

배초향 에틸아세테이트 분획의 산화방지 및 항염증 활성

김보민 · 한영은¹ · 이화진*

세명대학교 자연약재과학과, ¹숙명여자대학교 약학대학

Antioxidant and anti-inflammatory effects of the ethyl acetate fraction of the *Agastache rugosa* extract

Bomin Kim, Yeong Eun Han¹, and Hwa Jin Lee*

Department of Natural Medicine Resources, Semyung University

¹College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

Abstract To evaluate the antioxidant activity of hexane, ethyl acetate, and butanol fractions obtained from *Agastache rugosa* extract, we measured the total polyphenol levels, DPPH radical scavenging activity, and reducing power. The ethyl acetate fraction of *A. rugosa* (AREA) displayed high phenolic levels, potent DPPH radical scavenging effect, and powerful reducing power. In addition, we examined the ability of AREA to inhibit nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated BV-2 microglia. AREA suppressed NO production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and downregulated interleukin-6 (IL-6) mRNA level in LPS-stimulated BV-2 microglia. Furthermore, we detected rosmarinic acid in AREA by HPLC, which suggested that rosmarinic acid could be one of the bioactive materials responsible for the antioxidant and anti-inflammatory activities of AREA. These results suggested that AREA may be a good source of functional foods with antioxidant and anti-inflammatory activities.

Keywords: *Agastache rugosa*, antioxidant activity, nitric oxide, anti-inflammatory, rosmarinic acid

서 론

배초향(*Agastache rugosa* O. Kuntze)은 꿀풀과(Labiata)에 속하는 다년생 초본으로, 방아 혹은 한국민트 (Korean mint)라고도 불리며 생선찌개 및 추어탕 등 각종 음식의 향료로서 오래 전부터 사용하여 왔다. 한방에서는 지상부를 ‘곽향’이라는 명칭으로 건위, 구풍, 소화, 두통, 구토 및 설사에 사용하고 위장병 치료에 중요한 약재로 사용해 왔다(1). 배초향의 정유성분으로 에스트라골(estrangle), 아네톨(trans-anethole), 메틸 유게놀(methyl eugenol), 리모넨(limonene), 피넨(β -pinene) 및 티몰(thymol) 등이 보고되었으며(2,3), 이들 정유성분이 살선충작용(4) 및 항균작용(5-7)을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 배초향의 강력한 항산화 성분으로 로스마린산(rosmarinic acid)이 보고되었으며(8), 플라보노이드(flavonoid) 화합물인 아카세틴(acacetin)은 항치매(9) 및 간세포보호 효과가(10) 있는 것으로 보고되었다. 아카세틴의 배당체인 티리아닌(tilianin)은 염증반응을 억제하여 항동맥경화 효과를 나타내는 것으로 보고되었으며(11), Cho 등은(12) 배초향으로부터 유래한 세스퀴테펜(sesquiterpene)화합물 베타케리오필렌(β -caryophyllene)이 toll-like receptor 4를 억제하여 간세포를 보호한다고 발표

하였다. 또한 배초향 추출물은 항종양(5), 항균효과(6)를 비롯하여 transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) 활성화(13), 산화적 스트레스에 의한 세포손상억제(14), 및 항바이러스 효과(15)를 가지는 것으로 알려져 왔다. 하지만, 배초향의 각 분획별 산화방지 활성정도 및 microglia에서의 염증인자에 미치는 영향은 아직 규명된 바가 없다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 구조적으로 매우 불안정하여 주위 세포들과 반응하여 단백질의 변성 또는 불활성화 등 산화적 손상을 유발하며, 이들 활성산소종 등은 인체의 질병과도 많은 연관성이 있다고 알려져 있다(16). Microglia는 뇌에 존재하는 큰 포식세포로서 일차면역체계를 담당하고 있지만(17), 다양한 면역 자극에 의해 활성화되면 기능적 특성이 변화하여 산화질소(NO) (nitric oxide, NO)와 같은 활성질소종, 활성산소종 및 염증성 사이토카인 등을 분비할 뿐 아니라, 만성염증상태와 같은 지속적인 면역 자극상태에서는 뉴런의 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다(18,19). 따라서 본 연구에서는 배초향의 극성에 따른 분획별 산화방지 활성을 평가하고, 그 중 강력한 산화방지 효과를 나타내는 분획에 대해 지방질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 BV-2 microglia에서의 산화질소(NO) 및 염증인자 생성에 대한 영향을 평가하여 배초향의 산화방지 및 항염증 기능성 식품소재를 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료의 추출 및 분획

실험재료인 배초향의 잎과 줄기를 2014년 7월 충북 제천의 제

*Corresponding author: Hwa Jin Lee, Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon, Chungbuk 27136, Korea

Tel: +82-43-649-1682

Fax: +82-43-649-1729

E-mail: hwalee@semyung.ac.kr

Received November 18, 2016; revised January 9, 2017;

accepted January 10, 2017

천한방약초물에서 구입하였고, 산지는 경북 영주산으로 확인하였다. 배초향의 잎과 줄기 900 g을 8 L의 70% 에탄올로 3시간 동안 환류 추출, 여과한 후 감압농축 및 냉동건조를 통해 배초향 에탄올 추출물(ARE, 117 g)을 얻었다. 이후 에탄올 추출물 50 g에 500 mL 증류수를 가한 후, 동량의 헥세인(*n*-hexane), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 그리고 뷰탄올(*n*-butanol) 순으로 극성에 따른 용매분획을 실시하여 헥세인 분획(ARH, 4.6 g), 에틸아세테이트 분획(AREA, 5.5 g) 및 뷰탄올 분획(ARBu, 2.9 g)을 얻어 이후 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

폴린-시오칼토의 페놀시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent), 갈산(gallic acid), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 페리시아안화포타슘(potassium ferricyanide), 염화철(III) (ferric chloride), 탄산소듐(sodium carbonate), 다이메틸설포사이드(dimethylsulfoxide, DMSO), 드라겐도프(dragendorff) 시약 및 로스마린산(rosmarinic acid)은 Sigma-Aldrich Co., LLC (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 추출용 에탄올(ethanol, reagent grade) 및 에틸 아세테이트(ethyl acetate, reagent grade), 펠링 용액(Fehling solution), 마그네슘(Mg) 가루, 황산 및 염산 용액은 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd. (Ansan, Korea) 에서 구입하였다.

