

큰개불알풀 추출물의 항산화 및 항염증 기능성 평가

박진천* · 남현화* · 난리** · 추병길***

The Functional Effects on Anti-oxidant and
Anti-inflammation of *Veronica persica* Poir. Extracts

Park, Jin-Cheon · Nam, Hyeon-Hwa · Nan, Li · Choo, Byung-Kil

Veronica persica (*V. persica*) is a perennial plant that is broadly distributed in Europe, Asia and so on. *V. persica* is used for pain about the lower abdomen and low back. The aim of this study was to investigate the anti-oxidant and anti-inflammatory effects of *V. persica* ethanol extract in LPS-induced RAW 264.7 cells. To evaluate the anti-oxidant activity, the DPPH and ABTS radical scavenging, total polyphenol and flavonoid contents, and reducing power activity were carried out. The DPPH and ABTS radical scavenging activity were evaluated as 72.0% and 73.0% at the concentrations of 200 and 500 µg/mL, respectively. Total polyphenol and flavonoid contents of *V. persica* extracts were measured as 65.22 mg/g and 43.82 mg/g at the concentration of 1 mg/mL. The reducing power activity measurement showed 53.0% activity at 1 mg/mL. The anti-inflammatory effects of the *V. persica* extract were evaluated in LPS induced RAW 264.7 cells. In the evaluation of cell viability by proliferation & cytotoxicity assay kit, the cytotoxicity of the extract was not confirmed at 0~800 µg/mL concentration. And the *V. persica* significantly inhibited NO production in a concentration dependent manner. The inhibition effects of NO in cell medium of *V. persica* was over 80% at 800 µg/mL. The *V. persica* also suppressed the expression of iNOS, COX-2, and phosphorylation of NF-κB and IκB-α proteins. These results indicate that the *V. persica* has anti-oxidant and anti-inflammatory effects by modulating NF-κB signaling pathways and can be used as natural functional materials.

Key words : anti-inflammatory, anti-oxidant, NF-κB, *Veronica persica*

* First author, 전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과

** 전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과

*** Corresponding author, 전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과(bkchoo@jbnu.ac.kr)

I. 서 론

우리 몸은 에너지를 얻기 위해 생화학적인 산화반응이 지속적으로 이루어지며 정상적인 세포 내 대사과정뿐만 아니라 외부의 요인으로도 hydrogenperoxide, hydroxyradical, superoxide와 같은 활성산소가 생성된다(Cha and Lee, 2004; Kim et al., 2016a). 과잉 생산된 활성산소는 생체 내 산화 스트레스를 유발하고 노화, 암, 동맥경화, 심장질환 등을 초래하며 이와 같은 질병을 예방하기 위해 다양한 치료제가 사용되고 있다(Hong et al., 2016). 현재 일반적으로 사용되고 있는 항산화제는 천연 항산화제와 합성 항산화제가 있으며 대표적인 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)과 butylated hydroxytoluene (BHT)은 장기간 복용할 경우 간 손상 및 발암물질과 같은 부작용을 동반할 수 있다(Chipiti et al., 2013).

선천성 면역반응인 염증은 외부 이물질이 우리 몸에 침입하거나 상처가 발생하였을 때 신체를 방어해주는 중요한 과정으로(Yoon et al., 2015) 발열 및 통증과 같은 증상을 수반하며 항상성 유지에 관여하는 대식세포에 의해 조절된다(Lee et al., 2015a; Lee et al., 2015b). lipopolysaccharide (LPS)의 자극으로 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 염증 매개인자를 분비하며 이 매개인자들은 각각 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 통해 생성된다(Leem et al., 2011). 이러한 염증성 단백질의 발현은 nuclear factor kappa-B (NF-κB) 신호 전달 경로에 의해 조절되며, LPS로 인해 활성화된 전사인자 NF-κB는 다양한 염증성 매개인자 발현을 유도한다(Sharif et al., 2007; Lawrence, 2009). 일반적으로 사용되고 있는 항염증제는 염증 세포의 활성 억제 및 염증성 단백질의 생성 억제를 중점으로 하고 있으며, 현재 사용되는 대부분의 염증 치료제는 비스테로이드계와 스테로이드계와 같은 합성 항염제가 사용되고 있다. 그러나 장기간 복용 시 소화불량 및 위·십이지장 궤양 및 출혈과 같은 증상을 유발할 수 있고 심하면 면역체계의 장애를 초래할 수 있다(Citterio, 2001; Seo et al., 2001; Sibi and Rabina, 2016). 이와 같은 이유로 식품 및 한약제로부터 천연 치료제를 얻기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며 천연 치료제는 비교적 안정적이고 다양한 생리활성 성분이 포함되어 있어 항산화 및 염증완화에 더 효과적으로 작용할 수 있다(Gautam and Jachak, 2009; Leem et al., 2011).

