

Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties of *Clerodendrum trichotomum* Leaf Extracts

Ji Hye Kim¹, Hana Song², Hee Chul Ko², Ju Yeop Lee², Mi Gyeong Jang¹ and Se Jae Kim^{1,2*}

¹Department of Biology, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju-si, Jeju Special Self-Governing Province 63243, Korea

²Jeju Sasa Industry Development Agency, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju-si, Jeju Special Self-Governing Province 63243, Korea

Received January 18, 2017 / Revised February 20, 2017 / Accepted February 20, 2017

Clerodendrum trichotomum (CT) leaves and stems have been used in folk medicine for their anti-hypertension, arthritis, rheumatism, and anti-inflammatory properties. This study was performed to evaluate the potential of CT as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. CT leaves were extracted using 70% ethanol (EtOH). Then, using this extract, a hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), and *n*-butanol (BuOH) fraction was prepared. The polyphenol contents were higher in the EtOAc fraction (78.08 µg/mg) and BuOH fraction (77.54 µg/mg) compared to the other fractions. Also, these two fractions exhibited strong 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging activities. Xanthine oxidase inhibitory activities were higher in the CHCl₃ fraction (IC₅₀ = 4.43 µg/ml) and EtOAc fraction (IC₅₀ = 5.69 µg/ml). Moreover, the EtOAc fraction effectively inhibited nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells (IC₅₀ = 18.87 µg/ml). Thus, we investigated the effects of the EtOAc fraction on the expression of pro-inflammatory cytokines, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The treatment of the EtOAc fraction (100 µg/ml) effectively decreased the levels of the tumor necrosis factor α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6), and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). These results suggest the potential for CT extract and fractions as promising anti-oxidant and anti-inflammatory agents.

Key words : Anti-inflammatory, anti-oxidant, *Clerodendrum trichotomum*, nitric oxide, polyphenol

서 론

체내에서 정상적인 대사과정 중에 생성되는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)들은 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase와 같은 체내의 항산화 효소들에 의해 제거된다[2, 8, 33]. 그러나 과도하게 생성된 ROS는 세포들의 산화적 손상을 유발할 뿐만 아니라 염증반응의 신호전달계와 연결되어 암, 치매, 당뇨병, 류마티스 관절염과 같은 퇴행성 질환이나 노화를 촉진한다고 알려져 있다[17, 22, 23].

병원균 침입 등의 외부 자극에 의해 일어나는 염증 반응은 대식세포와 같은 염증세포들을 활성화시켜 tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6)와 같은 전염증 사이토카인들과 ROS, nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등과 같은 염증매개 인자들을 생성한다. L-arginine으로부터 NO

synthases (NOSs)에 의해 생성되는 NO는 신경 전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하며, 박테리아를 죽이거나 종양 제거와 같은 중요한 역할을 한다[3, 29, 30]. 체내 염증 과정에서 생성되는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)와 cytokines 같은 자극에 노출되는 경우 발현되어 많은 양의 NO를 생성한다[9]. 지속적인 NO 생성은 심혈관계와 신경계의 항상성 조절 기능에 있어 치명적인 영향을 끼치며, 염증을 유발하여 조직 및 신경 손상 그리고 유전자 변이를 일으키는 원인으로 알려져 있다[29].

Prostaglandins (PGs)을 주로 생성하는 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 정상상태에서는 거의 발견되지 않으며, 섬유아세포, 내피세포, 단핵구를 포함한 몇몇 세포들이 박테리아의 내독소, interleukin-1 (IL-1) 또는 interferon-γ (IFN-γ)와 같은 전염증 사이토카인들에 의해 발현된다. 대식세포에서 COX-2의 발현은 동맥경화병변(atherosclerotic lesion)을 촉진시킨다고 알려져 있다[7, 30]. 따라서 염증 관련 인자들과 생성을 억제 또는 조절하는 물질은 항염증 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 항염증 치료제로는 비스테로이드성 항염증 약물, 비마약성 진통제가 급성 및 만성 염증 질환 치료에 사용되고 있다. 하지만 보다 안전하고 효과적인 항염증 치료제로서 천연물로부터 활성 성분을 찾으려는 연구가 활발히

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3529, Fax : +82-64-751-4406

E-mail : sjkim@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

진행되고 있다[23, 26].

