

Comparative Analysis of Anti-oxidative, Anti-inflammatory, Anti-allergy, and Whitening Effects of Different Solvent Extracts from *Zizania latifolia*

Se-Ho Park¹, Jae-Yeul Lee¹ and Seun-Ah Yang^{2*}

¹Institute of Natural Science, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

²Major in Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

Received August 4, 2017 / Revised August 24, 2017 / Accepted August 24, 2017

This study was performed to evaluate the anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-allergy, and whitening effects of *Zizania latifolia* ethanol extracts prepared from 5 different ethanol concentrations (10, 30, 50, 70, and 90%). As the ethanol concentration in the extraction solvent was increased, the radical scavenging activities also increased. The inhibitory activity of *Z. latifolia* ethanol extracts on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells tended to increase as the content of ethanol increased. The highest inhibitory activity was obtained with 70% ethanol extract. The anti-allergy effects of *Z. latifolia* ethanol extracts were tested by measuring the release of β -hexosaminidase in IgE-sensitized RBL-2H3 cells. The suppressive effect of *Z. latifolia* ethanol extracts increased in a dose-dependent manner as the proportion of ethanol increased, except for the 10% ethanol extract. Furthermore, the inhibitory effects of *Z. latifolia* ethanol extracts against melanin production in α -melanocyte stimulated hormone (MSH)-stimulated B16F0 cells increased as the ethanol ratio increased, and 70 and 90% ethanol extracts showed similar inhibitory activities to arbutin, a positive control, at 250 μ m. The present study confirmed the efficacy of *Z. latifolia* ethanol extracts in various areas, demonstrating antioxidative, anti-inflammation, anti-allergy, skin protective, and skin whitening effects, with no cytotoxicity. It could be used as a raw material in functional foods, as well as in cosmetics.

Key words : Anti-allergy, anti-inflammation, anti-oxidative activity, skin-whitening, *Zizania latifolia*

서론

인체의 피부는 환경오염 및 자외선과 같은 외부의 자극에 노출되면 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)를 증가시켜 피부의 면역 기능 저하, 염증성 알러지 질환인 여드름, 아토피 피부염 유발 및 기미, 주름, 탄력 감소 등의 각종 기능 저하로 인한 피부노화를 촉진시킨다[2, 6, 21]. 피부에 흑갈색의 색소 물질을 형성하는 원인이 되는 멜라닌(melanin)은 피부가 자외선에 노출되면서 활성산소에 의해 멜라닌세포(melanocyte)에서 티로시나제(tyrosinase) 활성이 촉진되어 티로신(tyrosine)으로부터 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)와 DOPA-quinone을 거쳐 합성된다. 면역세포의 대표적인 염증 매개체인 nitric oxide (NO)는 생체 내에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 불안정하며 반응성이 높은 자유라디칼로서 혈관이완, 항암 등의 다양한 생리학적 활성을 갖지만 과량 생성될 경우 세포손상 및

염증반응을 유발한다[15]. 또한, 급만성 염증 및 알러지 반응을 조절하는 필수적인 세포인 비만세포의 표면에 발현하는 IgE 수용체인 FcεRI에 IgE 및 특이적 알레르겐이 결합하게 되면, 세포질 내 칼슘 농도의 증가와 탈립으로 인해 히스타민, interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-13, TNF- α 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 혈관을 확장시키고 혈관투과도를 증가시켜 가려움증, 발진 등의 알러지 반응을 일으킨다[8, 30]. 이러한 염증성 알러지 질환의 치료제로 소염제, 항히스타민제 또는 항류코트리엔제가 처방되어 사용되고 있으나, 일시적 증상 완화 효과와 더불어 다양한 부작용이 밝혀져 장기복용에는 많은 어려움이 있다. 또한, 노령화 인구 증가에 따른 건강한 노후에의 관심 증가로 인해 천연물 유래 물질을 이용하여 피부 항노화와 아토피 피부염 등의 염증성 질환에 효능이 있는 항염에 관한 최근의 많은 연구들이 있다[9].

고장초(*Zizania latifolia*)는 벼과(Gramineae)에 속하는 여러해살이 풀로 강가에 흔히 무리 지어 자라며 줄, 줄풀 또는 야생미(wild rice)이라고도 불린다. 한국, 일본, 베트남, 그리고 중국의 남부지역 등의 동아시아에 주로 분포하는 자생식물로, 우리나라의 경우 경북 영천과 경산, 경기도 화성, 그리고 충북 충주가 대표적인 산지이다. 고장초의 종자와 줄기는 식용 및 약용으로 민간에서 쌀 대신 사용하거나 차로 우려내는 형태로 오랫동안 사용되어 왔다. 고장초 종자의 당 대사 개선 및 항당뇨 효과[7], 항비만[26], 혈중 지질 개선 및 항산화능[20]이 보고

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5117, Fax : +82-53-580-5372

E-mail : seunahy@kmu.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.

되어 있으며, 줄기 추출물의 뇌세포 보호 효과[1], 항알러지[3, 12] 등이 알려져 있다. 또한, 줄기 추출물에서 활성성분으로 분리된 트리신 유도체들의 항염 및 항알러지 활성[13] 등이 최근 보고되었으나, 고장초의 높은 효능에도 불구하고 기능성 소재로의 활용을 위한 체계적인 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 오랫동안 민간에서 사용되어 안전성이 입증되었으며 최근 과학적으로 유효성이 알려지면서 관심이 높아지고 있는 고장초의 효율적인 활용을 위한 원료 제조 최적화 조건을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

Ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-diammonium salt (ABTS), sulfanilamide, N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (MTT), α -melanocyte stimulated hormone (α -MSH), phosphate buffer saline (PBS), lipopolysaccharide (LPS), L ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), PIPES, bovine serum albumin, wortmannin은 Sigma-aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였으며, sodium hydroxide, sodium nitrate, glucose, sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), magnesium chloride (MgCl₂), potassium persulfate, sodium citrate, disodium carbonate (Na₂CO₃), sodium carbonate anhydrate (NaHCO₃) Dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphoric acid는 Daejung Chemicals & Metals (Siheung-si, Korea)에서 구입하였으며, DNP-BSA, DNP-IgE는 Alpha diagnostic international (Texas, USA)에서 구입하였다.