고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)는 Agilent 사(Santa Clara, CA, USA)의 infinity 1220 with UV detector를 사용하였다. HPLC 분석에 사용된 용매인 메탄올(methanol), 물(water), 아세토나이트릴(acetonitrile), 아세트산(acetic acid) (HPLC grade)은 TEDIA high purity solvents (Fairfield, OH, USA)의 것을 사용하였다.

세포주 배양과 시료의 처리

BV-2 microglia (ATCC, Rockville, MD, USA)를 10% FBS (fetal bovine serum), 100 µg/mL의 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin, Life Technologies, Frederick, MD, USA)이 포함된 DMEM 배지로 37°C, 5% 이산화탄소 배양기(CO₂ incubator)에서 배양하였다. 시료는 DMSO에 용해시켜 보관하고, 세포에 시료를 가할 때 DMSO의 농도가 0.1% 이하가 되도록 처리하였다.

파이토케미컬 검색

배초향 추출물 및 각 분획에 대하여 환원당, 알칼로이드, 사포닌, 트라이테르페노이드(triterpenoid), 탄닌류, 플라보노이드와 같은 파이토케미컬에 대한 정성반응을 실시하였다. 환원당 존재유무를 확인하기 위해 펠링 용액을 가하여 적색침전의 발생여부를 확인하는 펠링 시험(Fehling's test), 알칼로이드 확인을 위해 드라겐도프 시약을 가하여 침전물의 발생여부를 확인하는 드라겐도프 반응, 시료액의 지속성 거품을 관찰하는 사포닌 정성시험인 포스 시험(forth test), 트라이테르페노이드 확인을 위해 클로로폼추출액에 진한 황산을 가한 후 경계면의 정색반응을 확인하는 살코브스키 시험(salkowski's test), 마그네슘 가루와 염산용액을 가한 후의 정색반응을 관찰하는 플라보노이드 확인시험을 통해 추출물 및 각 분획에 존재하는 파이토케미컬을 확인하였다(20,21).

총 폴리페놀 함량 측정

배초향 추출물 및 각 분획의 총 폴리페놀성 화합물의 함량은 포스포몰리브드(phosphomolybdic acid)와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 폴린-데니스(Folin-Denis)법을 변형하여 측정

하였다(22). 100 µL의 추출물 및 각 분획을 50 µL의 폴린-시오칼토의 페놀시약과 혼합하고 25°C에서 5분간 방치한 후, 300 µL의 20% 탄산소듐 용액을 가하고 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 표준보정선은 갈산(gallic acid, GA)을 이용하여 시료와 동일한 방법으로 반응시켜 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 및 각 분획의 총 폴리페놀 함량은 갈산의 당량기(mgGAE/g)로 표시하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼이 항산화제와 반응하여 안정한 형태의 화합물로 전환되면서 정량적으로 탈색되어 진한 보라색에서 옅은 노란색으로 변하는 원리를 이용한 방법이다(23,24). 여러 농도의 배초향 추출물 및 각 분획 100 µL에 에탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 라디칼 용액 100 µL을 가하여 상온에서 30분 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 희석 시 사용한 용매를 시료와 같은 방법으로 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 아래의 식에 대입하여 산출하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성(\%)} = \frac{(\text{O.D.}_{\text{control}} - \text{O.D.}_{\text{sample}})}{\text{O.D.}_{\text{control}}} \times 100$$

또한, 50% DPPH 라디칼 소거활성 정도를 나타내는 시료의 농도(SC₅₀)를 구하여 시료의 라디칼 소거활성 정도를 평가하였다.

환원력 측정

다양한 농도의 배초향 추출물 및 각 분획 200 µL에 0.2 M 인산완충용액 200 µL과 1% 페리시아안화포타슘 200 µL를 가하여 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10% TCA 용액 200 µL을 가하여, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 30 µL에 0.1% 염화철(III) 150 µL을 가하여 혼합한 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소(NO) (Nitric oxide, NO) 생성량의 측정

산화질소(NO)는 2-3초의 짧은 life time을 가진 불안정한 물질로 대부분 NO₂⁻ 형태로 전환되므로 생성된 산화질소(NO)의 양은 NO₂⁻의 형태로 정량하였다. BV-2 microglia를 1.5×10⁵ cells/mL 로 하여 48 well plate에 300 µL씩 분주하여 12시간 동안 부착시키고 새로운 배지로 교환한 다음 지방질다당류(LPS)를 0.1 µg/mL이 되도록 가하였다. 시료는 최종농도 0.1% DMSO 용액이 되도록 지방질다당류와 동시에 배양액에 가한 다음 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포배양 상층액 100 µL와 Griess 시약(10% H₃PO₄, 2% sulfanilamide, 0.2% naphthylethylenediamine) 100 µL를 혼합하여 10분 동안 반응시키고 발색정도를 마이크로플레이트 판독기(microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 검량선 작성을 위해 NaNO₂를 표준품으로 사용하였다. 또한, 각 well의 배양액을 제거 후, MTT (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma, St. Louis, MO, USA)용액을 2시간 처리하여 생성된 MTT formazan을 DMSO 용액에 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 세포에 대한 독성 정도를 평가하였다.