누리장나무(*Clerodendrum trichotomum*)는 마편초과(Verbenaceae)에 속하는 낙엽 관목으로 한국, 일본, 중국, 필리핀 북부 등에 널리 분포되어 있다[12, 19]. 누리장나무의 가지와 잎은 풍사를 몰아내고 습사를 없애며 혈압을 낮추는 약효가 알려져 있어 취오동(臭梧桐)이라는 한약재로 불려왔으며, 예로부터 고혈압, 편두통, 이질 등의 효능이 있어 민간약재로 사용되었다. 누리장나무는 항산화, 항염, 항고혈압, 항암과 항균 작용 등 다양한 생리활성을 가진다고 보고된 바 있지만[1, 4, 16, 19, 21, 27, 31], 누리장나무 잎 EtOH 추출물과 분획물에 대한 항염증 활성은 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 누리장나무 잎 EtOH 추출물과 그 분획물의 항산화 및 항염 활성을 평가하여 항염증 소재로서의 활용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

추출물 제조

누리장나무는 2016년 7월 제주도 북부지역에서 채집하여 잎 부위를 세척하고 60°C에서 24시간 건조한 후 분쇄하여 추출 시료로 사용하였다. EtOH 추출물은 시료 100 g에 70% EtOH 1 l를 가하고 24시간 동안 추출하였다. 수득한 EtOH 추출물은 용매 분획법에 따라 hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH)로 분획하여 각각 용매 별 분획물을 제조 및 여과한 후 농축하였다. 모든 추출물과 분획물은 동결건조 후 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 각 추출물과 분획물을 1 mg/ml로 희석한 시료에 10% Folin 시약과 2 M Na₂CO₃ 시약을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid의 표준곡선을 이용하여 계산하였다[28].

항산화 활성 분석

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성은 Blois 방법(Blois, 1958)에 따라 시료를 96 well plate에 100 µl씩 분주하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가 하여 어두운 곳에 10분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 소거활성은 시료를 100 µl씩 분주 후 7 mM ABTS와 2.45 mM ammonium persulphate를 동량 혼합하여 어두운 곳에서 10분간 방치한 후 745 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. Xanthine oxidase 억제 활성은 시료와 0.5 mM xanthine과 1 mM EDTA를 함유한 200 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 100 µl에 30 mU/ml xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid 생성

을 유도 후 실온에서 10분 반응 후 290 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다[25].

세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포독성

RAW 264.7 세포는 10% FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 96 well plate에 최종 농도가 3 × 10⁴ cells/well 가 되도록 분주하였다. 24시간 뒤 10% FBS가 포함된 배지에 시료를 처리한 다음, 1시간 후 LPS (1 µg/ml)를 처리하여 18시간 배양하였다. NO 생성억제 활성은 상층액 100 µl와 Griess 시약(1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenedi-amine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) 100 µl를 혼합하여 어두운 곳에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. 세포독성은 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) 방법을 이용하여 측정하였다[11].

Pro-inflammatory cytokines 분비량 측정

전염증 사이토카인을 측정하기 위하여 96 well plate에 3 × 10⁴ cells/well 를 분주하고 시료를 농도 별로 처리 한 다음, 1시간 후에 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 사이토카인은 18시간 배양이 끝난 후 상층액을 이용하여 측정하였다. TNF-α, IL-6는 ELISA Kit (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였으며 실험 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

Western blot

RAW 264.7 세포를 6 well cell culture plate에 6 × 10⁵ cells/well 이 되도록 분주하여 24시간 배양 후 시료를 넣고 한 시간 배양한 후 LPS를 1 µg/ml이 되도록 첨가 또는 무 첨가해 18-24시간 배양하였다. 이후 세포를 차가운 PBS를 이용해 2회 세척하고 lysis buffer를 이용해 1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 20 min)하여 상층액을 분리하였다. 단백질은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bio-Rad protein assay reagent를 사용하여 정량하였고, 10% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane를 이용하여 200 mA로 120분 동안 전이시켰다. 전이된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.1% TBST에 넣고 상온에서 1시간 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 antibody는 iNOS antibody (Santa Cruz, USA), COX-2 antibody (BD Transduction Laboratories, USA), β-actin antibody (Santa Cruz, USA)를 이용하여 상온에서 2시간 반응 후, 반응이 끝난 membrane은 0.1% TBST 용액으로 5회 세척 후 peroxidase-conjugated된 2차 항체 Mouse antibody (Jackson Immuno Research, USA), Rabbit antibody (Vector Laboratories, USA)를 상온에서 1시간 반응시킨 뒤, 0.1% TBST로 5회 세척하였다. 단백질은 Westar ETA C (CYANAGEN,

