ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2017** Vol. 27. No. 9. 986~993 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.9.986

Anti-inflammatory Effects of Lemon Myrtle (*Backhousia citriodora*) Leaf Extracts in LPS-induced RAW 264.7 Cells

Pan Kil Kim[1,2], Kyung Im Jung[3], Young Ju Choi[3] and Sang Wan Gal[1*]

[1]*Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea*
[2]*Department of Medical Laboratory Science, Gimhae College, Gimhae 50811, Korea*
[3]*Department of Food & Nutrition, Silla University, Busan 46958, Korea*

Received June 9, 2017 / Revised August 17, 2017 / Accepted August 24, 2017

Lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) has been identified as one of the plants that are likely to undergo important commercial exploitation. This study was carried out to investigate the anti-inflammatory activities and nitric oxide synthase (iNOS) expression of hot water (LMW) and 80% ethanol (LME) extracts from lemon myrtle leaf in lipopolysaccharide-induced (LPS) RAW 264.7 cells. The total phenol content of LMW and LME was 207.44 and 331.54 μg tannic acid equivalents (TAE)/mg, respectively (p<0.01). DPPH radical scavenging activities of LMW and LME were remarkably increased in a dose-dependent manner, and were about 90.69% and 92.50% at 0.5 mg/ml, respectively. Superoxide dismutase (SOD) activities of LMW and LME were 106.22% and 103.58% at 1 mg/ml, respectively. The highest activity (91.03%) of nitrite-scavenging was observed for LME at 1 mg/ml at pH 1.2, while the activity for LMW was about 81.03% under the same conditions (p<0.05). Anti-inflammatory effect was examined in LPS stimulated RAW 264.7 cells. Nitric oxide (NO) production were reduced to 35.41% and 78.39% by addition of LMW and LME at 0.5 mg/ml, respectively (p<0.05). LMW and LME reduced protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in a dose-dependent manner (p<0.05). These results, we conclude that lemon myrtle may be a highly valuable natural product owing to its high-quality functional components as well as its anti-oxidant and anti-inflammatory activities.

Key words : Anti-inflammatory, anti-oxidant, NO, iNOS, lemon myrtle

서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)나 유리기(free radical)의 생성과 항산화 물질에 의한 불균형으로 정의되는 산화적 스트레스[45]는 퇴행성 신경계 질환과 노화 및 당뇨 등의 다양한 질환과 관련이 있다[10, 39, 49]. 세포에 대한 지속적이고 과도한 산화적 스트레스는 퇴행성질환을 유발하는 특정 세포의 유전자 발현 증가뿐만 아니라 세포사멸이 증가되어 만성적 염증 반응이 유도된다[22, 37]. 염증반응이란 화학적 물질과 물리적 작용 및 세균 감염 등의 외부 자극에 의해 신체 조직 손상 시 면역세포에서 다양한 염증매개 물질을 분비하여 정상상태로 회복 및 유지 시키려는 국소적인 생체방어기전이다[46]. 염증반응으로 생성된 활성산소에 의해 산화적 스트레스가 증가하면 염증 및 면역 반응을 유도시켜 COX-2와 iNOS 등의 단백질 발현을 증가시킨다[13]. 염증자극에 반응하여 세포 내 신호전달 경로와 전사인자가 활성화되며 발현되는 염증인자는 LPS와 같은 일차적 자극 때문에 발생한다[30]. Gram negative bacteria의 세포 외막에 존재하는 다당류인 LPS는 대식세포를 자극하여 염증성 cytokine 생성을 증가시켜 대식세포, monocytes, hepatocytes, bone marrow cells, smooth muscle cells 등 다양한 세포에서 유도성 NO synthase (NOS)를 발현시키고 그 결과 다량의 일산화질소(NO, nitric oxide)를 생산한다고 알려져 있다[1]. 염증반응 지표물질인 NO는 혈관확장과 신호전달기능 및 체내방어기능 등의 다양한 생리기능을 가지고 있지만 다량의 NO는 염증을 심화시켜 패혈성 쇼크, 조직 손상과 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다[4]. 이에 따라 염증매개체의 활성 억제 물질에 관한 관심이 높아지고 있지만 최근에는 합성항염증 치료제로 인한 부작용의 우려가 커지고 있다[36]. 따라서 합성항염증 치료제를 대체할 수 있는 안전한 천연 항산화 물질 및 천연 항염증제에 대한 관심이 높아짐에 따라 항산화 및 항염증에 대해 안전하고 효과가 있는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[17, 19].

호주의 토종식물인 레몬 머틀(*Backhousia citriodora*)은 해발 50~800 m의 퀸즐랜드 해안지역 열대 우림 기후에서 자생하는[3] 도금양과(*Myrtaceae*)의 관목으로 레몬향이 풍부하고 citral을 함유하고 있어 예로부터 호주에서는 전통 향신료로 이용되

***Corresponding author**
Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3393
E-mail : sangal@gntech.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.

