. *Oenothera laciniata* inhibits lipopolysaccharides induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and proinflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J Biosci Bioeng* 107: 429-438.
37. Singh S, Kaur R, Sharma SK. 2012. An updated review on the *Oenothera* genus. *J Chin Integr Med* 10: 717-725.
38. Farzaneh F, Fatehi S, Sohrabi MR, Alizadeh K. 2013. The effect of oral evening primrose oil on menopausal hot flashes: a randomized clinical trial. *Arch Gynecol Obstet* 288: 1075-1079.
39. Riaz A, Khan RA, Ahmed SP. 2009. Assessment of anti-coagulant effect of evening primrose oil. *Pak J Pharm Sci* 22: 355-359.
40. Fan YY, Ramos KS, Chapkin RS. 2001. Dietary γ -linolenic acid suppresses aortic smooth muscle cell proliferation and modifies atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr* 131: 1675-1681.
41. Kim HJ, Lee KS, Lee KT. 2010. Synthesis and characterization of structured lipids from evening primrose sees oil and rice bran oil. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1156-1164.
42. Belch JJ, Hill A. 2000. Evening primrose oil and borage oil in rheumatological conditions. *Am J Clin Nutr* 71: 352s-356s.
43. Bradford PG, Awad AB. 2007. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr food Res* 51: 161-170.
44. Monsterrat-de la Paz S, Fernandez-Arche A, Angel-Martin M, Garcia-Giimenez MD. 2012. The sterols isolated from Evening Primrose oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Phytomedicine* 19: 1072-1076.
45. Min SK, Park YK, Park JH, Jin SH, Kim KW. 2004. Screening of antibacterial activity from hot water extracts of indigenous plants. *J Life Sci* 14: 951-962.