고장초 추출물 제조 및 수율

본 실험에 사용된 고장초(*Zizania latifolia*, *Z. latifolia*) 추출물은 (주)비티씨(An-san Si, Korea)로부터 제공받았다. 건조된 고장초를 세절하여 1 kg을 칭량하여 10, 30, 50, 70, 90% ethanol 30 l를 혼합하여 80°C에서 6시간 동안 교반하고 1회 추출하였으며, 추출물을 부직포로 여과한 후 고속 추출 농축기를 이용하여 농축시킨 뒤 evaporator로 건조하여 분말 형태로 회수하였다. 회수한 추출물은 -20°C에서 보관하여 사용하였다. 실험 진행 시 추출물의 DMSO 최종 농도가 0.1%가 되도록 맞춰 사용하였다. 추출물의 수율은 추출 전 고장초 원물 무게에 대한 동결 건조 후 추출물 무게를 측정하여 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet 방법을 변형하여 측정하였다[24]. DPPH solution은 150 μ M 1,1-diphenyl-2-pic-

rylhydrazyl (DPPH)를 40 μ l를 각 농도별 추출물 160 μ l를 첨가한 후 실온에서 30분 암소 반응시켜 UV-visible spectrophotometer (V-550, JASCO, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg의 방법을 참고하여 측정하였다[4]. ABTS solution은 7 mM 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간 ABTS radical을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 732 nm에서 흡광도 값이 0.70이 되도록 희석하였다. 각 농도 별 추출물 20 μ l에 ABTS solution 180 μ l를 첨가한 후 상온에서 30분 암소 반응시켜 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

세포 배양

본 연구에 사용된 대식세포(RAW264.7)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, 비만세포(RBL-2H3)와 멜라닌 생성세포(B16-F0)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 실험하였다. 대식세포는 1% penicillin-streptomycin (Welgene, Daegu, Korea) 및 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Daegu, Korea)이 포함된 DMEM (Welgene, Daegu, Korea)를 사용하였으며, 비만세포는 1% penicillin-streptomycin 및 10% FBS (ATCC, Manassas, VA, USA)가 포함된 MEM (ATCC, Manassas, VA, USA)를 사용하였으며, 멜라닌 생성세포는 1% penicillin-streptomycin (Welgene, Daegu, Korea) 및 10% FBS (ATCC, Manassas, VA, USA)이 포함된 DMEM (ATCC, Manassas, VA, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다.

세포 생존율 측정

세포 생존율 측정을 위하여 96-well plate에 대식세포를 1.0 \times 10⁵ cells/well로, 24-well plate에 비만세포(2 \times 10⁵ cells/well), 멜라닌 생성세포(5 \times 10⁵ cells/well)를 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 고장초 추출물을 농도별로 첨가하여 24시간 처리하였다. 최종 농도가 5 μ g/ml이 되도록 MTT 용액을 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

산화질소(Nitric oxide, NO) 생성 측정

산화질소 생성에 대한 고장초 추출물의 효과를 알아보기

위하여 Griess reagent를 사용하여 NO의 생성량을 측정하였다[14, 17]. 먼저, RAW264.7 (1×10^5 cells/well)에 100 ng/ml의 LPS를 고장초 추출물(100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$)과 함께 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 각 실험군의 배지 100 μl 와 griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphtyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid]를 동량으로 혼합하고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 산화질소 생성량은 sodium nitrate (NaNO_3)를 표준으로 사용하여 검량선을 작성하여 계산하였다. Positive control로 iNOS의 활성을 저해함으로써 NO의 생성을 억제하는 저해제로 L-NAME (250 μM)을 사용하였다[27].

β -Hexosaminidase inhibition 측정

RBL-2H3 cell에서 고장초 추출물의 β -hexosaminidase 방출 억제 효과를 확인하였다[3, 30]. 먼저, RBL-2H3 세포를 24-well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 450 ng/ml의 DNP-IgE로 37°C에서 24시간 자극시킨 후, siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl_2 , 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)로 세척하고 siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl_2 , 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl_2 , 0.1% bovine serum albumin,

pH 7.2) 160 μl 를 첨가하여 37°C에서 20분간 배양하였다. 그 후 각 농도의 고장초 추출물(20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$)을 10분 동안 세포에 처리하고 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 DNP-BSA 20 μl 를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시켜 세포가 과립을 형성하도록 자극하였다. 그 후, 얼음 수조에 10분 동안 두어 반응을 중단시킨 후 상층액 50 μl 를 0.1 M citrate buffer (with 1 mM p-nitrophenyl-nacetyl- β -D-glucosaminide, pH 4.5) 50 μl 를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, stop buffer (0.1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 10.0) 100 μl 를 첨가하여 반응을 중단시키고 microplate reader (Spectramax Plus 384, Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 5 μM 의 wortmannin을 사용하였다.