는 식물이다[5]. Citrus 고유의 향취를 함유하고 있는 레몬 머틀 잎이 새롭게 부각되어 각광을 받고 있어 최근에는 국내에서도 재배하고 있기에 새로운 citrus 계열의 원료로 기대감이 높아지고 있다[43]. 레몬 머틀에 관한 연구는 essential oil의 세포독성[14], 피부독성[15], 항균 및 항곰팡이 활성[50]과 레몬 머틀 잎의 항산화 효과[31]와 골 형성에 미치는 영향[5] 등이 보고되어 있으나 레몬 머틀 잎의 항염증 효과에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 레몬 머틀 잎의 열수 및 에탄올 추출물을 이용하여 총 폴리페놀 함량과 DPPH radical 소거능 및 SOD 활성을 조사하여 항산화 활성을 알아보고, LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포를 통해 NO 활성 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 항염증 효과를 확인하여 새로운 소재로서의 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출

본 연구에 사용한 레몬 머틀 잎(호주산)은 상황가(Sanghwanga, Busan, Korea)에서 제공받아 후드믹서(FM-681C, HANIL ELECTRIC, Seoul, Korea)로 분쇄하여 시료로 사용하였다. 레몬 머틀 잎 분말 50 g에 용매(증류수, 80% 에탄올) 500 ml을 가하여 증류수 추출은 80℃에서 12시간, 에탄올 추출은 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 각각의 추출물은 whatman No. 2 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하여 rotary evaporator (EYELA N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축한 다음 동결 건조하여 -70℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 수율은 각각 41.6%와 8.0%이었다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 polyphenol 함량은 Folin-Ciocalteu법[48]을 약간 변형시켜 측정하였으며 표준물질로는 tannic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하여 분석하였다. 일정농도의 레몬 머틀 추출물을 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 ml로 정용한 후 Folin-Ciocalteu reagent 0.3 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 3분간 실온에서 반응시켰다. 혼합물에 7.5% Na_2CO_3용액 0.4 ml를 가하여 혼합하고 50℃에서 5분간 발색시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 레몬 머틀 추출물의 총 페놀 함량은 μg TAE/mg으로 나타내었다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazy (DPPH) radical 소거능 측정

레몬 머틀 추출물의 전자공여능은 Blois [2]의 방법을 약간 변형하여 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 96-well plate에 시료와 0.4 mM DPPH 용액을 1:4 비율로 혼합하여 37℃에서 30분간 반응 시킨 후, ELISA reader (Versa Max Microplate Reader, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability; EDA)은 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 free radical의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

EDA(%) = (대조구 흡광도-시료첨가구 흡광도)/대조구 흡광도 ×100

Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

레몬 머틀 잎 열수 및 에탄올 추출물의 SOD 활성은 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA)를 사용하여 manufacturer's instruction에 기술된 방법에 따라 수행하였다. 농도별로 희석한 시료 20 μl을 96 well plate에 분주한 후 WST working solution 200 μl를 넣고 혼합한 다음 enzyme working solution 20 μl를 가하여 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 효소 대신 20 μl의 dilution buffer를 넣어 측정하였다. SOD 활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

SOD activity (%)=(1-시료첨가구의 흡광도/시료무첨가구의 흡광도)×100

아질산염 소거능 측정

레몬 머틀 추출물의 아질산염 소거능은 Gray와 Dugan의 방법[11]을 변형하여 측정하였다. 아질산염 용액에 시료 용액을 가한 후 0.1 N HCl (pH 1.2) 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조정하여 사용하였다. 반응물용액은 37℃에서 1시간 반응시킨 후 Griess 시약을 가하여 15분간 실온에 방치시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 구하였다. 아질산염 소거능은 다음의 식에 따라 계산하였다.

아질산염 소거능(%)=[1-(A-C)/B]×100

A: 1 mM $NaNO_2$ 용액에 추출 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: $NaNO_2$ 용액의 흡광도

C: 시료의 흡광도

세포 배양

RAW 264.7 대식세포는 100 units/ml의 penicillin, 100 μg/ml streptomycin과 10%의 fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일에 한번 refeeding하면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척한 후 scraper를 이용하여 세포를 분리한 뒤 원심분리 하여

세포를 모든 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대배양하며 사용하였다.

Cell viability 측정

세포독성 실험은 mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT calorimetric reduction assay 법으로 추출물이 세포생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 96-well microtiter plate (SPL Lifesciences, Gyeonggi-do, Korea)에 RAW 264.7 대식세포를 1.0×10^5cells/well의 농도로 분주하고, 분주 24시간 후 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물이 함유되어 있는 배지를 각각 100 µl씩 넣어 48시간 동안 배양하였다. Plate에 MTT 2 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 20 µl씩 첨가하여 4시간 동안 배양시키고 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 상등액을 제거하였다. DMSO 150 µl를 첨가하여 formazan을 녹인 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 측정

NO 소거 활성은 마우스의 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포를 배양판에 1.0×10^5cells/ml의 세포가 되도록 분주하여 LPS (lipopolysaccharide) 자극 하에 24시간 배양하고 그 배양 상층액 내의 NO 생성은 Griess 반응으로 세포 상등액에 축적되는 nitrite 양으로 측정하였다[40]. 대조군으로는 10 µg/ml의 LPS를 처리하여 활성화를 유도한 세포를 사용하였다. 배양 후 100 µl의 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약[1% sulfanilamide (30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (60% acetic acid) 혼합액]을 가하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS 발현 억제능 측정