Table 1. The polyphenol contents and anti-oxidant activities of *Clerodendrum trichotomum* leaf extract and its fractions

Sample	Total polyphenol content (µg/mg)	DPPH radical scavenging activity	ABTS radical scavenging activity	Xanthine oxidase inhibitor activity
EtOH	42.60±2.25	176.42±2.22	155.94±35.27	60.53±0.89
Hexane	22.71±4.01	629.56±34.44	739.83±51.35	>1000
CHCl ₃	37.55±1.94	492.87±0.42	293.37±40.33	4.43±1.27
EtOAc	78.08±4.86	72.05±2.56	33.86±2.29	5.69±3.49
BuOH	77.54±4.44	52.12±5.59	25.40±5.93	460±23.01
Ascorbic acid	N/A	10.12±0.33	9.66±3.51	N/A
Allopurinol	N/A	N/A	N/A	52.58±5.52 µM

Each value is the average ± S.D. of triplicate determinations. Anti-oxidant activity was represented as IC₅₀ (µg/ml), which values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments. EtOH, 70% ethanol; CHCl₃, chloroform; EtOAc, ethyl acetate; BuOH, *n*-buthanol fractions; N/A, not assayed.

Italia)를 이용하여 X-ray 필름으로 결과를 확인하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복 수행하였고, 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계적 유의성에 대한 검증은 SPSS program의 분산분석(one-way ANOVA)을 행하여 *p*<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성

누리장나무 잎 EtOH 추출물로부터 순차적으로 얻은 4가지 분획물들의 항산화 활성(DPPH, ABTS, Xanthine oxidase 억제활성)은 IC₅₀값으로 비교하였으며, 총 폴리페놀 함량은 표준물질 tannic acid를 근거로 산출하여 Table 1에 나타내었다. EtOH 추출물의 폴리페놀 함량은 42.60±2.25 µg/mg이었으며, 이를 유기용매로 분획했을 때 EtOAc 분획물(78.08±4.86 µg/mg)과 BuOH 분획물(77.54±4.44 µg/mg)에서 다른 추출물에 비해 폴리페놀 함량이 높음을 확인할 수 있었다(Table 1).

DPPH 소거 활성은 BuOH 분획물(IC₅₀ = 52.12±5.59 µg/ml)과 EtOAc 분획물(IC₅₀ = 72.05±2.56 µg/ml)에서 우수하게 나타났다. 그리고 ABTS 소거 활성 또한 BuOH 분획물(IC₅₀ = 25.40±5.93 µg/ml)과 EtOAc 분획물(IC₅₀ = 33.86±2.29 µg/ml)에서 가장 높았다. 그러나 xanthine oxidase 억제 활성에서는 CHCl₃ 분획물(IC₅₀ = 4.43±1.27 µg/ml)이 가장 우수하였고, 그 다음으로 EtOAc 분획물(IC₅₀ = 5.69±3.49 µg/ml)이 높은 억제 활성을 보였다(Table 1).

폴리페놀계 물질들은 lipid peroxidation inhibitor 와 xanthine oxidase inhibitor 등과 같은 역할을 하여 free radical 및 활성 산소의 반응을 억제한다고 알려져 있다[14, 15]. Xanthine oxidase는 superoxide radical이나 H₂O₂와 같은 산화제의 source로서 작용하는 효소이다. Superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타나는

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해 작용은 통풍 억제 및 free radical 생성 억제를 통해 생물학적으로 중요한 의미를 갖는다[10]. 총 폴리페놀 함량이 높은 EtOAc 분획물은 lipid peroxidation inhibitor에서부터 xanthine oxidase inhibitor 역할을 하는 폴리페놀 함량이 높아 DPPH, ABTS 소거활성과 xanthine oxidase 억제 활성이 높은 것으로 사료된다.