Melanin production 측정

B16-F0 cell을 이용하여 고장초 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다[11, 18, 19]. 먼저, B16-F0를 6-well plate에 5×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 각 농도의 고장초 추출물(100, 500 $\mu\text{g/ml}$)과 함께 100 nM α -MSH를 혼합시킨 DMEM 배지를 처리한 후 48시간 동안 37°C, 5% CO_2 조건 하에 배양하였다. PBS를 사용하여 3회 세척 후, 6-well plate에 붙어 있는 멜라닌

Table 1. DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity of *Zizania latifolia* extracts

	DPPH radical scavenging			ABTS radical scavenging		
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Relative scavenging activity (%)	RC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Relative scavenging activity (%)	RC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
10% ZLE ¹⁾	50	18.71±1.08 ^{***}	228.85±16.23	25	45.32±0.79 ^{***}	53.11±1.71
	100	26.96±0.75 ^{***}		50	51.33±1.88 ^{***}	
	250	54.66±3.41 ^{***}		100	61.52±1.66 ^{***}	
30% ZLE ²⁾	50	26.80±1.27 ^{***}	179.48±12.15	25	47.00±0.19 ^{***}	42.30±0.65
	100	36.96±2.13 ^{***}		50	54.71±0.33 ^{***}	
	250	64.69±4.69 ^{***}		100	60.93±0.49 ^{***}	
50% ZLE ³⁾	50	27.04±1.94 ^{***}	123.78±9.59	25	48.39±0.24 ^{***}	40.44±0.20
	100	43.16±2.29 ^{***}		50	54.19±0.20 ^{***}	
	250	84.60±1.68 ^{***}		100	61.92±0.13 ^{***}	
70% ZLE ⁴⁾	50	31.03±3.87 ^{***}	97.36±4.28	25	47.30±0.80 ^{***}	39.36±0.99
	100	52.17±1.93 ^{***}		50	54.81±0.99 ^{***}	
	250	87.47±1.08 ^{***}		100	63.87±0.38 ^{***}	
90% ZLE ⁵⁾	50	33.81±0.74 ^{***}	84.62±1.13	25	48.11±0.49 ^{***}	35.42±0.66
	100	59.22±3.51 ^{***}		50	55.74±0.87 ^{***}	
	250	86.25±2.20 ^{***}		100	65.23±1.22 ^{***}	
Ascorbic acid	5	45.34±4.17 ^{***}	5.37±1.45	1	21.73±1.95 ^{***}	8.51±0.36
	10	64.02±1.39 ^{***}		5	38.48±1.66 ^{***}	
	20	81.29±1.32 ^{***}		10	53.28±2.73 ^{***}	

All values in Table 1 are mean \pm standard deviation. * values with a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by *t*-test, ** $p < 0.01$ by *t*-test *** $p < 0.001$ by *t*-test. ¹⁾10% ZLE: 10% EtOH, 80°C, 6 hr, ²⁾30% ZLE: 30% EtOH, 80°C, 6 hr, ³⁾50% ZLE: 50% EtOH, 80°C, 6 hr, ⁴⁾70% ZLE: 70% EtOH, 80°C, 6 hr, ⁵⁾90% ZLE: 90% EtOH, 80°C, 6 hr, RC₅₀: reduction concentration (50%).

세포를 떼어내고 원심분리(13,000 rpm, 10 mins)한다. 상등액을 제거하고 lysis buffer (1.0 N sodium hydroxide with 10% DMSO) 150 μ l를 넣어 멜라닌을 녹여 microplate reader로 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 tyrosinase의 활성을 억제함으로써 미백 효능을 가지는 250 μ M의 arbutin을 사용하였다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과에 모든 값은 3회 이상의 반복실험의 측정값의 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 실험 결과 값에 대한 통계적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며, *p*값이 0.05 이하이면 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

고장초 추출물의 수율 및 항산화 활성

고장초 추출물의 수율은 10% ethanol 사용 시 12.85%, 30% ethanol 사용 시 12.86%, 50% ethanol 사용 시 13.80%, 70% ethanol 사용 시 13.43%, 그리고 90% ethanol 사용 시 9.63%로 50% ethanol을 사용한 고장초 추출물에서 가장 높은 추출 수율을 보였으며, 가장 적은 수율을 보인 90% ethanol을 사용한 고장초 추출물 간 비교 시 3.8%의 수율 차이를 나타내므로, 상업적, 제품개발에 있어 사용하기 어렵다고 판단된다.

고장초 추출물의 항산화 활성은 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 측정하여 평가하였다. 고장초 추출물의 항산화 효능 결과, 추출 용매의 ethanol 함량이 증가함에 따라 DPPH 라디칼 억제능이 각각 100 μ g/ml에서 26.96%, 36.96%, 43.16%, 52.17%, 59.22%로 측정되었으며, ABTS 라디칼 소거능은 각각 50 μ g/ml에서 51.33%, 54.71%, 54.19%, 54.81%, 55.74%를 나타냄으로써 항산화능이 추출 용매의 ethanol 함량이 증가함에 따라 향상됨을 확인할 수 있었다(Table 1). 이는 고장초에 존재하는 성분이 항산화 효능을 가지며, 추출 용매의 함량이 증가함에 따라 추출되는 항산화 성분이 증가함을 나타낸다.