레몬 머틀 잎 추출물의 iNOS 발현 억제능은 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포를 12 well plate에 1×10^6 cells/well로 seeding하여 2시간 배양하고 시료를 처리한 후 24시간 후에 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 24시간 동안 37℃에서 배양하였다. iNOS 분석을 위한 단백질 sample은 RIPA lysis buffer를 이용하여 분해 후 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액에 있는 단백질을 회수하였다. 회수한 단백질은 Bio rad protein assay (Bio Rad, CA, USA)로 농도를 측정하여 30 µg으로 농도를 맞춘 후 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행하였다. PAGE 후 nitrocellulose membrane에 transfer하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 상온에서 blocking시켰다. 1차 항체(Santa Cruz, CA, USA)를 희석하여 4℃에서 overnight시킨 후 tris buffered saline with tween-20 (TBS-T)로 15분씩 3번 세척하였다. 2차 항체(Santa Cruz, CA, USA)를 상온에서 1시간 반응시킨 후 다시 TBS-T로 15분간 3회 세척하였다. Chemiluminescence detection system (ECL)을 처리 후 암실에서 X-ray 필름으로 감광시켜 단백질 발현량을 확인하였다.

통계처리

실험결과는 통계 SAS package (Statistical Analysis System, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 각 시료의 평균과 표준편차를 계산하였고, 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하여 $p<0.05$ level에서 시료간의 유의차를 검정하였으며, 추출 용매별 폴리페놀 함량 차이분석을 위해 t-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

식물체에 널리 분포되어 있는 페놀성 화합물은 free radical 소거와 체내의 항산화 활성 및 free radical로부터 조직을 보호해 주는 역할을 하며[44], phenolic hydroxy기가 생체 내에서 단백질 등의 거대분자와 결합하여 항암, 항균, 항산화 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[32, 47]. 항산화 활성과 페놀성 화합물 함량 간의 상호작용에 대한 연구들에서 알 수 있듯이 식물체에 함유된 페놀성 화합물 함량을 측정함으로써 항산화 활성을 탐색하는 일차적인 자료가 될 수 있는 것으로 판단된다[8]. 본 연구에서는 레몬 머틀 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 tannic acid 표준 곡선으로부터 측정하였다. 그 결과(Table 1) 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 207.44와 331.54 µg TAE/mg으로 에탄올 추출물의 총 페놀 함량이 약 59.6% 높게 나타났다($p<0.01$). Konczak 등[31]은 오스트레일리아 레몬 머틀 열수 추출물의 총 페놀함량을 31.4 mg gallic acid equivalents (GAE)/g으로 보고하였고, Chen [5]은 국내산(하동) 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 207.7과 246.73 µg GAE/mg으로 에탄올 추출물의 총 페놀 함량이 높은 것으로 보고하여 본 연구와 유사한 경향이었으나 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량 간에는 차이가 있었다. 이는 추출방법 및 산지의 차이에 따른 결과라 판단된다. 한편 Iqbal과 Bhanger [18]는

Table 1. Total polyphenol contents of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts

Extracts	Total polyphenol (µg TAE/mg)[1)]	t-value	*P*-value
Hot water	331.54±22.53[2)]	-7.468[**3)]	<0.01
Ethanol	204.74±8.29		

[1)]TAE standards for tannic acid equivalent.
[2)]Results are mean ± SD of triplicate data.
[3)]** $p<0.01$.

파키스탄의 산지 및 수확시기에 따른 모링가 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량에 차이가 있는 것으로 보고하였고, Lee 등[33]은 추출온도 및 추출시간에 따라 로즈마리의 총 폴리페놀 함량에 차이가 있는 것으로 보고하였다.

DPPH radical 소거능

DPPH는 비교적 안정한 free radical을 가지는 화합물로 토코페롤과 비타민 C, 폴리페놀 화합물 등의 항산화 물질과 만나게 되면 환원작용에 의해 radical이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화 효과를 측정한다[2]. 이러한 DPPH assay는 식물의 항산화 활성을 비교적 간단하게 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 실제 항산화 활성과도 매우 높은 연관성이 있기에 많이 사용되고 있다[7]. 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과(Fig. 1) 농도 의존적으로 증가하였으며(p<0.05), 0.5 mg/ml 농도에서는 각각 90.69%와 92.50%로 같은 농도의 비타민 C (93.3%)와 유사한 높은 활성을 보였다. Chen [5]의 연구에서는 국내산 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물 0.5 mg/ml에서의 DPPH radical 소거능은 95% 이상의 높은 소거능이 있는 것으로 보고하여 본 연구에서와 유사한 결과를 보였다. 한편 Kim 등[28]은 이뇨작용 및 류머티스 등에 효과가 있는 것으로 알려진 민들레 잎 열수 및 에탄올 추출물 1 mg/ml 농도에서 각각 62.8%와 63.4%로 에탄올 추출물의 소거능이 높게 나타난 것으로 보고하였는데 이는 폴리페놀 함량과 DPPH radical 소거활성 간에 상관관계가 있음을 보고하여 본 연구에서와 유사하였다. Kim 등[27]은 녹차 열수 및 에탄올 추출물 1 mg/ml 농도에서 각각 53.2%와 74.9%로 보고하였고, Cho 등[6]은 솔순 열수 추출물 1 mg/ml 농도에서 40.5%로 보고하였다. 최근 레몬 머틀이 갖는 잠재적인 우수한 산업적 및 경제적 가치에 대한 관심이 증가하면서 다류, 화장품 등 다양한 분야로의 제품개발이 확대되어 가고 있는 추세이지만 지금까지 레몬 머틀 잎의 항산화 활성과 관련된 연구결과가 문헌상 보고된 바가 많이 없기에 본 연구결과와 직접 비교하기는 어렵다. 그러나 레몬 머틀 잎 추출물은 기능성 식품 소재로 이용되는 민들레와 솔순 및 녹차 추출물보다 높은 DPPH radical 소거능이 있는 것으로 나타났기에 식품소재로서의 활용가능성이 높은 것으로 생각한다.