Western Blot 분석

BV-2 microglia (5×10⁵ cells/60 mm dish)를 (-)LPS, (+)LPS, 시료 처리군으로 나누어 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 제거하고 PBS로 세척 후 세포용해완충용액(cell lysis buffer) (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA)를 가하여 세포를 lysis 시킨 뒤, ice에서 20분 동안 정치시켰다. 처리된 세포 용해

물을 4°C에서 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 획득한 상층액에 대해서는 Bradford 법으로 단백질 농도를 측정하였다. 각 30 µg 단백질량에 해당하는 시료를 10% SDS-PAGE 에서 전기영동시킨 후, 플루오르화폴리마닐리덴(polyvinylidene fluoride, PVDF) membrane에 옮겼다. 상온에서 1시간 동안 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 membrane을 처리한 후, iNOS 항체(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 24시간 동안 4°C에서 처리하였다. 이후 15분 간격으로 TBST로 4회 세척하고 horseradish peroxidase linked type의 2차 항체를 결합시킨 후, ECL 검출시약 (detection reagents) (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)를 이용한 형광 항체법으로 iNOS 단백질의 발현 정도를 관찰하였다.

RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)법

BV-2 microglia를 (-)LPS, (+)LPS, 시료 처리군으로 나누어 처리하였다. 12시간 배양 후, 배양액을 제거하고 PBS로 세척 후 신속히 TRIzol® (Life Technologies, Frederick, MD, USA)을 가하여 세포를 lysis 시킨 뒤, 제품설명서에 따라 RNA를 분리하였다. 얻어진 RNA에 reverse transcriptase (Life Technologies, Frederick, MD, USA)와 hexamer (Cosmo Genetech Co., Seoul, Korea)를 가한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA로 전환하였다. 얻어진 cDNA의 일정량과 primer (iNOS; sense 5'-CCCTTCCGAAGTTTC TGGCAGCAGC-3', antisense 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGG CTTGG-3', IL-6; sense 5'-GTCCTTCCTACCCCAATTCCA-3', antisense 5'-TCCAAGAAACCATCTGGCTAGG-3', TNF-α; sense 5'-ACAGAAAGCATGATCCGGA-3', antisense 5'-ATAGCAAATC GGCTGACGGT-3', β-actin; sense 5'-ACTATTGGCAACGAGCG GTT-3', antisense 5'-GGGTGTAACCGCAGCTCAGTA-3'), polymerase (Promega, Madison, WI, USA)를 가하여 mRNA 발현 정도를 관찰하였다.

HPLC를 이용한 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA) 내 로스마린산의 확인

배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA) 및 로스마린산을 HPLC grade의 메탄올에 녹인 후, 모세관거르개(syringe filter, Milipore, 0.45 µm)를 이용하여 여과하고, 이 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다. HPLC 분석을 위해 컬럼은 Zorbax-SB C18 (5 µm, 4.6×250 mm, Agilent)를 이용하였고, 이동상은 0.1% 아세트산을 함유한 물과 0.1% 아세트산을 함유한 아세토니트릴을 기울기 용리법(80:20→20:80, 0.7 mL/min)으로 분리하였고, 280 nm에서 검출하였다. 성분확인에는 HPLC 머무름 시간(retention time) 및 동시주입법으로 확인하였다.

통계적 처리

실험결과에서 얻은 모든 값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균±표준편차로 표시하였다. 각 평균치에 대한 검증은 SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, Student's t-test 또는 일원배치분산분석(One-way ANOVA)와 던컨의 다중검정 (Duncan's multiple range test)를 이용하여 p<0.05인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

결과 및 고찰

배초향 추출물 및 각 분획별 파이토케미칼에 대한 정성평가

배초향 추출물 및 각 분획별 파이토케미칼 조성과 분포를 알

Table 1. Phytochemical screening of *Agastache rugosa*

Groups	ARE ¹⁾	ARH ²⁾	AREA ³⁾	ARBu ⁴⁾
Reducing sugars	+ ⁵⁾	+	+	+
Alkaloids	- ⁶⁾	-	-	-
Saponins	+	++	+	+++
Triterpenes	-	++	+	-
Flavonoids	+	-	+	+

¹⁾ARE: 70% ethanol extract of *Agastache rugosa*
²⁾ARH: hexane fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*
³⁾AREA: ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*
⁴⁾ARBu: butanol fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*
⁵⁾+: presence of specific phytochemicals; + (low), ++ (middle), and +++ (high) mean the relative intensity
⁶⁾-: absence of specific phytochemicals

Table 2. Content of total polyphenols in *Agastache rugosa*

Samples	Total polyphenols (mgGAE ¹⁾ /g)
ARE ²⁾	65.9±1.7
ARH ³⁾	31.4±0.6
AREA ⁴⁾	185.5±10.9
ARBu ⁵⁾	73.2±5.5

¹⁾Gallic acid equivalent
²⁾ARE: 70% ethanol extract of *Agastache rugosa*
³⁾ARHx: hexane fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*
⁴⁾AREA: ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*
⁵⁾ARBu: butanol fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*

아보기 위해 환원당(reducing sugars)확인을 위한 펠링 시험, 사포닌 확인을 위한 포스 시험, 트라이테펜 정성시험인 살코브스키 시험, 플라보노이드 확인시험인 마그네슘-염산 반응 및 알칼로이드 확인시험인 드라켄도프 반응을 실시하였다. 추출물(ARE) 및 헥세인(ARH), 에틸아세테이트(AREA), 뷰탄올(ARBu) 분획에서 환원당의 존재는 모두 양성으로 나타난 반면, 알칼로이드는 모두 음성으로 확인되었다. 뷰탄올 분획(ARBu)에서 사포닌에 대한 가장 강한 양성 반응성을 보였으나, 트라이테펜 확인시험에서는 헥세인 분획(ARH)이 강한 양성을 나타내었다. 플라보노이드 확인 시험에서는 헥세인(ARH) 을 제외한 에틸아세테이트(AREA) 및 뷰탄올(ARBu) 분획에서 양성반응을 확인하였고(Table 1), 이러한 결과는 배초향으로부터 보고된 성분들의 조성과의 일치하는 것으로 보여진다(2).