큰개불알풀은 현삼과에 속하는 두해살이 귀화식물로 원산지는 유럽, 서아시아 등이며 양지바른 밭이나 길가에서 흔히 볼 수 있다. 현재 큰개불알풀에 관한 생리활성 연구로는 큰개불알풀에서 추출한 페닐에타노이드와 이리도이드 계통의 글리코시드가 암 치료에 중요한 물질이라는 연구가 진행되었으며(Harput et al., 2002a), 당뇨병과 고혈압의 원인이 되는 효소를 농도 의존적으로 억제한다는 연구가 진행되었다(Sharifi-Rad et al., 2016). 또한 Harput 등(2002b)의 연구에서는 큰개불알풀 메탄올 추출물의 NO 생성 억제 활성이 보고된 바 있으나 큰개불알풀의 항산화 및 염증관련 생리활성에 관한 연구는 아직 미비한 실정이

다. 따라서 본 연구에서는 큰개불알풀 추출물에 대한 기본적인 생리활성을 정립하고자 항산화 및 항염증 활성 평가를 실시하였으며, 이러한 기능성 평가를 통해 천연물 소재 및 기능성 작물화의 가능성을 검토하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 채집

본 실험에서 사용한 큰개불알풀은 2017년 5월 전북 전주 일대에서 자생하는 전초를 채취하여 세척하였다. 세척한 후 45°C 에서 음건하였고, 건조된 시료를 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2. 추출용 시료

추출용 시료를 만들기 위해 분쇄한 시료 10 g에 70% ethanol 100 mL를 넣고 2시간씩 3회 반복하여 환류 추출하였다. 추출물을 filter paper와 suction을 이용하여 여과한 뒤 용액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, EYELA)를 사용하여 50~55°C 수온에서 감압농축 하였다. 이후에 농축된 용액을 초저온 냉동시킨 후 3~4일간 동결건조(fd5508, Ilshin)하였다. 건조가 완료된 시료는 -20°C 에 보관하여 측정 시료로 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다(Chon et al., 2012). 25 μ L의 시료와 10% folin-Ciocalteau's phenol reagent 500 μ L를 혼합하여 상온에서 5분간 방치시킨 후 7.5% sodium carbonate 500 μ L를 가하여 30°C incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Elisa (multiscan spectrum, thermo scientific, Vantaa, Finland)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량 측정을 위한 표준곡선은 gallic acid를 표준물질로 하여 작성하였고, 표준곡선에 의한 식으로 시료의 총 페놀 함량을 측정하였다.

4. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis변법을 사용하여 측정하였다(Kim et al., 2016b). 시료 300 μ L와 diethylene glycol 600 μ L를 첨가하여 잘 섞어준 후 상온에서 차광하여 5분간 방치하였

다. 이후에 농도 1N의 NaOH 10 μ L를 첨가하고 잘 혼합해준 다음 37°C incubator (SANTO, Sakata, Japan)에서 1시간 차광하여 보관하였다. 반응이 끝난 후에 Elisa를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin을 표준물질로 정하여 작성한 표준곡선을 이용하여 측정하였다.

5. DPPH radical 소거능 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능은 추출물의 DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하였다(Mathangi and Prabhakaran, 2013). Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 제조한 시료를 증류수로 희석하여 농도별로 제조하였고 시료와 0.2 mM DPPH 용액을 1:1 (v/v) 비율로 혼합하여 37°C incubator에 30분간 차광 상태로 방치하였다. 반응이 끝난 후 Elisa를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도에 따른 DPPH 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 시료 첨가구를 비교하여 백분율(%)로 나타내었고 양성 대조구로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능} = [(Ab-As)/Ab] \times 100$$

Ab : 무처리구의 흡광도 As : 시료첨가구의 흡광도

6. ABTS radical 소거능 측정

2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 라디칼 소거능은 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)용액을 ABTS: $K_2S_2O_8$ =2:1 (v/v)로 섞은 후 12~16시간 차광하여 반응시켜 양이온(ABTS+)을 형성시키고 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 (± 0.02)이 되도록 100% 에탄올로 희석하였다(Lee et al., 2015c). 48 well plate에 3반복씩 0.70 (± 0.02)의 흡광도 값을 맞춘 용액 900 μ L와 큰개불알풀 추출물 100 μ L를 첨가하여 상온에서 3분 동안 차광하여 보관한 후 Elisa를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS radical 소거능} = [(Ab-As)/Ab] \times 100$$

Ab : 무처리구의 흡광도 As : 시료첨가구의 흡광도

7. 환원력 측정

환원력은 Oyaizu (1986)의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 100 μ L와 0.2 M sodium

phosphate buffer (pH 6.6) 100 μ L를 혼합하여 상온에서 5분 동안 반응시킨 후 1% potassium ferrocyanide 100 μ L를 첨가하여 섞어준 다음 20분간 50°C에서 가열하였다. 이후 10% trichloroacetic acid 100 μ L를 가하여 동결화 한 다음 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 증류수 100 μ L, 상층액 100 μ L 및 0.1% ferric chloride 10 μ L씩 96 well plate에 가하여 Elisa를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 1 mM rutin을 사용하여 환원력을 측정하였다.