SOD assay

생체 내 항산화 효소 중 하나인 SOD (superoxide dismutase)는 superoxide radical을 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소로[12, 23] SOD에 의해 생성된 과산화수소는 peroxidase나 catalase에 의해 물 분자와 산소 분자로 전환시키는 중요한 효소 중 하나이다[23]. 본 연구에서 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물의 SOD 활성을 분석한 결과(Fig. 2) 농도 의존적으로 증가하였으며(p<0.05), 1 mg/ml 농도의 열수 및 에탄올 추출물에서 각각 106.22%와 103.58%로 열수 추출물의 활성이 높은 것으로 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. Han 등[12]의 무순 추출물과 Kim 등[25]의 비타민 나무 잎 추출물 및 Lee 등[34]의 늙은 호박 추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 에탄올 추출물이 물 추출물보다 높은 활성을 보인 것과는 상반된 결과를 나타냈으나, Kim 등[24]의 새송이버섯 추출물의 SOD 유사활성은 물 추출물(62.57%)이 에탄올 추출물(21.33%)보다 높은 활성을 나타낸 결과 및 Lee 등[42]의 만형차 추출물의 SOD 유사활성은 물 추출물이 에탄올 추출물보다 높은 활성을 보인 결과와는 유사한 경향을 나타내었다. 이상의 결과에서 보면 추출 용매 및 함유된 생리활성 물질의 특이성에 따라 SOD 유사활성은 차이가 있으며, 추출 용매에 따른 결과는 항상 일치하지 않는 것으로 나타났다[12]. 한편, Kang 등[23]은 녹차 추출물이 홍차 추출물보다 높은 SOD 유사활성을 보인 것으로 보고하였고, Lee와 Lim은[35] 100 µl/ml 농도의 레몬그라스와 메이창 정유의 SOD 유사활성은 각각 56.1%와 36.8%로 레몬그라스의 활성이 높다고 보고하였으

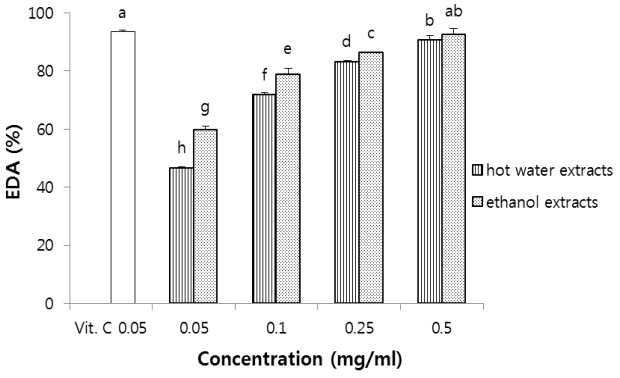

Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts. Results are mean ± S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 0.05 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-h) within a total sample differ significantly (p<0.05).

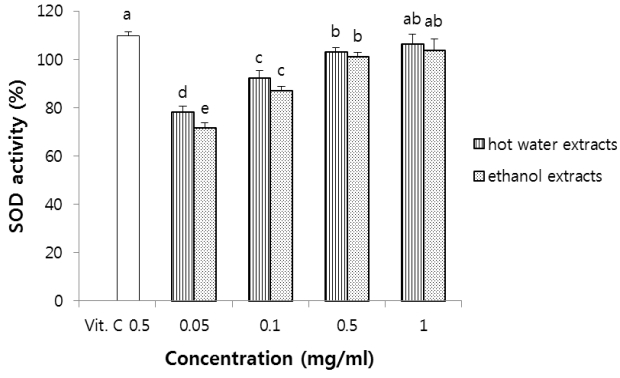

Fig. 2. Superoxide dismutase (SOD) activity of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts. Results are mean ± S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 0.5 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-e) within a total sample differ significantly (p<0.05).

며, Oh 등[41]은 90 μg/ml 농도의 로즈마리 추출물의 SOD 유사활성은 84.8%의 높은 활성이 있는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구결과 레몬 머틀 추출물은 superoxide radical 제거에 도움을 줄 수 있는 것으로 판단되며 추후 생리활성을 나타내는 물질 규명 연구가 필요한 것으로 생각된다.