총 폴리페놀 함량

식물로부터 유래한 폴리페놀은 산화방지 활성을 비롯한 다양한 생물학적 활성에 관여하는 것으로 알려져 있으며 산화성 스트레스 및 노화성 만성질환의 예방에도 기여가 높은 것으로 보고되고 있다(25,26). 또한 폴리페놀 함량 측정법은 다양한 페놀성 물질들이 전자를 제공함으로써 기질을 환원시키는 산화방지 능력을 기반으로 하는 것으로 폴리페놀 함량이 높다는 것은 산화방지 능력이 강하다는 것을 의미한다(27,28). 따라서 배초향 추출물 및 각 분획에 함유된 총 폴리페놀의 함량을 측정함으로써 산화방지 활성이 강한 분획을 찾고자 하였다(Table 2). 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA)에서 갈산으로 환산한 폴리페놀 함량이 186 mg/g인 반면, 헥세인(ARH) 및 뷰탄올(ARBu) 분획은 각각 31 mg/g 및 73 mg/g으로 확인되어 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA)이 강한 산화방지 활성을 가지는 것으로 추정하였다. 또한 라디칼 소거 및 환원력 시험을 통해 배초향의 추출물 및 각

Table 3. DPPH radical scavenging activity and reducing power of *Agastache rugosa*

Samples	DPPH radical scavenging activity (SC ₅₀ ¹⁾ , µg/mL)	Reducing power (RC _{0.5} ²⁾ , µg/mL)
ARE ³⁾	351.0±23.9 ^b	240.3±22.1 ^c
ARH ⁴⁾	> 500 ^d	> 500 ^d
AREA ⁵⁾	77.4±1.9 ^a	40.9±2.2 ^a
ARBu ⁶⁾	409.9±21.4 ^c	165.3±4.3 ^b

¹⁾SC₅₀: 50% scavenging concentration. Values along a column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

²⁾RC_{0.5}: Reducing concentration represented the absorbance 0.5. Values along a column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

³⁾ARE: 70% ethanol extract of *Agastache rugosa*

⁴⁾ARHx: hexane fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*

⁵⁾AREA: ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*

⁶⁾ARBu: butanol fraction from 70% ethanol extract of *A. rugosa*

분획의 산화방지 효과를 확인하기로 하였다.

DPPH 라디칼 소거 및 환원력에 의한 배초향 추출물 및 각 분획의 산화방지 효과

자유라디칼은 환경오염, 음주, 흡연, 화학약품 등에 의해 생성되며, 생체 내의 자유라디칼 반응에 의해 생성되는 활성산소종 및 산화질소(II)는 단백질의 불활성화, 조직의 손상 및 유전자 변이 등 인체 내에서 산화적 스트레스를 유발하여 노화, 퇴행성 신경질환, 대사증후군과 같은 질환의 주요 원인으로 보고되고 있다(29-31). 따라서 DPPH 라디칼 소거법을 이용하여 배초향 추출물 및 각 분획의 산화방지 활성을 평가하고, 활성 정도를 50% 라디칼 소거활성을 나타내는 농도(SC₅₀)로 나타내었다(Table 3). 에틸아세테이트 분획(AREA, SC₅₀: 77.4 µg/mL)의 경우, 헥세인 분획(ARH, SC₅₀: >500 µg/mL) 혹은 뷰탄올 분획(ARBu, SC₅₀: 409.9 µg/mL)보다 저농도에서 DPPH 라디칼 소거활성이 나타남을 확인하였고, 헥세인 분획(ARH)의 라디칼 소거활성은 시료처리 최고 농도인 500 µg/mL을 처리하였을 때에도 50% 소거 활성이 나타나지 않았다.

산화방지 활성을 검증하는 또 다른 방법으로, 금속이온을 환원시키는 효과가 강할수록 녹색에 가까게 발색되어 높은 흡광도를 나타내는 방법을 실시하였다. 환원력에 의한 산화방지 활성을 흡광도 0.5의 환원력을 나타내는 시료의 농도(RC_{0.5})로 표시하였으며, 이는 농도가 낮을수록 환원력이 강함을 나타낸다. 그 결과, 라디칼 소거활성과 유사하게 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA, RC_{0.5}: 40.9 µg/mL)이 가장 강력한 환원력을 나타냄을 확인하였다(Table 3). 따라서, 페놀성분이 다량 분포하는 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA)이 탁월한 라디칼 소거 및 환원력을 나타냄으로써 산화방지 효과가 가장 높은 것을 알 수 있다. Jhee과 Yang(32)은 방아의 ether 추출물 중 페놀성 분획이 DPPH 수소공여능, 리놀레산(linoleic acid)의 과산화물 생성억제활성이 강력하다고 보고하였으며, 이를 통해 폴리페놀 함량과 산화방지 활성 사이의 상관관계가 있음을 추측할 수 있다.