8. 세포배양

염증분석에 사용되는 대표적인 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, USA)로부터 구입하여 사용하였다. RAW 264.7 cell은 10% FBS와 1% penicillin (P/S) 100 U/mL + streptomycin sulfate (100 μ g/mL)가 들어있는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (SANTO, Sakata, Japan)에서 배양하였다.

9. 세포 생존율

큰개불알풀의 독성을 평가하기 위해 proliferation & cytotoxicity assay kit를 이용하였다. 96 well plate에 5×10^5 cells/mL를 seeding한 후 추출물을 100, 200, 400, 800 μ g/mL 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 반응시켰다. 2,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상층액을 분리한 다음 proliferation & cytotoxicity용액을 처리하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분 반응시킨 후 Elisa를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

10. NO 생성량

Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 대식세포 RAW 264.7 cell의 배양액 중에 존재하는 nitrite (NO₂)의 양을 Griess 반응을 이용하여 NO 생성량을 측정하였다. 96 well plate에 RAW 264.7 cell 5×10^5 cells/mL를 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 100, 200, 400, 800 μ g/mL 농도의 추출물을 처리하고 1시간 방치한 다음 LPS 1 μ g/mL을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 반응시키고, 다음으로 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine)에 기초하여 배양액 중의 NO를 분석하였다. 표준물질로 sodium nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cell이 생성한 NO의 양을 평가하였다.

11. Western blotting

LPS에 의해 활성화된 대식세포 RAW 264.7 cell에 존재하는 염증성 단백질 발현량을 측정하기 위해 western blotting을 수행하였다. Cell culture dish에 RAW 264.7 cell을 1×10^6 cells/mL을 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 400, 800 µg/mL 농도의 추출물을 처리하고 1시간 동안 방치한 다음 LPS 1 µg/mL를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 동안 반응시켰다. 이후에 배양액을 모두 제거하고 phosphate buffer saline (PBS)을 이용하여 washing 해준 뒤 scrapper로 세포를 수집한 후 4°C에서 4000 rpm 속도로, 3분 동안 원심분리 하였다. 수집한 cell에 lysis buffer를 첨가하여 단백질을 추출하였다(Kim et al., 2010). 추출된 단백질은 bio-rad protein assay reagent A and B (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 정량하였고, blue-buffer를 첨가하여 loading sample을 제조하였다. 각 sample은 running gel과 stacking gel을 이용하여 8% 및 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하였다. 분리된 gel을 membrane으로 transfer하였고 5% Skim-milk로 실온에서 1시간 30분 동안 blocking하였다. 이후에 1× phosphate buffer saline/Tween (PBST)을 이용하여 5회 세척 후 염증성 단백질(iNOS, COX-2), 전사인자(p-p65, p-IKba), house keeping gene (β -actin)의 1차 항체(Santa Cruz, CZ, USA)는 4°C에서 overnight 반응시켰다. 다음날 1×PBST로 5회 세척 후 실온에서 2차 항체(Santa Cruz, CZ, USA)를 2시간 반응시킨 후 1×PBST로 세척하였고 membrane을 X-ray films에서 발색시약 A, B를 1:1 (v/v)로 혼합하여 도포하고 Chemi Doc™ MP imaging system (Bio-Rad, California, USA)을 이용하여 관찰하였다.

12. 통계처리

모든 실험에 대한 결과는 3반복으로 측정하여 평균과 표준편차로 나타냈으며, 각 데이터의 통계 분석은 T-test를 사용하여 통계적 유의성을 나타내었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

다양한 구조와 분자량을 가지는 페놀성 화합물은 식물계에서 흔히 함유하고 있는 2차 대사산물 중 하나이다(Jun et al., 2009). 페놀성 화합물의 구조적 특징으로 방향족 고리에 Phenolic hydroxyl (OH)기를 소유하기 때문에 단백질 및 큰 분자들과 결합이 용이하며 활성

산소를 제거하는 항산화 물질로 잘 알려져 항산화, 항암 등과 같은 다양한 생리활성에 효과가 있다(Lee and Lee, 2016). Gallic acid를 표준물질로 하여 측정된 큰개불알풀 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 65.22 mg/g으로 측정되었다(Table 1). Harput 등(2011)의 연구에서는 큰개불알풀 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 82 mg/g 함유하고 있다고 보고된 바 있다.

2개의 방향족 고리와 3개의 링이 결합한 구조(C6-C3-C6)를 가지는 플라보노이드는 페놀성 화합물로 대부분 식물에서 합성되어 당과 결합된 배당체로 존재한다. 플라보노이드 화합물도 페놀성 화합물과 마찬가지로 활성산소종을 효과적으로 제거하는 능력이 뛰어나 항염 및 항암과 같은 생리활성을 가진다(Jeon et al., 2013). 큰개불알풀의 플라보노이드 함량을 측정한 결과 43.82 mg/g을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Table 1). 페놀성 화합물의 범주로 포함되는 플라보노이드는 대부분의 작물에서 페놀 함량이 플라보노이드 함량보다 더 높게 나온다는 연구 결과가 있으며 본 연구도 이와 비슷하게 총 페놀함량이 플라보노이드 함량보다 높게 나타났다(Joo, 2013).