아질산염 소거능

아질산염(NO)은 N-nitrosoamine을 생성하는 물질로 단백질이나 핵산 또는 세포 내 성분을 알킬화하여 매우 낮은 농도에서의 노출에도 방광암과 후두암, 위암 등의 다양한 암을 유발하거나 증가시킬 수 있으므로 환경적 발암인자로 중요시되고 있다[12]. 질산염은 그 자체로는 독성이 없지만 타액이나 위 내에서 환원 효소나 환원 세균 등의 작용에 의해 아질산염으로 환원되어 독성을 나타내며, 아질산염은 질산염에 비해 반응성이 크기 때문에 산성 영역에서 쉽게 nitrous acid로 전환되어 니트로소화 물질로써 작용할 수 있다[38]. 따라서 산성 영역에서 N-nitrosoamine의 생성을 억제하는데 기여하는 천연물을 찾는 연구가 계속되어 왔다[16, 26].

본 연구에서는 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물이 아질산염 소거능에 미치는 영향을 pH 1.2와 3.0 및 6.0에서 각각 분석한 결과(Fig. 3) pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 증가하는 것으로 나타났는데, pH 1.2에서의 아질산염 소거능은 비타민 C와 열수 및 에탄올 추출물 각각 95.27%와 81.06% 및 91.03%로 높은 소거능을 보였다. 레몬 머틀의 용매별 추출물은 pH 1.2에서 가장 높은 아질산염 소거능을 보였는데, 이는 위 내의 pH 조건과 유사한 pH 1.2에서 가장 활성이 좋은 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 아질산염 소거능은 pH에 매우 의존적이며, pH가 증가할수록 아질산염 소거효과가 감소한다고 보고한 Kang [23]과 Han 등[10]의 결과와 유사한 경향이었다. Lee 등[38]은 천연식물 성분이 아질산염 소거에 미치는 영향을 분석한 결과 녹차, 두충 등 다류의 아질산염 소거능은 반응 용액의 pH가 낮을수록 높게 나타났으며, 아질산염 소거능에 영향을 주는 물질은 주로 페놀성 화합물이라고 보고하였다. 본 연구결과 레몬 머틀 추출물은 높은 아질산염 소거능을 보이므로 천연 첨가물 및 기능성 식품소재로서의 가능성이 있는 것으로 생각된다.

Cell viability 및 NO assay

세포독성은 MTT 분석을 통해 측정하였으며, 그 결과(Fig. 4A) 100~500 μg/ml의 레몬 머틀 에탄올 추출물로 처리된 대식세포의 세포생존율은 92.67~87.00%로 LPS 처리군(80.66%)보다 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 활성 질소종(reactive nitrogen species)의 하나인 NO (Nitric oxide)는 반응성이 큰 free radical로 인체 내에서 생리적이나 병리적 반응에서 중요한 물질로 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 NOS에 의해 L-citrulline으로 합성되며 적절 수준에서는 면역조절과 혈관확장, 신경전달 및 혈소판 억제 등의 기능을 하지만 과량으로 생성되면 염증반응을 촉진하고 관절염, 다발성 경화증, 기관지염 등의 병적 반응을 일으킬 뿐만 아니라[29] 신경손상 및 유전자 변이를 유발한다[51]. 레몬 머틀의 항염증 활성을 측정하기 위하여 대식세포에 LPS를 처리하여 세포 내 NO생성을 유도한 후 100~500 μg/ml의 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물을 처리하여 각각의 추출물이 NO 활성에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 4B). LPS에 의해 유도된 대식세포의 NO 합성은 각 추출물 모두 농도 의존적으로 감소하였는데(p<0.05), 500 μg/ml 농도의 열수 및 에탄올 추출물에서의 NO 합성은 29.25%와 9.79%로 LPS 처리군 45.28%보다 각각 35.41%와 78.39% 현저하게 감소하였다(p<0.05). 본 연구결과는 배암차즈기 잎 추출물이 농도 의존적으로 NO 생성량의 감소를 보인 결과[20] 및 조릿대 잎 추출물 분획의 NO 저해능을 확인한 연구결과[13]와 유사한 경향임을 확인하였다. 이상의 결과에서와 같이 NO생성량의 변화는 MTT 분석에서 나타난 세포독성에 의한 영향과는 무관하다는 것을 확인할 수 있었으며, 레몬 머틀 잎 추출물은 LPS로 유도된 대식세포에서 증가된 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났기에 염증반응조절제로서의 효과가 있는 것으로 생각된다.

iNOS 발현억제 효과

평소에는 세포 내에 존재하지 않는 iNOS는 LPS에 의해 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하는데, 염증상태에서

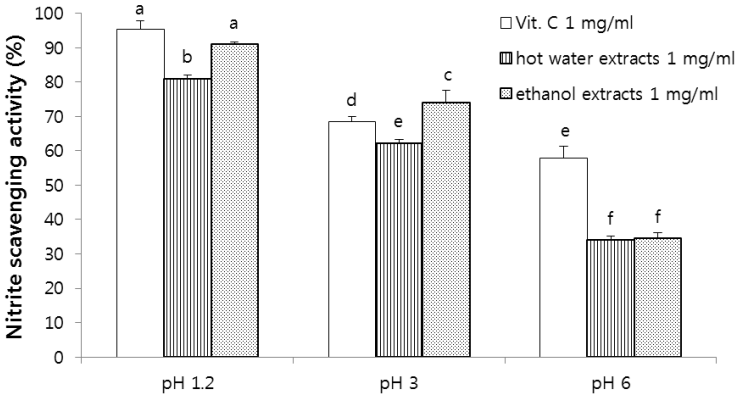

Fig. 3. Nitrite scavenging effects of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts under different pH conditions (pH 1.2, 3.0, 6.0). Results are mean ± S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 1 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-f) within a total sample differ significantly (p<0.05).