고장초 추출물의 항염증 활성

Nitric oxide (NO)는 대식세포가 LPS로 자극 될 때 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 발현되어 세포 외부로 NO를 생성하며, NO는 과산화질소 등의 활성산소 결합종에 의해 염증반응을 나타낸다[16]. 따라서 항염증 효능을 확인하는 biomarker로서 대식세포의 NO 생성 억제능을 측정하는 방법이 일반적이다. 고장초 추출물에 대한 RAW264.7 세포의 세포생존율은 MTT로 확인하였다(Fig. 1A). 고장초 추출 용매의 ethanol 함량에 따른 세포생존율은 10% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서 독성이 확인되었으나(500 μ g/ml 농도에서 78.26%의 세포생존율), 30, 50, 70, 90% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서는 세포독성이 나타나지 않았다. RAW264.7 세

포로부터 생성되는 NO에 대한 고장초 추출물의 억제효과를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다(Fig. 1B). LPS처리 후 NO의 생성량은 대조군에 비교하여 약 23배 이상 증가되었다. 고장초 추출 용매의 ethanol 함량별(100, 250, 500 μ g/ml)에 대한 NO 생성능 측정 결과, 모든 영역에서 농도의존적, 유의적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났으며, 250 μ g/ml 농도에서의 70% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서 8.64 μ M의 NO 생성으로 가장 좋은 항염증 효능을 나타냈다. 양성 대조군인 L-NAME에서는 세포 독성이 없었으며, NO 생성량은 대조군과 비교 시 약 81.4% 감소됨을 확인하였다.

고장초 추출물의 항알러지 활성

비만세포의 탈과립으로 과립 상태에서 존재하는 히스타민(histamine)과 β -hexosaminidase가 외부로 방출되며, 비만세포의 탈과립에 의해 알레르기 현상이 나타난다[5, 22]. β -hexosaminidase는 비만세포가 생물학적으로 활성화 될 때 히스타민과 함께 방출되는 biomarker로써 비만세포의 탈과립 지표로 알레르기 억제물질의 생물학적 측정에 이용되고 있다. 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 100 μ g/ml 이하의 농도에서 활성을 비교하였으며(Fig. 2A), DNP-IgE, DNP-BSA, wortmannin의 독성도 나타나지 않았다(data not shown). 고장초 추출물에 의한 β -hexosaminidase 방출 억제 효과를 Fig. 2B에 나타내었다. 고장초 추출 용매의 ethanol 함량(20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml)으로 처리한 세포에서 유리되는 β -hexosaminidase의 방출은 농도의존적, 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 그리고 고장초 추출 용매의 ethanol 함량이 증가함에 따라 β -hexosaminidase의 방출이 감소됨을 알 수 있었다. 10% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서는 β -hexosaminidase의 방출 억제가 보이지 않았는데, 이는 유기 용매에 추출된 성분이 적기 때문으로 판단된다. 비만세포 표면에 발현된 IgE 수용체인 Fc ϵ RI가 IgE 및 DNP-IgE와 결합함으로써 탈과립이 유도된다. 따라서, control로 DNP-IgE와 친화적으로 결합하는 DNP-BSA만 반응시킨 것으로, β -hexosaminidase 방출이 유도되지 않는다. 그리고 wortmannin은 β -hexosaminidase 방출을 억제하는 물질로써 positive control로 사용하였다.

고장초 추출물의 미백 효과

멜라닌은 자외선 등 외부 자극으로부터 피부 보호 역할을 수행하지만 기미, 주근깨 등 피부 미용에 좋지 않은 영향을 끼친다[28]. 본 연구에서는 B16-F0 세포를 이용하여 고장초 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 측정하였다. 고장초 추출 용매의 ethanol 함량별 세포 독성 결과, 모든 영역에서의 독성이 없었으며(Fig. 3A), α -MSH의 세포 독성 또한 존재하지 않았다(data not shown). B16-F0 세포 배양에서 기본배지만을 사용한 것을 control로 하고 100 nM의 α -MSH (melanocyte

stimulated hormone)만을 첨가한 것, 그리고 α -MSH를 첨가한 배지에 arbutin, 고장초 추출물을 다양한 농도(100, 500 $\mu\text{g/ml}$)로 첨가하였을 때 멜라닌 합성 저해 정도를 측정된 결과는 Fig. 3B와 같다. Melanogenesis stimulating agent인 α -MSH를 처리한 경우 control의 멜라닌 함량에 비해 약 10배 증가하였으며, 각 고장초 추출 용매의 ethanol 함량별 멜라닌 합성 억제 효과를 확인한 결과 농도의존적인 멜라닌 색소 생성 저해가 나타났다. 특히, 70, 90% ethanol로 추출한 고장초 추출물(500 $\mu\text{g/ml}$)에서 arbutin (250 μM)보다 약 4% 높은 멜라닌 합성 저해 효과를 보였다.

고찰

본 연구는 추출 용매의 ethanol 함량별 고장초 추출물의 다양한 생리 활성을 비교 검토한 것으로써, 항산화, 항염증, 항알러지, 미백 효과에 대한 최적 추출 조건을 검토하였다.