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents (mg/g±SD) in *V. persica*

Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
65.22 ± 0.02	43.82 ± 0.00

2. DPPH 및 ABTS radical 소거능

DPPH radical 소거능은 전자공여작용에 의한 polyhydroxy 방향족 화합물 및 방향족 아민류 등이 환원되는 것을 지표로 평가하는 방법이다(Lee et al., 2015c). 안정적인 free radical의 형태인 DPPH는 항산화 물질과 반응하게 되면 전자를 내어주는 환원반응이 이루어지며 최종적으로 radical이 소멸된다. 이러한 과정에서 DPPH 고유의 짙은 자색이 노란색으로 변하게 되며 항산화 능력이 높을수록 탈색이 잘 이루어진다(Kim et al., 2016c). 큰개불알풀의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 표준물질인 ascorbic acid는 200 µg/mL 농도에서 79.6%의 소거능을 보였으며 큰개불알풀 추출물은 25, 50, 100, 200 µg/mL 순으로 농도 의존적으로 증가하여 각각 13.8%, 27.9%, 48.7%, 72.0%의 소거능을 나타냈고, 200 µg/mL 농도에서 ascorbic acid와 유사한 소거활성을 보였다(Fig. 1A). Harput 등(2011)은 큰개불알풀 메탄올 추출물의 154.49 µg/mL에서 DPPH radical에 대한 50% 이상의 억제율을 나타냈다고 보고하였다. 본 연구결과와 비교하였을 때 큰개불알풀 에탄올 추출물의 DPPH radical에 대한 소거활성이 메탄올 추출물에 비해 높은 것으로 확인되었다.

ABTS와 potassium persulfate를 어두운 곳에 함께 방치하면 청록색을 띠는 ABTS^{•+}을 형

성하며 이는 다른 물질들의 항산화 능력에 의해 radical이 소거되면서 청록색이 탈색되는 정도로 흡광도 값으로 나타내어 항산화 능력을 평가하는 방법이다(Sim et al., 2017). 본 실험에서 큰개불알풀 에탄올 추출물의 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 125, 250, 500 µg/mL에서 각각 24.3, 43.1, 73.9%로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1B). Youn 등(2015)과 Joo (2013)의 연구에서 여러 가지 약용작물들을 70% 에탄올로 추출하여 ABTS radical 소거능을 평가한 결과, 500 µg/mL 농도에서 갈근, 쇠비름, 참빗살나무의 ABTS radical 소거능이 각각 49, 30.31, 52.58%로 나타나 큰개불알풀이 다른 약용작물보다 같은 농도에서 다소 높은 ABTS radical 소거 활성을 나타내는 것으로 판단되었다.

3. 환원력

항산화 활성이 높으려면 다른 물질에 대한 환원능력이 높아야 하며 환원력은 항산화 활성을 측정하는 방법의 지표가 된다. 금속이온을 환원시켜 항산화 능력을 평가하는 reducing power activity는 환원력이 강할수록 짙은 녹색에 가까워 높은 흡광도 값을 가진다(Kim et al., 2015). 본 실험에서 rutin 1 mM을 표준물질로 하여 측정한 결과, 큰개불알풀의 환원력은 250, 500, 1000 µg/mL에서 농도 의존적으로 증가하여 각각 30.3, 36.5, 53.0%로 나타났다. 특히 항산화제로 쓰이는 표준물질 1 mM rutin (100%)과 비교하였을 때 큰개불알풀의 환원력은 1000 µg/mL 농도에서 50% 이상의 환원력을 나타냈다(Fig. 2).

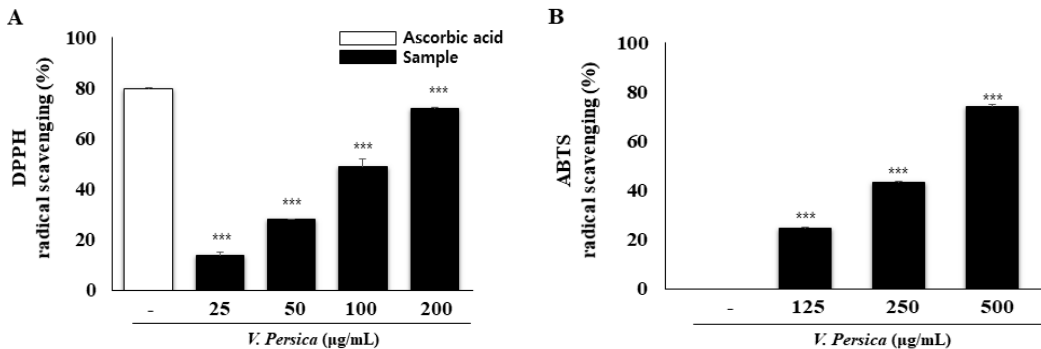


Fig. 1. Anti-oxidant activity of *V. persica* ethanol extracts by DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging. Each value is mean±SD of triplicate different at *** $p < 0.001$.