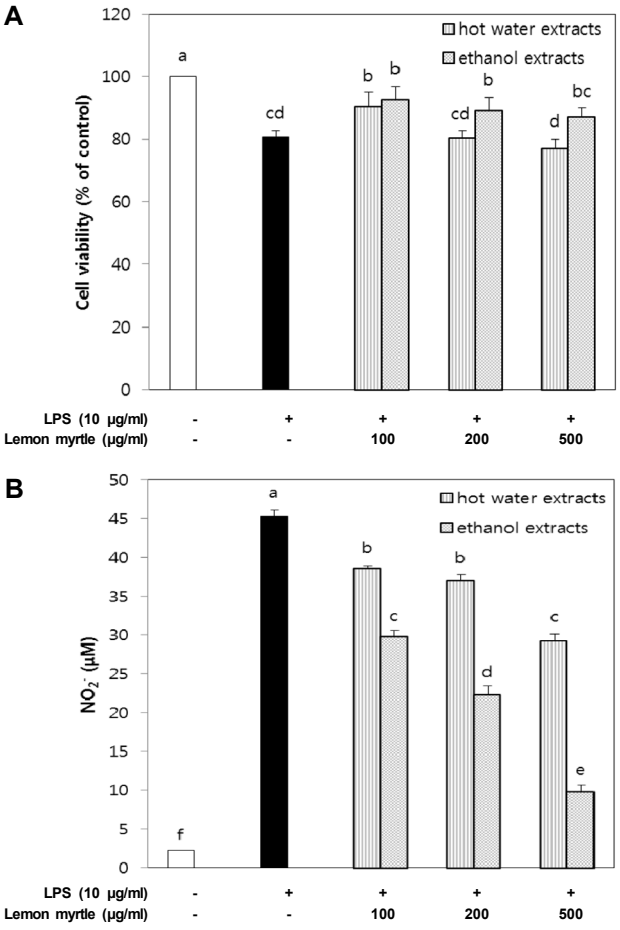

Fig. 4. Effects of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts on cell viability (A) and NO synthesis (B) in bacterial LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured for 24 hr with various concentration of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts in the presence of LPS (10 μg/ml). Cytotoxicity was determined by MTT assay. NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Results are mean±S.D. of triplicate data. Different letters (a-f) within a total sample differ significantly (p<0.05).

iNOS에 의해 생성된 NO는 부종과 혈관투과성 등의 염증반응 촉진할 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진한다[9]. 이는 대식세포에서 cytokine이나 LPS에 의해 염증성 매개물질들이 과잉 생산되는 중요한 메커니즘이 된다[21]. 본 연구에서는 레몬 머틀 잎 추출물의 NO 생성을 감소시켰으므로 이러한 효과가 iNOS의 발현억제에 기인한 것인지를 확인하기 위하여 Western blot을 이용하여 염증유발인자인 iNOS 단백질 발현 억제 효과를 house keeping gene인 β‐actin을 positive control로 사용하여 측정하였다. 그 결과(Fig. 5) LPS에 의해 증가된 iNOS의 단백질 발현양이 레몬 머틀 잎 추출물에 의하여 농도 의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있었는데, 레몬 머틀 잎 에탄올 추출물 100, 200, 500 μg/ml에서 각각 94.31, 54.53,

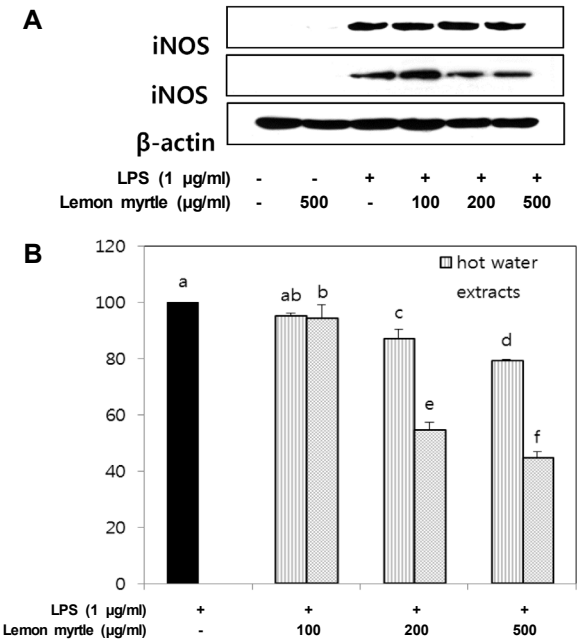

Fig. 5. Inhibitory effects of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts on the protein level of iNOS RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-incubated for 2 hr, and the cells were stimulated with LPS (1 μg/ml) in the presence of hot water extracts (A) and 80% ethanol extracts (B) of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf for 24 hr. iNOS protein levels were determined by immunoblotting method. Results are mean±S.D. of triplicate data. Different letters (a-f) within a total sample differ significantly (p<0.05).