배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)의 산화질소(II) 생성 및 iNOS 발현 억제활성

강력한 산화방지 활성을 나타내는 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)에 대해 세포에서 발생하는 라디칼 생성에는 어떤 영

향을 미치는 지 알아보기로 하였다. 지방질다당류(LPS)로 처리한 BV-2 microglia에서 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)의 산화질소(II) 생성 정도를 평가한 결과, 지방질다당류 단독처리군에 비해 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)은 농도 의존적으로 산화질소(II) 생성 억제활성을 나타내었다(Fig. 1A). 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA) 10 및 25 µg/mL에서 각각 14% 및 85%의 산화질소(II) 생성억제활성을 나타내었고, 이때 BV-2 microglia에 대한 세포독성은 나타나지 않았다. 특히, 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA) 25 µg/mL에서 DPPH 라디칼 소거활성 및 환원력 정도가 모두 50% 미만이었으나, 산화질소(II) 생성에 대해서는 85%로 강력한 억제활성을 나타냈다. 이는 시료에 의해 세포로부터 발생하는 라디칼이 소거되는 것 이외에도, 세포내 다른 기능성 인자도 시료에 의해 영향을 받을 수 있음을 추정할 수 있다.

산화질소(II)는 불안정한 라디칼 물질로서 혈압조절, 신경전달, 혈액응고 및 면역기능 등의 역할 외 염증조건에서 광범위 염증 매개인자로도 알려져 있다(33). 산화질소(II)를 생성하는 nitric oxide synthase (NOS)는 세포질내 항상 미량으로 존재하는 constitutive form (cNOS)와 면역학적 변화에 의해 유도되는 inducible form (iNOS)으로 나눌 수 있으며, cNOS는 소량의 산화질소(II)를 생성하여 신경전달 작용이나 혈관 근육세포의 이완을 통해 혈압강화 작용을 하는 등 정상적인 생리기능을 담당하는 한편, iNOS는 혈관내피세포, 대식세포를 포함한 다양한 조직에서 지방질다당류 등에 의해 유도되어 장시간 동안 다량의 산화질소(II)를 생성하여 병리학적 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등 유해작용을 나타내는 것으로 보고되었다(34). 플라보노이드(35), 리그난(36), 터펜(37) 및 알칼로이드(38) 등을 포함한 천연물 유래 항염증 분획 및 화합물들의 대부분은 iNOS 발현을 저해하여 과도한 산화질소(II) 생성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 지방질다당류로 활성화된 BV-2 microglia에서 산화질소(II) 생성억제효과를 나타낸 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA)에 대해 산화질소(II) 생성효소인 iNOS의 발현에 미치는 영향을 평가하고자 iNOS 단백질 및 mRNA level을 측정하였다. Fig. 1B에서 나타난 것처럼 배초향 에틸아세테이트 분획 (AREA) 처리군의 경우, 지방질다당류 단독처리군에 비해 농도 의존적으로 iNOS 단백질 수준이 감소하는 것을 확인할 수 있으며, β-actin의 단백질 수준은 변화 없음을 확인하였다. 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)이 iNOS 단백질 발현에 대해 억제활성을 나타내었기에, 단백질 생성 전단계인 mRNA 단계에 대해서도 영향을 미치는 지를 확인하고자 하였다. 지방질다당류 단독처리군에 비해 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA) 25 µg/mL에서 현저히 감소된 iNOS mRNA level을 확인하였으나, β-actin mRNA level의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 1C). 이러한 결과로부터, 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA)은 iNOS의 발현을 억제하여 염증조건에서의 과도한 산화질소(II) 생성을 저해한다는 것을 추정할 수 있다. 또한, 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA)이 염증상태에서 iNOS 발현 억제활성을 나타냈기에, 다른 염증 매개인자들의 발현에도 영향을 미치는지 확인하고자 TNF-α 및 IL-6의 mRNA level을 평가하였다. 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA) 25 µg/mL에서 TNF-α 발현에 대한 저해활성은 뚜렷하게 보이지 않았으나, IL-6 mRNA level은 지방질다당류 단독 처리군에 비해 감소됨을 확인하였다. 따라서, 배초향의 에틸아세테이트 분획(AREA)이 iNOS 발현을 억제하여 산화질소(II) 생성을 억제하고, IL-6와 같은 염증매개인자의 발현을 억제함으로써 염증반응에 대한 억제활성을 나타내어 항염증 기능성 소재로서의 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