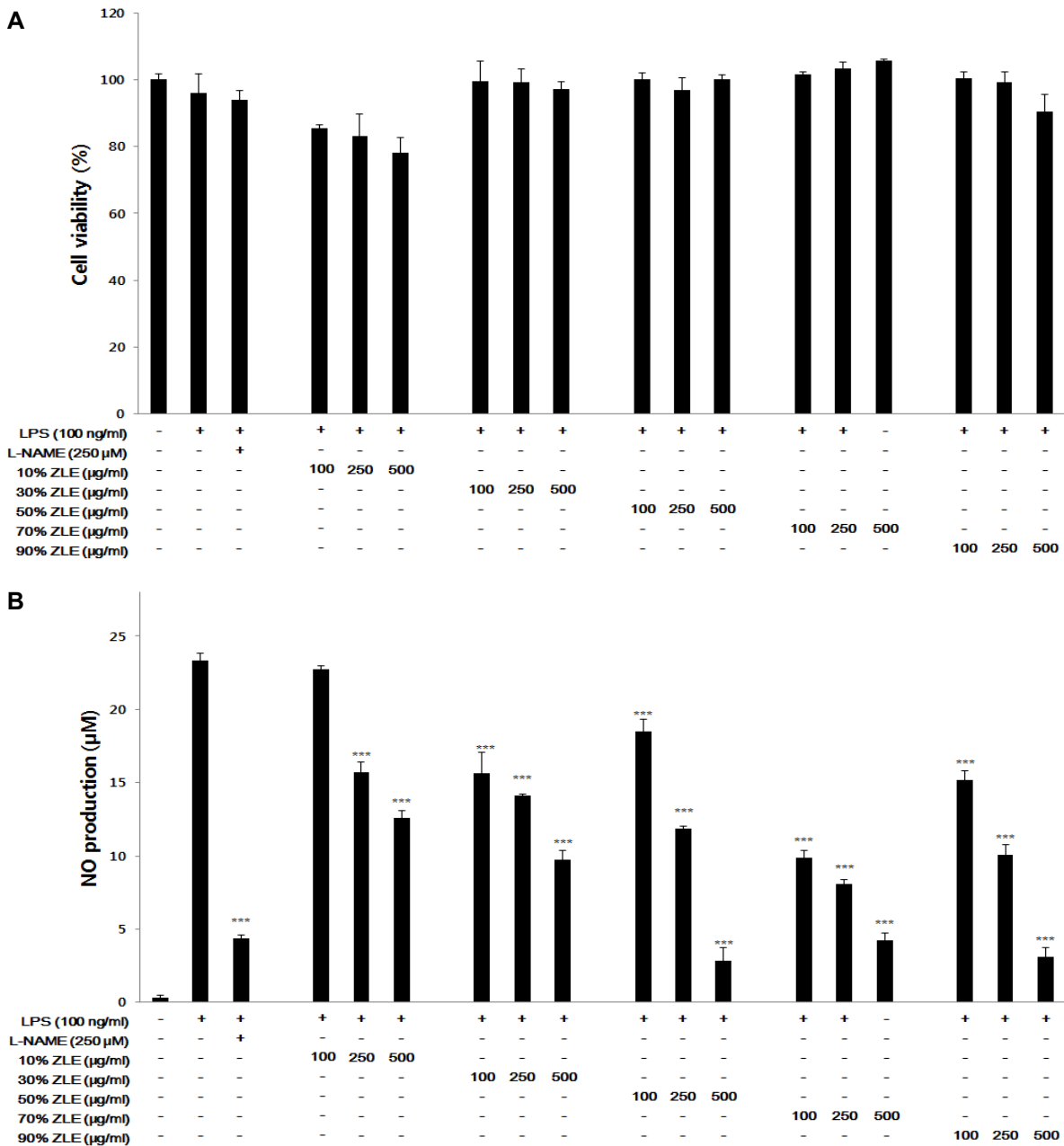


Fig. 1. Anti-inflammatory activity of *Z. latifolia* extracts depends on concentration, (A) cell viability of RAW264.7 macrophage by *Z. latifolia* extracts, (B) nitric oxide (NO) production of LPS-stimulated RAW264.7 macrophage by *Z. latifolia* extracts. The value represents mean \pm SD of three different experiments. L-NAME was used as a positive control ($p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$).

고장초의 추출 수율은 50% ethanol로 추출한 고장초 추출물과 70% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서 각각 13.80%, 13.43%로 가장 높은 수율을 나타냈으며, 90% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서 9.63%로 가장 낮은 수율을 보였다. 항산화 효능은 항염증, 항알러지, 미백과 연관이 있다는 논문에 기초하였으며[10, 23, 25], 고장초 추출 용매의 ethanol 함량에 대한 항산화 효능 결과, 추출 용매인 ethanol의 함량이 증가함에 따라 DPPH, ABTS 라디칼 소거능의 향상을 확인할 수 있었다.

추출 용매의 ethanol 함량 증가에 따른 고장초 추출물의 항염증 효능 평가 결과, 70% ethanol로 추출한 고장초 추출물의 항염증 효능이 가장 우수하였으며, 고장초 추출물의 항알러지 결과, 90% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서 가장 좋은 활성을 가졌다. 마지막으로 고장초 추출물의 미백 효능 결과, 70% ethanol로 추출한 고장초 추출물과 90% ethanol로 추출한 고장초 추출물에서의 활성이 유사하며 positive control인 arbutin과 비교 시 약 4% 낮은 멜라닌 생성 저해 효과를 확인