44.53으로 LPS에 의해 증가된 iNOS 단백질 발현 양과는 유의적인 차이가 있었다(p<0.05). Jeong 등[20]은 iNOS 단백질 발현억제는 NO 생성 억제에 영향을 주는 것으로 보고하였는데 본 연구결과 또한 레몬 머틀 잎 추출물의 NO 생성 억제증과 iNOS 단백질 발현 억제능 사이에 유사한 경향을 보였다. 따라서 레몬 머틀 잎 추출물에 의한 iNOS 단백질 발현 억제능은 NO 생성 억제에 영향을 주는 것으로 판단되며, 이로써 레몬 머틀 잎 추출물이 염증반응조절제로서 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

References

1. Akihisa, T., Kokke, W. C. M. C., Kimura, Y. and Tamura, T. 1993. Isokarounidiol (D-C-Friedooleana-6,8-diene-3-alpha, 29-diol) the first naturally occurring triterpene with a delta-6,8-conjugated diene system‐Iodine-mediated dehydrogenation and isomerization of its diacetate. *J. Org. Chem*. **58**, 1959-1962.
2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
3. Buchaillot, A., Caffin, N. and Bhandari, B. 2009. Drying of

Lemon Myrtle (*Backhousia citriodora*) Leaves: Retention of volatiles and color. *Drying Technol*. **27**, 445-450.
4. Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol*. **2**, 907-916.
5. Cheon, J. H. 2015. Effects of *Backhousia citriodora* extracts on antioxidant activity and bone formation. Th.M. dissertation, Silla University, Busan, Korea.
6. Cho, E. K., Jeong, B. R. and Choi, Y. J. 2010. Physiological activities of hot water extract from pine bud (*Pinus densiflora*). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1573-1579
7. Choi, H. J., Lee, W. S., Hwang, S. J., Lee, I. J., Shin, D. H., Kim, H. Y. and Kim, K. U. 2000. Changes in chemical compositions of green tea (*Camellia sinensis* L.) under the different extraction conditions. *J. Life Sci.* **10**, 202-209.
8. Choi, S. Y., Lim, S. H., Kim, J. S., Ha, T. Y., Kim, S. R., Kang, K. S. and Hwang, I. K. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Kor. Food Sci. Technol.* **37**, 549-556.
9. Eun, C. S., Hwang, E. Y., Lee, S. O., Yang, S. A. and Yu, M. H. 2016. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of barley sprout extract. *J. Life Sci.* **26**, 537-544.
10. Finkel, T. and Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
11. Gray, J. I. and Dugan JR, L. R. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* **40**, 981-984.
12. Han, J. H., Moon, H. K., Chung, S. K. and Kang, W. W. 2015. Comparison of physiological activities of Radish Bud (*Raphanus sativus* L.) according to extraction solvent and sprouting period. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 549-556.
13. Ha, Y. B., Park. J. H., Jang. J. W., Lim. D. W. and Kim, J. E. 2016. Comparative study for anti-inflammatory and anti-obesity effect of fractions from leaf and stem of *Sasa borealis*. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med*. **30**, 229-235.
14. Hayes, A. J. and Markovic, B. 2002. Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol*. **40**, 535-543.
15. Hayes, A. J. and Markovic, B. 2003. Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. *Food Chem. Toxicol*. **41**, 1409-1416.
16. Hong, T. G., Lee, Y. R., Yim, M. H. and Hyun, C. N. 2004. Physiological functionality and nitrite scavenging ability of fermentation extracts from pine needles. *Kor. J. Food Preserv.* **11**, 94-99.
17. Hyun, M. R., Lee, Y. S. and Park, Y. H. 2011. Antioxidative activity and flavonoid content of *Chrysanthemum zawadskii* flowers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol*. **29**, 68-73.
18. Iqbal, S. and Bhanger, M. I. 2006. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *J. Food Composition Anal.* **19,** 544-551.
19. Jang, M. J., Rhee, S. J., Cho, S. H., Woo, M. H. and Choi, J. H. 2006. A study on the antioxidative, anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 21-27.
20. Jeong, H. R., Sung, M. S., Kim, Y. H., Ham, H. M., Choi, Y. M. and Lee, J. S. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **47**, 888-894.
21. Jung, Y. S., Eun, C. S., Jung, Y. T., Kim, H. J. and Yu, M. H. 2013. Anti-inflammatory effects of *Picrasma Quassioides* (D.DON) BENN leaves extract. *J. Life Sci.* **23**. 629-636.
22. Kang, H. W. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) singer. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1072-1078.
23. Kang, K. O. 2011. Physiological and antioxidant activities of green, oolong and black tea extracts. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **21**, 243-249.
24. Kim, H. K., Han, H. S., Lee, G. D. and Kim, K. H. 2005. Physiological activities of fresh *Pleurotus eryngii* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 439-445.
25. Kim, K. M., Park, M. H., Kim, K. H., Im, S. H., Park, Y. H. and Kim, Y. N. 2009. Analysis of chemical composition and *in vitro* anti-oxidant properties of extracts from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 58-64.
26. Kim, S. M., Cho, Y. S. and Sung, S. K. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **33**, 626-632.
27. Kim, S. M., Cho, Y. S., Sung, S. K., Lee, I. G., Lee, S. H. and Kim, D. G. 2002. Antioxidative and nitrite scavenging activity of pine needle and green tea extracts. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **22**, 13-19.
28. Kim, Y. S., Joung, M. Y., Ryu, B. S., Park, P. J. and Jeong, J. H. 2016. Anti-inflammatory activities of extracts from fermented *Taraxacum platycarpum* D. leaves using *Hericium erinaceum* mycelia. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 20-26.
29. Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J. and Jeong, J. H. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1205-1210.
30. Kim, Y. W., Zhao, R. J., Park, S. J., Lee, J. R., Cho, I. J., Yang C. H., Kim, S. G. and Kim, S. C. 2008. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-κB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br. J. Pharmacol*. **154**, 165-173.
31. Konczak, I., Zabaras, D., Dunstan, M. and Aguas, P. 2010. Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native australian herbs and spices. *Food Chem.* **122,** 260-266.
32. Lee, B. B., Park, S. R., Han, C. S., Han, D. Y. Park, E. J., Park, H. R. and Lee, S. C. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α-amylase and α-glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 405-409.
33. Lee, C. Y., Kim, K. M. and Son, H. S. 2013. Optimal extraction conditions to produce rosemary extracts with higher phenolic content and antioxidant activity. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 501-507.