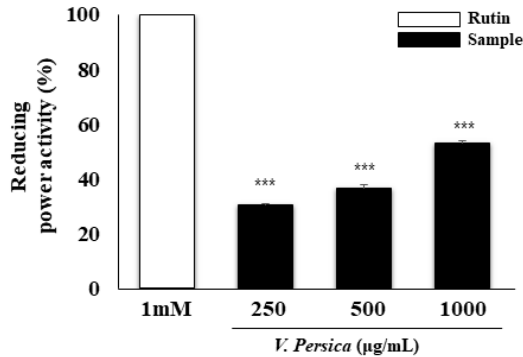


Fig. 2. Anti-oxidant activity of *V. persica* ethanol extracts by reducing power activity. Each value is mean±SD of triplicate different at *** $p < 0.001$.

4. 세포 생존율

큰개불알풀 추출물이 세포 생존율에 영향을 주는지 확인하기 위해 proliferation & cytotoxicity assay kit를 이용하여 독성평가를 실시하였다. 측정 결과 추출물 0, 100, 200, 400, 800 µg/mL 농도에서 RAW 264.7 cell 생존율이 모두 100% 이상으로 큰개불알풀 추출물은 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 3).

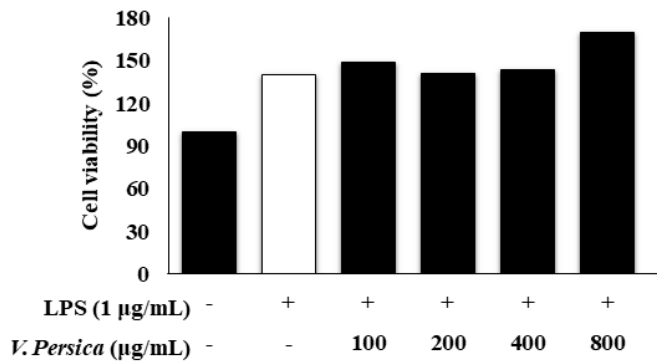


Fig. 3. Cell cytotoxicity of *V. persica* ethanol extracts on LPS-induced RAW 264.7 cells.

5. NO 생성량

적절한 수준의 NO 발현은 인체 내에서 면역반응, 신경전달, 혈관확장 등의 주된 생리적 역할을 수행하지만 과도한 NO 발현은 염증유발 및 조직손상을 야기하는 등 병리적 반응의 지표가 된다(Kim et al., 2016d). 큰개불알풀 추출물의 NO 생성 억제 활성을 평가하기 위해

대식세포인 RAW 264.7 cell에 염증유발 물질 LPS를 처리하여 cell에서의 NO 생성 정도를 측정한 결과, 정상군에 비해 LPS를 처리한 대조군에서 NO의 생성이 현저히 증가하였으며 LPS와 큰개불알풀 추출물을 함께 처리한 세포에서 농도 의존적으로 억제되어 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서 NO 생성이 각각 92.0, 86.9, 54.7, 12.9%로 억제되는 경향을 확인하였고 특히 800 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 80% 이상의 높은 억제율을 나타냈다(Fig. 4).

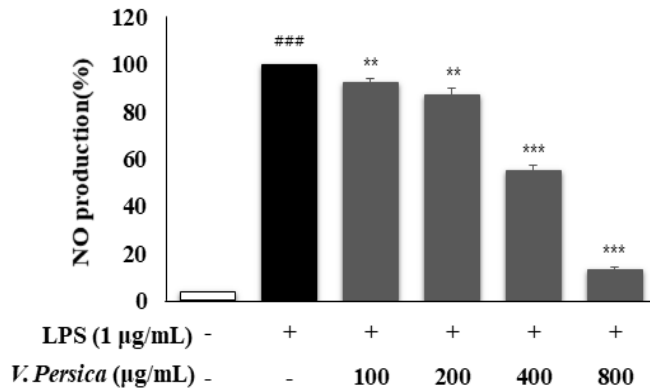


Fig. 4. NO production of *V. persica* ethanol extracts on LPS induced RAW 264.7 cells. Data are means \pm standard deviation; ### $p < 0.001$ compared with normal control.

*** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ compared with LPS control.

6. iNOS 및 COX-2 단백질 발현량

LPS에 의해 유도된 대식세포 RAW 264.7 cell에서의 염증반응은 다양한 인자들이 관여하며, 염증반응에서 NO 및 PGE_2 와 같은 매개물질이 분비되고 이는 염증성 단백질인 iNOS와 COX-2에 의해 발현된다. iNOS에 의한 NO의 과도한 생성은 염증을 유발하여 다양한 질병의 원인이 되고, 또 다른 염증촉진인자인 COX-2에 의한 PGE_2 의 생성 증가는 통증 및 발열과 같은 염증 반응을 촉진시킨다(Kim et al., 2017; Lee et al., 2017). 이에 본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 큰개불알풀 추출물 처리가 염증 반응물질 생성과 관련된 효소인 iNOS와 COX-2 단백질 발현량을 western blotting을 통해 확인하였다.