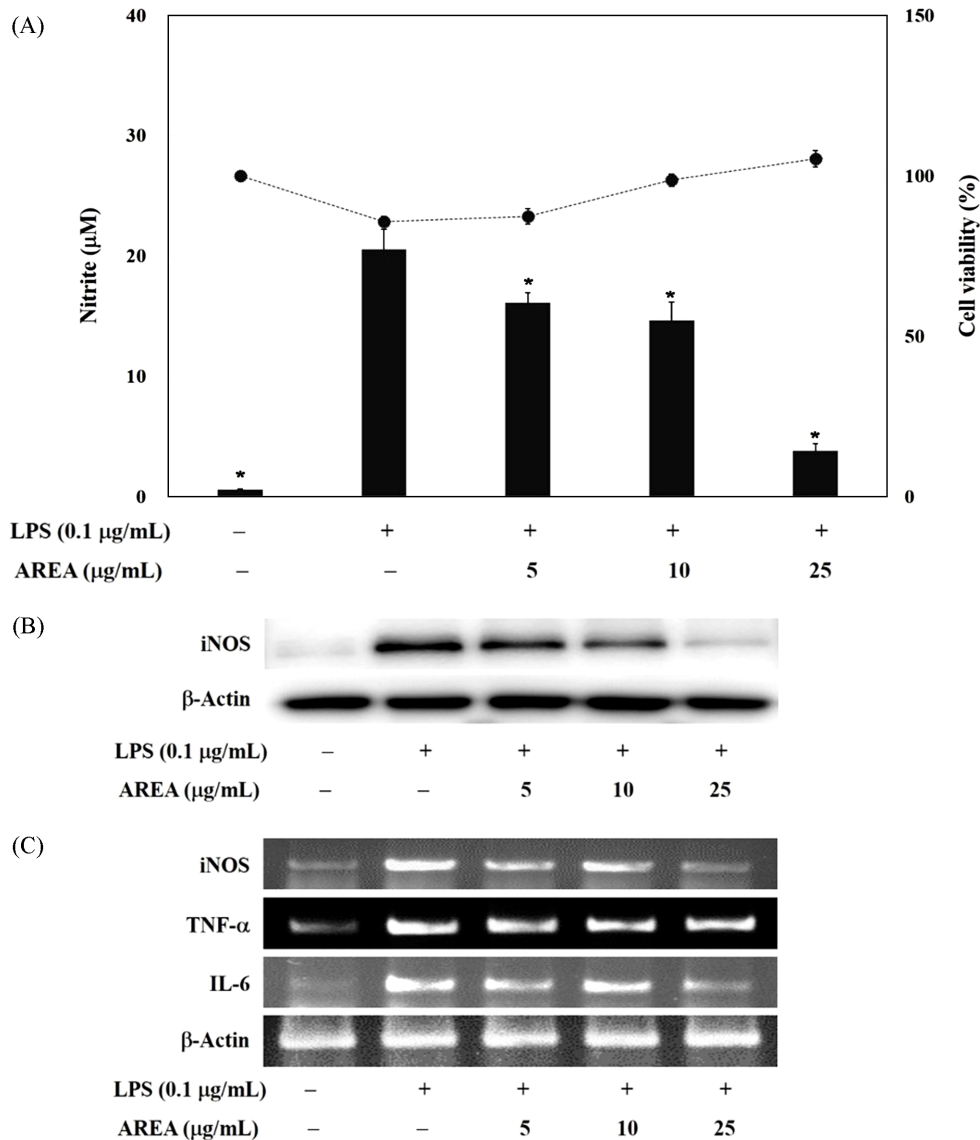


Fig. 1. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Agastache rugosa* extract (AREA) on LPS-stimulated BV-2 microglia. (A) Inhibitory effect of AREA on NO production in LPS-activated BV-2 microglia. BV-2 cells were treated with LPS (0.1 µg/mL) and/or AREA for 24 h, and the amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent (bar). Cell viability was determined by MTT assay (●). The values are expressed as the means ±SD of three individual experiments. **p*<0.05 vs LPS control. (B) Inhibitory effect of AREA on iNOS protein levels in LPS-stimulated BV-2 microglia. BV-2 cells were incubated in the presence of LPS (0.1 µg/mL) with or without AREA for 24 h. Cell lysates were prepared and the iNOS and β-actin protein levels were determined by Western blotting. Images are representative for three independent experiments that shows similar results. (C) Inhibitory effect of AREA on mRNA levels of iNOS and inflammatory mediators in LPS-stimulated BV-2 microglia. BV-2 cells were incubated in the presence of LPS (0.1 µg/mL) with or without AREA for 12 h. The mRNA levels for iNOS, TNF-α, IL-6 and β-actin were determined by RT-PCR. β-Actin was used as an internal control. Images are representative for three independent experiments that shows similar results.

HPLC를 이용한 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA) 내 로스마린산의 분석

로스마린산(rosmarinic acid)은 배초향을 포함하여 들깨(*Perilla frutescens*), 로즈메리(*Rosmarinus officinalis*) 및 세이지(*Salvia officinalis*) 같은 꿀풀과(*Labiatae*) 식물에 다량 함유된 것으로 알려져 있는 페놀성 물질로, 산화방지 효과뿐 아니라(39) 항염증(40), 뇌세포보호(41), 간손상 억제(42), 항알러지(43), 암전이 억제효과(44)가 보고된 바 있다. 강력한 산화방지 및 항염증 활성을 나타내는 주요활성성분을 확인하기 위해 HPLC를 이용하여 에틸아세테이트 분획(AREA)과 로스마린산의 관계를 확인하였다. 배초향 에틸

아세테이트 분획(AREA) 크로마토그램에서 19.1분에 표준품 로스마린산의 머무름 시간과 동일한 피크를 확인하였고(Fig. 2A), 명확한 규명을 위해 표준품 로스마린산과 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)의 동시주입을 실시하여 19분에 확인되는 피크의 높이가 상승된 반면, 에틸아세테이트 분획(AREA)의 40-60분대에 확인된 피크의 높이는 변화가 없음을 관찰하였다(Fig. 2B). 이는 동시주입법에 의해 로스마린산에 해당하는 피크를 증가시킴으로써 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)에 로스마린산이 함유되어 있음을 보여주는 결과이다.