항염증 활성

누리장나무 잎 분획물의 폴리페놀 함량과 항산화 활성을 비교한 결과 에탄올 추출물에 비해 분획물인 EtOAc 분획물에서 모두 높은 항산화 활성을 확인하였다. 따라서 마우스에서 유래된 RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하여 NO를 유도시킨 후 누리장나무 잎 EtOH 추출물로부터 얻은 분획물을 RAW 264.7 세포에 처리하여 NO 생성 억제활성을 비교·분석하였다. 그 결과, LPS에 의하여 유도된 RAW 264.7 세포의 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 EtOAc 분획물의 NO 생성 억제 활성(IC₅₀ = 18.87±3.52 µg/ml)이 에탄올 추출물 및 다른 분획물에 비해 우수함을 확인할 수 있었다(Table 2). NO는 활

Table 2. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of *Clerodenerum trichotomum* leaf extract and its fractions in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

Sample	NO production inhibitory activities	Cytotoxicity
EtOH	105.38±29.97	>200
Hexane	104.20±57.25	>200
CHCl ₃	67.11±19.35	>200
EtOAc	18.87±3.52	184.33±2.81
BuOH	85.40±27.44	>200

NO production inhibitory activity and cytotoxicity were represented as IC₅₀ (µg/ml) and TC₅₀ (µg/ml), respectively, which values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments. EtOH, 70% ethanol; CHCl₃, chloroform; EtOAc, ethyl acetate; BuOH, *n*-buthanol.

성산소종의 하나로 정상적인 세포 내에서 신호전달과 혈소판 응집 반응 등을 조절하나, 체내 염증과정에서 발생하는 iNOS에 의해 과량의 NO가 유발되며 이는 조직 손상과 만성 염증을 유발한다고 알려져 있다[5, 15, 18].

누리장나무 잎 EtOAc 분획물은 항산화 활성 및 NO 생성 억제 활성이 가장 우수하기 때문에 이를 이용하여 LPS에 의해 염증 반응이 유도된 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , IL-6의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 양성 대조군으로 LPS (1 μ g/ml)로 처리하였을 때 TNF- α 와 IL-6의 발현 모두 증가하였으며, 누리장나무의 EtOAc 분획물을 처리하였을 때, TNF- α 의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하였으며(Fig. 1A),

IL-6 또한 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 정상조직에서도 발현되는 TNF- α 와 IL-6와 같은 전염증 사이토카인들은 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 류마티스성 관절염 및 암 발생 등에 중요한 역할을 한다[20]. TNF- α 가 과도하게 생성되면 발열 및 염증반응을 유도하고 IL-6 및 IL-1을 생성하며, IL-6는 주로 단핵구나 대식세포에서 항체 분비를 자극시키며, 이 cytokine은 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되어 있다[6]. 따라서 누리장나무 잎으로부터 추출된 EtOAc 분획물이 효과적으로 전염증 사이토카인들의 발현을 억제하는 활성을 갖고 있음을 알 수 있다.