RAW 264.7 cell에 큰개불알풀 추출물을 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 처리한 뒤 LPS 처리와 함께 18시간 반응 후 단백질 발현 억제 효과를 측정한 결과는 다음과 같다. LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현량 측정 결과, LPS 처리군에서 무처리군에 비해 유의하게 발현이 증가하였고 큰개불알풀 추출물을 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때 농도가 증가할수록 iNOS 발현량이 유의하게 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 5A). 또한 PGE_2 합성에 영향을 미치는 COX-2의 발현량은 LPS만 처리한 세포에서 무처리군에 비해 30배 이상 발현이 증가하였는데 큰개불

알풀 추출물을 400, 800 µg/mL으로 처리하였을 때 발현량이 각각 27, 23배로 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 따라서 큰개불알풀 추출물은 LPS로 활성화된 대식세포 RAW 264.7 cell에서 NO 생성 및 iNOS와 COX-2 염증성 단백질 발현 억제를 통해 항염증 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

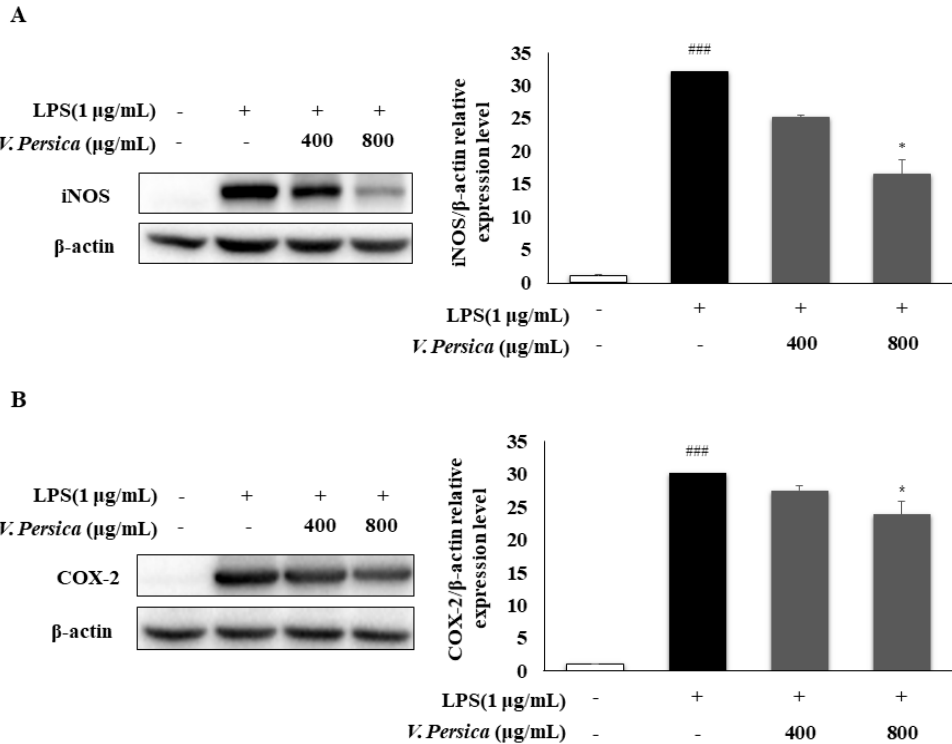


Fig. 5. Inhibitory effect of *V. persica* ethanol extracts on iNOS (A) and COX-2 (B) proteins expression in LPS induced RAW 264.7 cells. Data are means ± standard deviation; ^{###} $p < 0.001$ compared with normal control and ^{*} $p < 0.05$ compared with LPS control.

7. p-NF-κB p65 및 p-IκB-α 단백질 발현량

염증성 매개물질 발현에 중요한 신호전달체계인 NF-κB p65는 염증반응을 유도하는 전사인자로서 보통 세포질에 IκB-α와 단백질 복합체를 이루어 존재하지만 LPS 및 박테리아 등과 같은 외부자극에 의해 활성화 되면 IκB-α가 인산화 되어 복합체 분리가 일어나고 인산화 된 NF-κB p65는 세포질에서 핵 내로 이동하여 iNOS와 COX-2와 같은 염증성 단백질의 전사를 촉진시킨다(Jeon and Kwon, 2016; Kim and Kim, 2016). 본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW

264.7 cell에서 큰개불알풀 추출물에 의한 전사인자 p-NF- κ B p65와 p-I κ B- α 의 발현량 변화를 측정하였다. p-p65와 p-I κ B- α 의 발현량을 확인한 결과 p-p65의 발현량은 LPS를 처리한 실험군에서 1.4배 정도 증가하였고 큰개불알풀 추출물을 400, 800 μ g/mL로 처리하였을 때 각각 1.2, 1.0배로 농도 의존적으로 발현량이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6A). 또한 p-I κ B- α 의 발현량은 무처리구에 비해 LPS를 처리한 실험군에서 1.21배의 발현량을 나타내었고, 큰개불알풀 추출물을 400, 800 μ g/mL로 처리하였을 때 각각 1.18, 1.11배로 농도 유의하게 발현량이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 6B).