따라서, 배초향 에틸아세테이트 분획(AREA)의 강력한 산화방

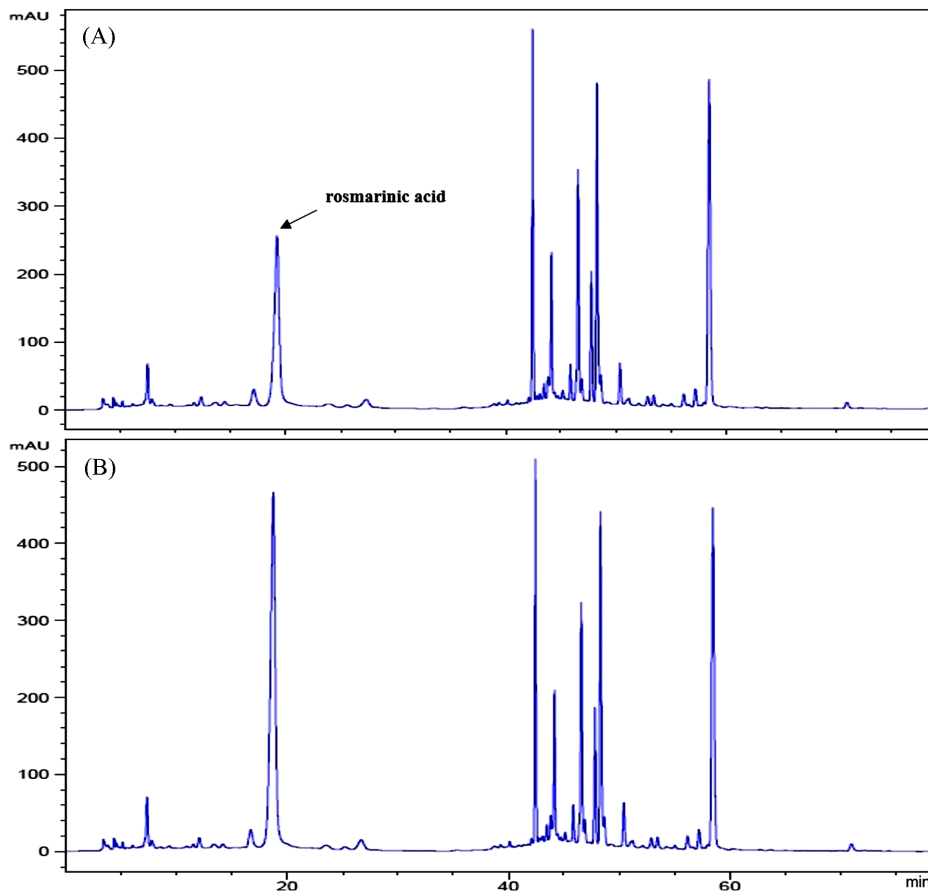


Fig. 2. Chromatograms of ethyl acetate fraction from *Agastache rugosa* extract (AREA) and rosmarinic acid at 280 nm. (A) Chromatogram of AREA (B) Chromatogram of spiking rosmarinic acid to AREA

지 및 항염증 효과를 나타내는 주요 활성성분 중의 하나로 로스마린산을 제시할 수 있으며, 이는 배초향의 에틸아세테이트 분획 (AREA)의 산화방지 및 항염증 효능을 기반으로 하는 기능성 식품으로 개발하고자 할 때 표준화 자료로 응용될 수 있을 것이다.

요 약

배초향 추출물 및 분획별 생리활성 물질의 분포양상을 검정하기 위해 파이토케미컬 검색을 한 결과, 플라보노이드 확인시험에서 헥세인을 제외한 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서 양성반응을 확인하였다. 배초향 추출물의 극성에 따른 분획-헥세인, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획의 산화방지 정도를 평가한 결과, 폴리페놀 함량, DPPH 라디칼 소거 및 환원력 실험에서 에틸아세테이트 분획이 다량의 폴리페놀을 함유하며 강력한 라디칼 소거 및 환원능력을 나타냈다. 또한 배초향 에틸아세테이트 분획의 항염 활성을 평가한 결과, 지방질다당류로 활성화된 BV-2 microglia에서 발생하는 과량의 산화질소(II) 생성을 억제하였을 뿐 아니라, 산화질소(II) 생성 효소인 iNOS 및 염증성 사이토카인 IL-6의 발현을 억제함을 확인하였다. 강력한 산화방지 및 항염증 활성을 나타내는 배초향 에틸아세테이트 분획내의 활성물질을 확인하고자 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 배초향의 산화방지 물질로 잘 알려져 있는 로스마린산이 배초향 에틸아세테이트 분획에 함유되어 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

1. Lee BY, Hwang JB. Physiochemical characteristics of *Agastache rugosa* O. Kuntze extract by extraction conditions. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 1-8 (2000)
2. Zielinska S, Matkowski A. Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). Phytochem. Rev. 13: 391-416 (2014)
3. Ahn B, Yang CB. Volatile flavor components of Bangah (*Agastache rugosa* O. Kuntze) herb. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 582-586 (1991)
4. Li HQ, Liu OZ, Liu ZL, Du SS, Deng ZW. Chemical composition and nematocidal activity of essential oil of against *Agastache rugosa* Meloidogyne incognita. Molecules 18: 4170-4180 (2013)
5. Haiyan G, Lijuan H, Shaoyu L, Chen Z, Ashraf MA. Antimicrobial, antibiofilm and antitumor activities of essential oil of *Agastache rugosa* from Xinjiang, China. Saudi. J. Biol. Sci. 23: 524-530 (2016)
6. Shin S. Essential oil compounds from *Agastache rugosa* as antifungal agents against Trichophyton species. Arch. Pharm. Res. 27: 295-299 (2004)
7. Shin S, Kang CA. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole.