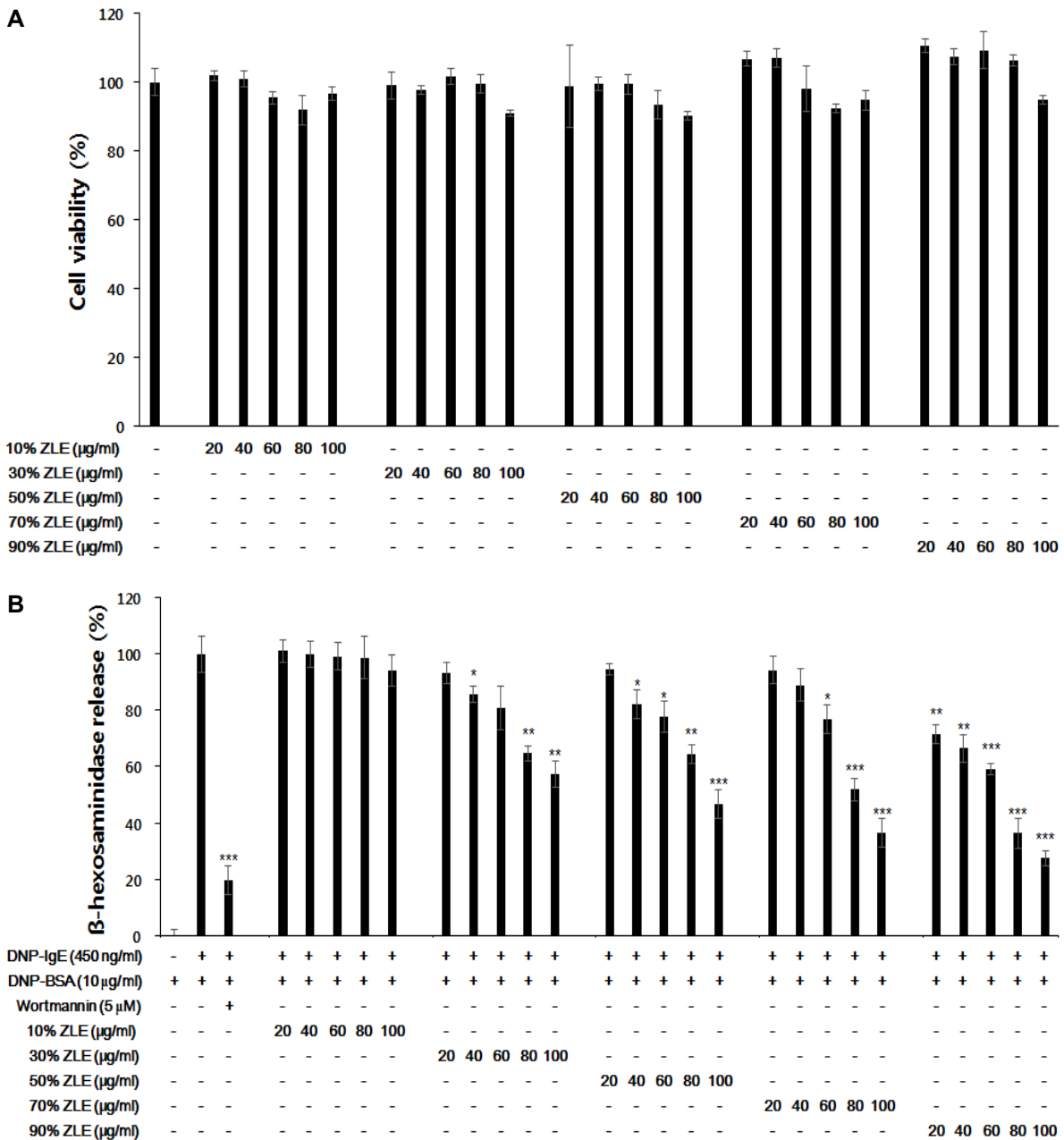


Fig. 2. Anti-allergic effects of *Z. latifolia* extracts, (A) cell viability of RBL-2H3 mast cell by *Z. latifolia* extracts, (B) β -hexosaminidase release of DNP-IgE-induced RBL-2H3 cells by *Z. latifolia* extracts. DNP-IgE stimulated degranulation of RBL-2H3 mast cell. The value represents mean \pm SD of three different experiments. Wortmannin was used as a positive control ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$).

할 수 있었다. 본 연구결과를 종합해 볼 때 효능 면에서는 90% ethanol로 추출한 고장초 추출물이 약간 우수한 경향을 나타냈으나, 제품 개발 및 산업화를 위한 경제적인 측면을 고려하면 수율이 높고 효능이 우수한 70% ethanol로 추출한 고장초 추출물을 사용하는 것이 타당하며, 특히 추출 수율과 항산화 효능(DPPH 라디칼 소거능) 간 상호관계 비교 결과, 10% ethanol 고장초 추출물에서 12.85, 30% ethanol 고장초 추출물은 16.46, 50% ethanol 고장초 추출물은 25.53, 70% ethanol 고장초 추출물에선 31.56, 그리고 90% ethanol 고장초 추출물은

26.00으로 산업적인 관점에서는 70% ethanol로 추출한 고장초 추출물이 합당하다고 판단된다. 향후 고장초 추출물은 민감성 피부염 또는 미백 개선 효능 등의 피부 항노화를 위한 식의약품 및 화장품 소재로서 활용 가치가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 계명대학교 연구기금으로 이루어졌음.