34. Lee, H. J., Do, J. R., Kwon, J. H. and Kim, H. K. 2010. Physiological activities of *Cucurbita moschata* Duch. Extracts with different extraction conditions. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr*. **39**, 165-171.
35. Lee, H. J. and Lim, M. H. 2016. Antioxidation effect of lemongrass and maychang essential oil. *J. Kor. Soc. Cosm*. **22**, 319-326.
36. Leem, H. H., Kim, S. O., Seo, M. J. and Choi, S. W. 2011. Anti inflammatory effects of volatile flavor extract from herbal medicinal prescriptions including *Cnidium officinale* makino and *Angelica gigas* nakai. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **37**, 199-210.
37. Lee, S. G., Jeong, H. J., Lee, B. J., Kim, J. B. and Choi, S. W. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb mixtures. *Kor. J. Food Sci. Technol*. **43**, 200-205.
38. Lee, S. J., Chung, M. J., Shin, J. H. and Sung, N. J. 2000. Effect of natural plant components on the nitrite-scavenging. *J. Fd. Hyg. Safety* **15**, 88-94.
39. Maritim, A. C., Sanders, R. A. and Watkins, J. B. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidant: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol*. **17**, 24-38.
40. Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 12231-12234.
41. Oh, Y. L., Seo, Y. M. and Yang, H. O. 2011. Effect of rosemary extract on antioxidative activity and melanogenesis in cultured SK-MEL-3 cells. *Asian J. Beauty Cosmetol*. **9**, 247-256.
42. Park, C. S., Kim, D. H. and Kim, M. L. 2008. Biological activities of extracts from *Corni fructus, Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza uralensis. Kor. J. Herbology* **23**, 93-101.
43. Park, Y. G. 2016. Comparison of volatile components by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation extraction from Lemon myrtle (*Backhousia citriodora*). Th.M. dissertation, Korea University, Seoul, Korea.
44. Hyon, J. S., Kang, S. M., Senevirathne, M., Koh, W. J., Yang, T. S., Oh, M. C., Oh, C. K., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2010. Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* peels. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr*. **39**, 1-7.
45. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603-1616.
46. Saghazadeh, A., Hafizi, S. and Rezaei, N. 2015. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Int. Immunopharmacol*. **28**, 655-665.
47. Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M. and Ochi, H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical savenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 37-41.
48. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
49. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. and Mahajan, R. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases; a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol*. **7**, 65-74.
50. Wilkinson, J. M., Hipwell, M. Ryan, T. and Cavanagh, H. M. A. 2003. Bioactivity of *Backhousia citriodora*; Antibacterial and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem*. **51**, 76-81.
51. Yun, H. Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 291-316.

초록 : LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 레몬 머틀 잎 추출물의 항염증 효과

김판길[1,2] · 정경임[3] · 최영주[3] · 갈상완[1*]
([1]경남과학기술대학교 제약공학과, [2]김해대학교 임상병리과, [3]신라대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 레몬 머틀 잎 열수 및 에탄올 추출물을 이용하여 항산화 활성과 NO 소거능 및 RAW 264.7 세포에서의 항염증 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 레몬 머틀 열수 및 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 각각 207.44와 331.54 μg TAE/mg이었고, DPPH radical 소거능은 0.5 mg/ml 농도에서 각각 90.69%와 92.50%로 나타났으며, SOD 활성은 1 mg/ml 농도에서 각각 106.22%와 103.58%로 나타났다. 아질산염 소거능 분석에서는 열수와 에탄올 추출물 1 mg/ml 농도, pH 1.2에서 81.06%와 91.03%로 에탄올 추출물의 소거능이 높은 것으로 나타났다. 레몬 머틀의 항염증 활성을 측정하기 위하여 대식세포에 LPS를 처리하여 세포 내 NO 생성을 유도한 후 열수 및 에탄올 추출물을 처리하여 각각의 추출물이 NO 활성에 미치는 영향을 분석한 결과 각 추출물 모두 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 LPS에 의해 증가된 iNOS 단백질 발현 또한 농도 의존적으로 감소하였다. 이상의 결과에서와 같이 레몬 머틀 잎은 항산화 및 항염증 효과가 있는 것으로 나타났기에 천연물 소재로서의 활용도가 높을 것으로 생각된다.