이러한 결과로부터 큰개불알풀 추출물의 유의적인 항산화 능력을 검정할 수 있었고, LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서 독성 없이 전사인자 NF- κ B의 활성 조절을 통해 염증성 단백질 iNOS와 COX-2의 발현, 염증매개인자 NO의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

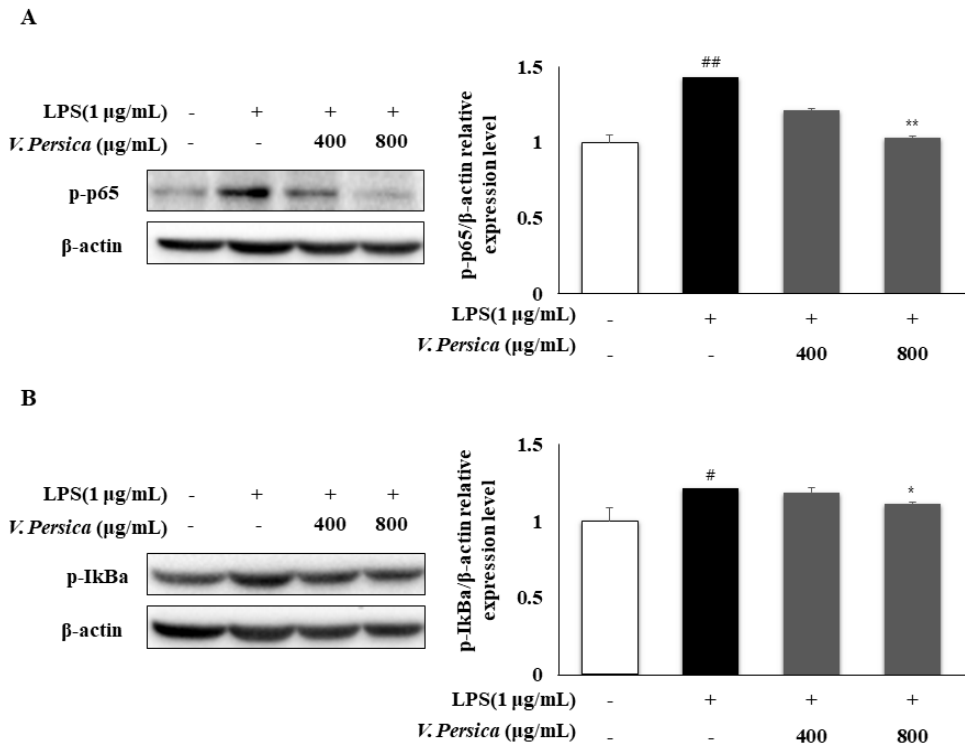


Fig. 6. Inhibitory effect of *V. persica* ethanol extracts on p-p65 (A) and p-I κ B- α (B) proteins expression in LPS induced RAW 264.7 cells. Data are means \pm standard deviation; ## p <0.01 and # p <0.05 compared with normal control. ** p <0.01 and * p <0.05 compared with LPS control.

Ⅵ. 적 요

본 연구는 큰개불알풀 에탄올 추출물의 항산화 활성과 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 항염증 활성 효과를 확인하기 위하여 수행되었다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과 추출물 1 mg/mL의 농도에서 각각 65.22 mg/g, 43.82 mg/g 함유하고 있음을 확인하였고 DPPH와 ABTS radical 소거능 측정 결과, 농도 의존적으로 소거능이 증가하였고 200 µg/mL, 500 µg/mL 농도에서 72.0%, 73.9%의 소거활성을 확인하였다. 환원력 측정 결과에서도 큰개불알풀 추출물의 환원력은 농도 의존적으로 증가하였고, 1000 µg/mL 농도에서 53.0%의 환원력을 나타내었다. 세포독성 측정을 위한 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell 세포생존율 측정 결과, 큰개불알풀 추출물 0~800 µg/mL에서 세포독성이 나타나지 않았으며, NO 생성 억제활성은 추출물 800 µg/mL 농도에서 NO 생성량이 80% 이상 억제됨을 확인할 수 있었다. 염증성 단백질인 iNOS와 COX-2 발현량을 측정된 결과, 모두 농도 의존적으로 억제되는 경향을 보였고, 특히 iNOS는 800 µg/mL 농도에서 LPS 처리군에 비해 50% 정도 억제되었다. LPS로 인한 NF-κB p65와 복합체 단백질인 IκB-α의 인산화 수준 또한 농도 의존적으로 억제되었으며, 특히 인산화 된 NF-κB p65는 800 µg/mL 농도에서 정상군과 같은 발현량을 보였다. 이와 같이 큰개불알풀 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성의 생리활성 평가를 통해 천연 기능성 소재로서 활용 가능성을 확인하였으며 추후 생리활성을 나타내는 유효성분 탐색 및 분리 연구가 필요할 것으로 판단된다.