또한 EtOAc 분획물의 iNOS와 COX-2 단백질 합성에 미치

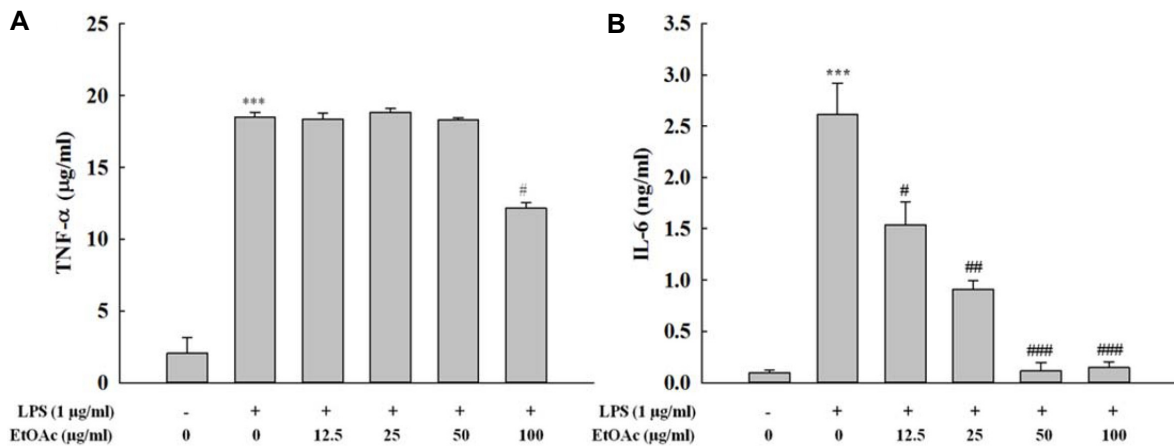


Fig. 1. Effects of EtOAc fraction from *Clerodendrum trichotomum* leaf extract on production of TNF- α (A) and IL-6 (B) in LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Cells were treated with different concentration of sample for 1 hr, then LPS (1 μ g/ml) was added and incubated for 18 hr. IL-6 and TNF- α concentrations in cultured medium were measured. Error bar represents SD (n=3 experiments). *** p <0.001 versus negative control; # p <0.05 versus positive control; ## p <0.01 versus positive control; ### p <0.001 versus positive control.

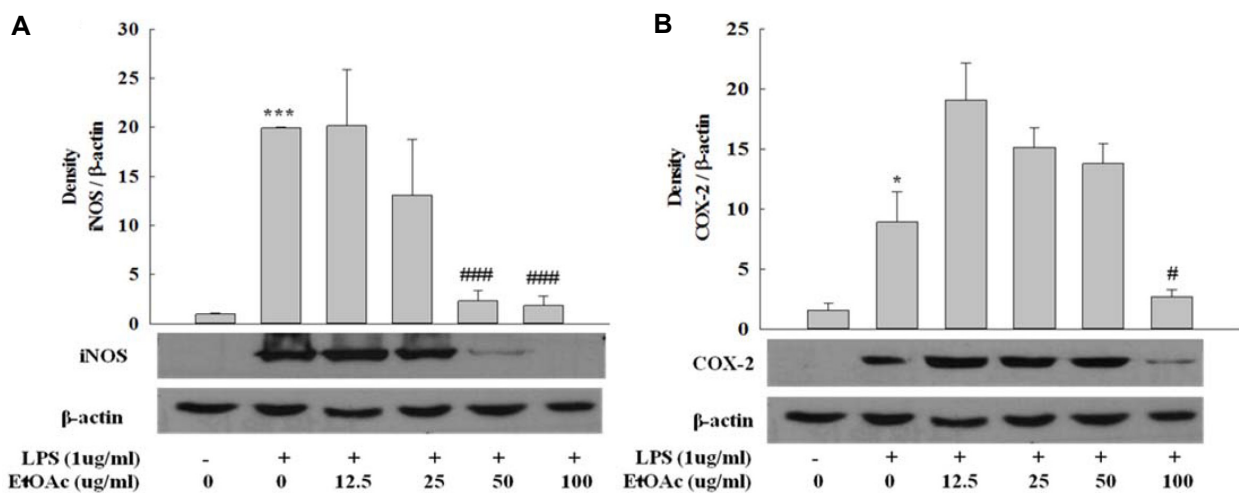


Fig. 2. Effects of EtOAc fraction from *Clerodendrum trichotomum* leaf extract on the expression of iNOS (A) and COX-2 (B) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with different concentration of sample for 1 hr, then LPS (1 μ g/ml) was added and incubated for 18 h. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Error bar represents SD (n=3 experiments). *** p <0.001 versus negative control; # p <0.05 versus positive control; ## p <0.01 versus positive control; ### p <0.001 versus positive control.

는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 EtOAc 분획물을 농도별로 처리하고 1시간 뒤, LPS (1 µg/ml)을 처리한 후 Western blotting으로 확인하였다. 양성 대조군은 LPS (1 µg/ml) 처리 후 iNOS 단백질의 발현이 증가하였으며, 누리장나무 EtOAc 분획물을 각각 농도별로 처리 하였을 때, iNOS의 발현이 12, 25 µg/ml에서는 차이가 미미하였지만, 50 µg/ml에서부터 농도 의존적으로 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). COX-2 단백질 또한 LPS 처리 후 발현량이 증가하였으며 EtOAc 분획물을 100 µg/ml 처리하였을 때 현저히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 이는 EtOAc 분획물이 LPS로 유도된 iNOS 단백질과 COX-2 단백질의 합성을 모두 저해함으로써 항염증 효과를 나타내는 결과로 사료된다.