- Lett. Appl. Microbiol. 36: 111-115 (2003)
8. Kim JB, Kim JB, Cho KJ, Hwang YS, Park RD. Isolation, identification, and activity of rosmarinic acid, a potent antioxidant extracted from Korean *Agastache rugosa*. J Korean Soc. Agri. Chem. Biotechnol. 42: 262-266 (1999)
 9. Wang X, Perumalsamy H, Kwon HW, Na YE, Ahn YJ. Effects and possible mechanisms of action of acacetin on the behavior and eye morphology of *Drosophila* models of Alzheimer's disease. Sci. Rep. 5: 16127 (2015)
 10. Cho HI, Park JH, Choi HS, Kwak JH, Lee DU, Lee SK, Lee SM. Protective mechanisms of acacetin against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in mice. J. Nat. Prod. 77: 2497-2503 (2014)
 11. Vincent L, Chen W, Hong L, Mirshahi F, Mishal Z, Mirshahi-Khorassani T, Vannier JP, Soria J, Soria C. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: Contribution to its anti-angiogenic effect. FEBS Lett. 495: 159-166 (2001)
 12. Cho HI, Hong JM, Choi JW, Choi HS, Kwak JH, Lee DU, Lee SK, Lee SM. Beta-Caryophyllene alleviates D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the TLR4 and RAGE signaling pathways. Eur. J. Pharmacol. 764: 613-621 (2015)
 13. Moon H, Kim MJ, Son HJ, Kweon HJ, Kim JT, Kim Y, Shim J, Suh BC, Rhyu MR. Five hTRPA1 agonist found in indigenous Korean mint, *Agastache rugosa*. PLoS One. 10: e0127060 (2015)
 14. Oh HM, Kang YJ, Lee YS, Park MK, Kim SH, Kim HJ, Seo HG, Lee HG, Lee JH, Chang KC. Protein kinase G-dependent heme oxygenase-1 induction by *Agastache rugosa* leaf extract protects RAW 264.7 cells from hydrogen peroxide-induced injury. J. Ethnopharmacol. 103: 229-235 (2006)
 15. Kim HK, Lee HK, Shin CG, Huh H. HIV integrase inhibitory activity of *Agastache rugosa*. Arch. Pharm. Res. 22: 520-523 (1999)
 16. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. Life Sci. 148: 183-193 (2016)
 17. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. Nat. Rev. Immunol. 9: 429-439 (2009)
 18. Li L, Lu J, Tay SS, Moochhala SM, He BP. The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. Brain Res. 1159: 8-17 (2007)
 19. Lue LF, Kuo YM, Beach T, Walker DG. Microglia activation and anti-inflammatory regulation in Alzheimer's disease. Mol. Neurobiol. 41: 115-128 (2010)
 20. Uddin R, Saha MR, Subhan N, Hossain H, Jahan IA, Akter R, Alam A. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in *Gardenia jasminoides* and determination of antioxidant activity by using free radical scavenging assays. Adv. Pharm. Bull. 4: 273-281 (2014)
 21. Aziz MA. Qualitative phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Microcos paniculata* barks and fruits. J. Integr. Med. 13: 173-184 (2015)
 22. Padda MS, Picha DH. Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. J. Food Sci. 72: C412-C416 (2007)
 23. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200 (1958)
 24. Jasprica I, Bojic M, Mornar A, Besic E, Bucan K, Medic-Saric M. Evaluation of antioxidative activity of Croatian propolis samples using DPPH* and ABTS*+ stable free radical assays. Molecules 12: 1006-1021 (2007)
 25. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegou L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 50: 586-621 (2011)
 26. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am. J. Clin. Nutr. 81: 230S-242S (2005)
 27. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16: 144-158 (1965)
 28. Bray HG, Thorpe WV. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. Meth. Biochem. Anal. 1: 27-52 (1954)
 29. Devasagayam TP, Tilak JC, Bolor KK, Sane KS, Ghsakadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J. Assoc. Physicians India 52: 794-804 (2004)
 30. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. J. Biomed. Biotechnol. 2012: 936486 (2012)
 31. Khurana S, Piche M, Hollingsworth A, Venkataraman K, Tai TC. Oxidative stress and cardiovascular health: therapeutic potential of polyphenols. Can. J. Physiol. Pharmacol. 91: 198-212 (2013)
 32. Jhee OH, Yang CB. Antioxidant activity of extract from Bangah herb. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 1157-1163 (1996)
 33. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43: 109-142 (1991)
 34. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. Cancer Metastasis Rev. 17: 7-23 (1998)
 35. Hu C, Kitts DD. Luteolin and luteolin-7-o-glucoside form dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. Mol. Cell Biochem. 265: 107-113 (2004)
 36. Lee HJ, Li H, Chang HR, Jung H, Lee DY, Ryu JH. (-)-Nyasol, isolated from *Anemarrhena asphodeloides* suppresses neuroinflammatory response through the inhibition of I-kBa degradation in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 28: 954-959 (2013)
 37. Lee HJ, Lim HJ, Lee DY, Jung H, Kim MR, Moon DC, Kim KI, Lee MS, Ryu JH. Carabrol suppresses LPS-induced nitric oxide synthase expression by inactivation of p38 and JNK via inhibition of I-kappa B alpha degradation in RAW 264.7 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391: 1400-1404 (2010)
 38. Zhao F, Chen L, Zhang M, Bi C, Li L, Zhang Q, Shi C, Li M, Zhou S, Kong L. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression by indole alkaloid, 3-(hydroxymehtyl)-6,7-dihydroindolo[2,3-a]quinolizin-(12H)-one, via NF-kB inactivation in RAW 264.7 macrophages. Planta Med. 79: 782-787 (2013)
 39. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chem. 110: 76-82 (2008)
 40. Huang N, Hauck C, Yum MY, Rizshsky L, Widrlechner MP, McCoy JA, Murphy PA, Dixon PM, Nikolau BJ, Birt DF. Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 and nitric oxide in RAW 264.7 mouse macrophages. J. Agric. Food Chem. 57: 10579-10589 (2009)
 41. Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoruso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. Br. J. Pharmacol. 157: 1072-1084 (2009)
 42. Domitrovic R, Skoda M, Vasiljev Marchesi V, Cvijanovic O, Pernjak Pugel E, Stefan MB. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food Chem. Toxicol. 51: 370-378 (2013)
 43. Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H, Tamura H. Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. J. Agr. Food Chem. 62: 885-892 (2014)
 44. Xu Y, Jiang Z, Ji G, Liu J. Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid. Planta Med. 76: 956-962 (2010)