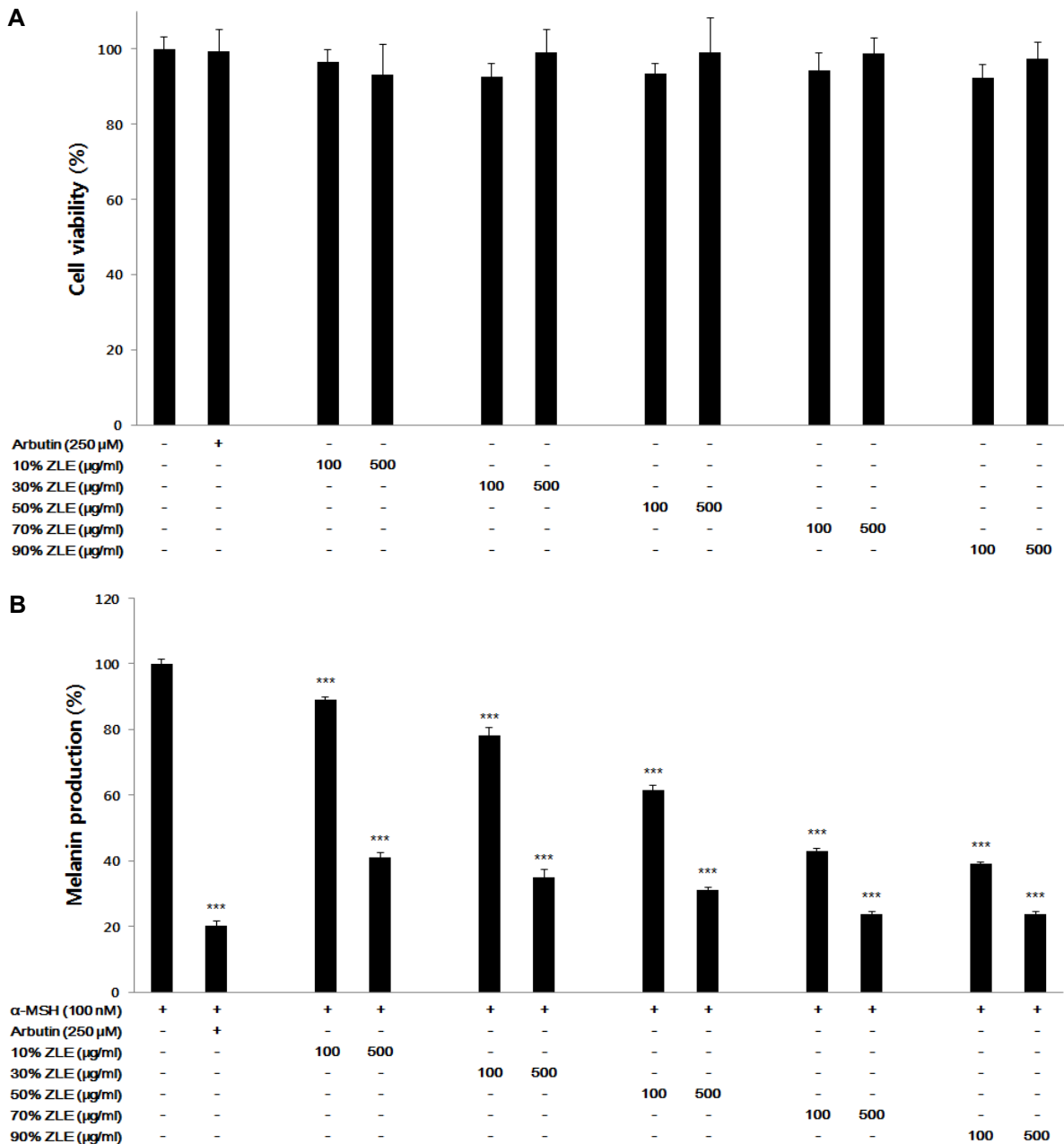


Fig. 3. Skin-whitening effect of *Z. latifolia* extract, (A) cell viability of B16-F0 melanocyte by *Z. latifolia* extracts, (B) melanin production of α-MSH-stimulated B16-F0 melanocyte cells by *Z. latifolia* extracts. The value represents mean±SD of three different experiments. Arbutin was used as a positive control (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$).

References

- Ahn, B. K., Kim, R., Choi, D. B. and Kim, Y. S. 2011. Effect of *Salicornia bigelovii* extract on the activities of whitening and anti-wrinkle. *Appl. Chem. Eng.* **22**, 56-60.
- Beaven, M., Rogers, J., Moore, J., Hesketh, T. R., Smith, G. and Metcalfe, J. 1984. The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 7129-7136.
- Bito, T. and Nishigori, C. 2012. Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. *J. Dermatol. Sci.* **68**, 3-8.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *Lebenson Wiss Technol.* **30**, 609-615.
- Han, J. and Yi, D. 2012. Effects of pine needles fermentation extracts on antioxidant activity and inhibition of melanin synthesis. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **10**, 619-624.
- Han, S., Zhang, H., Qin, L. and Zhai, C. 2013. Effects of dietary carbohydrate replaced with wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) on insulin resistance in rats fed with a high-fat/cholesterol diet. *Nutrients* **5**, 552-564.
- Han, S. F., Zhang, H. and Zhai, C. K. 2012. Protective potentials of wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) against obesity and lipotoxicity induced by a high-fat/cholesterol diet in rats. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 2263-2269.
- Hwang, I. S., Koh, E. K., Kim, J. E., Lee, Y. J., Kwak, M. H., Go, J., Sung, J. E., Song, S. H. and Hwang, D. Y. 2014. Effects of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Fruit Extract on Ultraviolet-induced Apoptosis of Skin Fibroblasts. *J. Life Sci.* **24**, 467-475.
- Itoh, T., Ninomiya, M., Yasuda, M., Koshikawa, K., Deyashiki, Y., Nozawa, Y., Akao, Y. and Koketsu, M. 2009. Inhibitory effects of flavonoids isolated from *Fragaria ananassa* Duch on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 5374-5379.
- Kataoka, M. and Takagaki, Y. 1995. Effect of the crude drugs (standards of natural drugs not in the JP XII) on beta-hexosaminidase release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Nat. Med.* **49**, 346-349.
- Kozina, L., Borzova, I., Arutiunov, V. and Ryzhak, G. 2013. Role of oxidative stress in skin aging. *Advances in Gerontology* **3**, 18-22.
- Kwon, M. J., Kim, B., Lee, Y. S. and Kim, T. Y. 2012. Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. *J. Dermatol. Sci.* **67**, 81-87.
- Lee, E. J., Whang, E. Y., Whang, K., Lee, I. S. and Yang, S. A. 2009. Anti-allergic effect of *Zizania latifolia* Turcz extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **41**, 717-721.
- Lee, E. J., Yu, M. H., Garcia, C. V., Jhee, K. H. and Yang, S. A. 2017. Inhibitory effect of *Zizania latifolia* chloroform fraction on allergy-related mediator production in RBL-2H3 cells. *Food Sci. Biotechnol.* **26**, 481-487.
- Lee, H. J., Hyun, E. A., Yoon, W. J., Kim, B. H., Rhee, M. H., Kang, H. K., Cho, J. Y. and Yoo, E. S. 2006. *In vitro* anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts. *J. Ethnopharmacol.* **103**, 208-216.
- Lee, H. J., Kim, N. Y., Jang, M. K., Son, H. J., Kim, K. M., Sohn, D. H., Lee, S. H. and Ryu, J. H. 1999. A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages. *Planta Med.* **65**, 104-108.
- Lee, M. H., Lee, J. M., Jun, S. H., Lee, S. H., Kim, N. W., Lee, J. H., Ko, N. Y., Mun, S. H., Kim, B. K. and Lim, B. O. 2007. The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. *J. Ethnopharmacol.* **112**, 49-54.
- Lee, S. S., Baek, Y. S., Eun, C. S., Yu, M. H., Baek, N. I., Chung, D. K., Bang, M. H. and Yang, S. A. 2015. Tricin derivatives as anti-inflammatory and anti-allergic constituents from the aerial part of *Zizania latifolia*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **79**, 700-706.
- Maeda, K. and Fukuda, M. 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**, 361-368.
- Maeda, H. and Akaike, T. 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry Mosc.* **63**, 854-865.
- Mahmood, M. S., Gilani, A., Khwaja, A., Rashid, A. and Ashfaq, M. 2003. The *in vitro* effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phytother. Res.* **17**, 921-924.
- Moore, P., Babbedge, R., Wallace, P., Gaffen, Z. and Hart, S. 1993. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 296-297.
- Park, W. H. and Cha, Y. Y. 2004. Inhibition effect of *Zizania latifolia* on apoptosis induced by H₂O₂ in Neuro2A cell. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **19**, 1062-1067.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
- Schroeder, J., Kagey Sobotka, A. and Lichtenstein, L. 1995. The role of the basophil in allergic inflammation. *Allergy* **50**, 463-472.
- Sung, J. H., Park, S. H., Seo, D. H., Lee, J. H., Hong, S. W. and Hong, S. S. 2009. Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **73**, 552-556.
- Tanaka, A., Zhu, Q., Tan, H., Horiba, H., Ohnuki, K., Mori, Y., Yamauchi, R., Ishikawa, H., Iwamoto, A. and Kawahara, H. 2014. Biological activities and phytochemical profiles of extracts from different parts of bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Molecules* **19**, 8238-8260.
- Yao, C. L., Lin, Y. M., Mohamed, M. S. and Chen, J. H. 2013. Inhibitory effect of ectoine on melanogenesis in B16-F0 and A2058 melanoma cell lines. *Biochem. Eng. J.* **78**, 163-169.
- Yodsauae, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C. and Tewtrakul, S. 2009. Anti allergic activity of principles from the roots and heartwood of caesalpinia sappan on anti-