본 연구에서는 누리장나무 잎 EtOH 추출물로부터 얻은 4 가지 분획물의 총 폴리페놀 함량과 항산화 및 항염 활성을 비교하였다. 분획물 중에서 폴리페놀 함량이 높은 EtOAc 분획물이 DPPH, ABTS radical 소거활성, 그리고 xanthine oxidase 억제 활성이 가장 우수하였다. EtOAc 분획물은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 효과적으로 억제하였고, TNF-α, IL-6, iNOS, COX-2 단백질의 발현을 유의적으로 감소시켰다. 본 연구결과는 누리장나무 잎 EtOAc 분획물의 항산화 및 항염 소재로의 활용 가능성을 제시해주며, 향후 누리장나무 EtOAc 분획물의 항염증 활성 기전 연구와 생리활성 물질에 관한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다

감사의 글

이 논문은 2015년 제주대학교 혁신지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Ahn, D. K. 2003. Illustrated book of Korean medical herbs, pp. 323, Kyo-Hak Publishing Co, Ltd, Korea.
- Aniya, Y. and Naito, A. 1993. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 37-42.
- Cho, W., Nam, J. W., Kang, H. J., Windono, T., Seo, E. K. and Lee, K. T. 2009. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the down-regulation of NF-kappaB pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1049-1057.
- Choi, J. H., Wang, W. K. and Kim, H. K. 2004. Studies on the anti-inflammatory effects of *Clerodendron trichotomum thunberg* leaves. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 189-193.
- Coleman, J. W. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1397-1406.
- Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance. *Neuropeptides* **37**, 355-361.
- DeWitt, D. and Smith, W. L. 1995. Yes, but do they still get headaches. *Cell* **83**, 345-348.
- Han, J. T. 2006. Development of functional material using the root of *Rosa multiflora*. *Food Industry Nutr.* **11**, 59-65.
- Hippeli, S. and Elstner, E. F. 1999. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radic. Res.* **31**, 81-87.
- Hwang, J. G., Yun, J. K., Han, K. H., Do, E. J., Lee, J. S., Lee, E. J., Kim, J. B. and Kim, M. R. 2011. Anti-oxidation and anti-aging effect of mixed extract from Korean medicinal herbs. *Kor. J. Herbology* **26**, 111-117.
- Hwang, J. H., Choi, S. Y., Ko, H. C., Jang, M. K., Jin, Y. J., Kang, S. I., Park, J. G., Chung, W. S. and Kim, S. J. 2007. Anti-inflammatory effect of the hot water extract from *Sasa quelpaertensis* leaves. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 728-733.
- Inchi, T., Shimizu, T. and Yoshihira, K. 1996. In *Biotechnology in agriculture and forestry*. pp. 108, Berlin Heidelberg, Germany.
- Jeong, H. J., Park, S. B., Kim, S. and Kim, H. K. 2007. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1491-1496.
- Jo, N. R., Park, C. I., Park, C. W., Shin, D. H., Hwang, Y. C., Kim, Y. H. and Park, S. N. 2012. Cellular protective effects of peanut sprout root extracts. *Chem. Eng.* **23**, 183-189.
- Kang, B. K., Kim, K. B. W. R., Kim, M. J., Bark, S. W., Pak, W. M., Kim, B. R., Ahn, N. K., Choi, Y. U. and Ahn, D. H. 2014. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 Cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **46**, 729-733.
- Kim, S. H., Choi, H. J., Chung, M. J. and Ham, S. S. 2008. Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 696-701.
- Knowles, R. G. and Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249-258.
- Koo, M. S., Kwo, Y. G., Park, J. H., Choi, W. J., Billiar, T. R. and Kim, Y. M. 2002. Signaling and function of caspase and c-jun N-terminal kinase in cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Cells* **13**, 194-201.
- Lee, C. B. 1973. An illustrated book of Korean plant. Hyang Mun publishing company, Korea.
- Lee, H. N., Lim, D. Y., Lim, S. S., Kim, J. D. and Park, J. H. Y. 2011. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 65-71.
- Lee, W. T. 1996. *Lineamenta florum korea*. pp. 934-935, 1st ed., Academic Books. Seoul.
- Li, C. and Wang, M. H. 2011. Antioxidant activity of peach blossom extracts. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **54**, 46-53.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P. 2001.

- Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 1205-1210.
24. OH, S. Y., Kim J. W., Lee K. L., Hwang, B. Y., Han, J. W., Lee, G. Y., Ahn, C. K. and Lee, J. K. 2014. Anti-inflammatory activity of the methanol extract of leaves *Clerodendrum trichotomum*. *Bull. Sci. ED.* **30**, 29-37.
25. Okave, S., Takeuchi, K., Takagi, K. and Shibata, M. 1975. Stimulatory effect of the water extract of bamboo grass (Folin solution) on gastric acid secretion in pylorus-ligated rats. *Jan. J. Pharmacol.* **25**, 608-609.
26. Park, J. S. and Kim, H. Y. 2000. current trend of NSAID use. *Kor. J. Med.* **59**, 491-504.
27. Park, M. A. and Kim, H. J. 2007. Anti-inflammatory constituents isolated from *Clerodendron tri-chotomum* Thuberg leaves (CTL) inhibits pro-inflammatory gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages by suppressing NF- κ B activation. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 755-760.
28. Park, Y. O. and Lim, H. S. 2009. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa Borealis*) leaf extract according to extraction solvent. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **38**, 1640-1648.
29. Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F. and Nathan, C. F. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7773-7777.
30. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. and Margioris, A. N. 2006. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **38**, 1654-1661.
31. Wang, W. X., Xiong, J., Tang, Y., Zhu, J. J., Li, M., Zhao, Y., Yang, G. X., Xia, G. and Hu, J. F. 2013. Rearranged abietane diterpenoids from the roots of *Clerodendrum trichotomum* and their cytotoxicities against human tumor cells. *Phytochemistry* **89**, 89-95.
32. Yoo, Y. C., Lee, G. W. and Cho, Y. H. 2016. Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from the flowers of *weigela subsessilis* on RAW 264.7 macrophages. *J. Life Sci.* **26**, 338-345.
33. Zelko, I. N., Mariani, T. J. and Folz, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 337-349.

초록 : 누리장나무 잎 추출물의 항산화 및 항염증 활성

김지혜¹ · 송하나² · 고희철² · 이주엽² · 장미경¹ · 김세재^{1,2*}

(¹제주대학교 생물학과, ²제주대학교 제주조릿대 사업단)

누리장나무의 잎과 줄기는 예로부터 항고혈압, 관절염, 류마티스 관절염, 항염증 등을 치료하는 민간약재로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 누리장나무의 잎 추출물과 그 분획물의 항산화 및 항염증 소재로서의 활성가능성을 확인하기 위하여 수행되었다. 누리장나무 잎의 ethanol (EtOH)로 추출물과 이 추출물을 분획하여 얻은 hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 분획물들의 총 폴리페놀 함량을 비교한 결과, 총 폴리페놀 함량은 EtOAc 분획물(78.08 μ g/mg)과 BuOH 분획물(77.54 μ g/mg)에서 높게 측정되었다. 각 분획물의 항산화 활성을 비교한 결과, 폴리페놀 함량이 높은 EtOAc 분획물과 BuOH 분획물에서 높은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 및 ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) radical 소거활성을 나타내었다. 그리고 xanthine oxidase 저해활성은 CHCl₃ 분획물(IC₅₀ = 4.43 μ g/ml)과 EtOAc 분획물(IC₅₀ = 5.69 μ g/ml)에서 높게 나타났다. EtOAc 분획물은 RAW 264.7 세포에서 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 nitric oxide (NO)의 생성을 효과적으로 억제하였다(IC₅₀ = 18.87 μ g/ml). 또한, EtOAc 분획물(100 μ g/ml)은 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 tumor necrosis factor α (TNF- α)와 interleukin-6 (IL-6)의 생성과 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 단백질의 발현을 효과적으로 억제하였다. 본 연구결과는 누리장나무 잎 추출물과 분획물이 항산화 및 항염증 소재로서의 활용가능성이 있음을 제시해 준다.