gen induced β hexosaminidase release. *Phytother Res.* **23**, 1028-1031.

30. Zhang, H., Cao, P., Agellon, L. B. and Zhai, C. K. 2009. Wild

rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) improves the serum lipid profile and antioxidant status of rats fed with a high fat/cholesterol diet. *Br. J. Nutr.* **102**, 1723-1727.

초록 : 고장초 추출 용매의 에탄올 함량에 따른 항산화, 항염증, 항알러지, 미백 활성 비교 분석

박세호¹ · 이재열¹ · 양선아^{2*}

(¹계명대학교 자연과학연구소, ²계명대학교 식품가공학 전공)

본 연구에서는 고장초 줄기 ethanol 추출물 5종(10, 30, 50, 70, 90% *Z. latifolia* ethanol extract)에 대한 다양한 효능을 평가하여 원료제조를 위한 추출 조건을 최적화하고자 하였다. *Z. latifolia* ethanol extracts의 항산화능 평가 결과, ethanol의 함량이 증가함에 따라 DPPH 및 ABTS 라디칼에 대한 RC_{50} 값은 감소하여 소거능이 증가함을 확인하였다. *Z. latifolia* ethanol extracts의 항염증 평가 결과, ethanol의 함량이 증가함에 따라 lipopolysaccharide (LPS)로 처리한 RAW 264.7에서 nitric oxide (NO)의 생성 억제능이 농도의존적으로 증가되는 경향을 확인하였으며, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서의 NO 생성능 비교 시, 15.69, 14.13, 11.86, 8.64, 10.09 μM 로 70% *Z. latifolia* ethanol extract에서 가장 높은 NO 억제 활성을 나타냈다. *Z. latifolia* ethanol extracts의 항알러지 효능을 평가하기 위하여 RBL-2H3 세포를 IgE-항원으로 활성화 시킨 결과, 10% *Z. latifolia* ethanol extract의 β -hexosaminidase 방출 억제 효과는 나타나지 않았으나, 30% *Z. latifolia* ethanol extract부터 농도의존적으로 β -hexosaminidase의 방출 억제 효과를 확인할 수 있었다. 특히, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 추출물 처리 시 β -hexosaminidase 방출은 각각 94.20, 57.10, 46.70, 36.38, 27.45%로 90% *Z. latifolia* ethanol extract의 항알러지 활성이 가장 우수하였다. *Z. latifolia* ethanol extracts의 미백 효능 평가 결과, ethanol 함량이 증가함에 따라 멜라닌 생성 억제 효과도 증가함을 확인할 수 있었으며, 특히 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 70%, 90% *Z. latifolia* ethanol extracts의 멜라닌 생성 억제능은 양성대조군인 arbutin (250 μM) 과 비슷한 효과를 나타내었다. 본 연구 결과, *Z. latifolia* ethanol extracts는 세포 독성이 없으며 피부 보호 효능과 관련된 다양한 활성이 우수함을 확인하였다. 이러한 원료 제조 조건에 대한 활성 결과는 향후 피부건강을 위한 기능성 식품 원료 제조를 위한 기초 결과로 활용될 것으로 기대된다.