[Submitted, August. 29, 2018 ; Revised, September. 17, 2018 ; Accepted, September. 21, 2018]

References

1. Cha, B. C. and E. H. Lee. 2004. Antioxidant and antiinflammation activities of *Prunus persica* tree extracts. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 12(4): 289-294.
2. Chipiti, T., M. A. Ibrahim, N. A. Koorbanally, and M. S. Islam. 2013. In vitro antioxidant activities of leaf and root extracts of *Albizia antunesiana* harms. Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research. 70(6): 1035-1043.
3. Chon, S. U., C. H. Bae, and S. C. Lee. 2012. Antioxidant and Cytotoxic Potentials of Methanol Extracts from *Taraxacum officinale* F. H. Wigg. at Different Plant Parts. Korean Journal of Plant Resources. 25(2): 232-239.
4. Citterio, F. 2001. Steroid side effects and their impact on transplantation outcome Transp-

- lantation. 72(12 Suppl): S75-80.
5. Gautam, R. and S. M. Jachak. 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. Medicinal research reviews. 29(5): 767-820.
 6. Harput, U. S., I. Saracoglu, M. Inoue, and Y. Ogihara. 2002a. Phenylethanoid and iridoid glycosides from *Veronica persica*. Chemical and pharmaceutical bulletin. 50(6): 869-871.
 7. Harput, U. S., I. Saracoglu, M. Inoue, and Y. Ogihara. 2002b. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of five Veronica species. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 25(4): 483-486.
 8. Harput, U. S., Y. Genc, N. Khan, and I. Saracoglu. 2011. Radical Scavenging Effects of Different Veronica Species. 5(2): 100-107.
 9. Hong, I. P., S. O. Woo, S. M. Han, S. G. Kim, H. R. Jang, M. Y. Lee, Y. S. Choi, H. K. Kim, and M. L. Lee. 2016. Evaluation of Nutritional Potential and Antioxidant Activity of *Oryza sativa* (Rice) Pollen Collected by Honey Bee, *Apis mellifera*. Journal of Apiculture. 31(3): 219-225.
 10. Jeon, H. J. and H. J. Kwon. 2016. Anti-inflammation Effect of *Gynura Procumbens* extract. Journal of Digital Convergence. 14(10): 515-520.
 11. Jeon, S. M., S. Y. Kim, I. H. Kim, J. S. Go, H. R. Kim, J. Y. Jeong, H. Y. Lee, and D. S. Park. 2013. Antioxidant activities of processed Deoduck (*Codonopsis lanceolata*) extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 42(6): 924-932.
 12. Joo, S. Y. 2013. Antioxidant activities of medicinal plant extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 42(4): 512-519.
 13. Jun, D. H., J. T. Lee, S. J. Cheon, C. E. Lee, T. H. Kim, D. H. Lee, J. G. Han, and S. H. Kim. 2009. Polyphenol and anti-oxidant effects of *Kalopanax septemlobus* Koidz. leaf extracts. Korean Journal of Plant Resources. 22(4): 343-348.
 14. Kim, B. H., Y. T. Lee, and K. H. Kang. 2010. *Codonopsis Lanceolata* Inhibits Inflammation through Regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 24(1): 80-84.
 15. Kim, G. H., N. Y. Kim, S. H. Kang, and H. J. Lee. 2015. Phytochemicals and Antioxidant Activity of *Codonopsis lanceolata* Leaves. Korean Journal of Food Science and Technology. 47(5): 680-685.
 16. Kim, H. R., G. N. Park, B. K. Jung, W. J. Yoon, Y. H. Jung, and K. S. Chang. 2016a. Antioxidant Activity of Solvent Fractions from *Distylium racemosum* in Jeju. Korean Journal of Clinical Laboratory Science. 48(2): 62-67.
 17. Kim, M. G., M. S. Oh, J. S. Jeon, H. T. Kim, and M. H. Yoon, MH. 2016b. A Study on

- Antioxidant Activity and Antioxidant Compound Content by the Types of Tea. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 31(2): 132-139.
18. Kim, M. H., E. J. Jeong, and Y. S. Kim. 2016c. Studies on the Antioxidative Activities and Active Components of the Extracts from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 31(2): 119-125.
 19. Kim, M. J., J. H. Kim, H. D. Choi, S. H. Park, S. Y. Park, M. J. Kim, and D. H. Ahn. 2016d. Anti-Inflammatory Effect of Dichloromethane Fraction from *Katsuwonus pelamis* Heart in LPS-Induced Raw 264.7 Cells and Mouse Models. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*: 452-452.
 20. Kim, M. J., K. B. W. R. Kim, S. H. Park, S. Y. Park, H. D. Choi, J. S. Choi, M. R. Jang, M. H. Im, and D. H. Ahn. 2017. Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract from *Polyopes affinis* through Suppression of NF- κ B and MAPK Activation in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 46(5): 537-544.
 21. Kim, M. K. and D. Y. Kim. 2016. Anti-inflammatory Effect of an *Ecklonia cava* Ethanol Extract in Macrophage via Inhibition of the NF- κ B/MAPK Signal Pathways. *Journal of Chitin Chitosan*. 21(4): 236-241.
 22. Lawrence, T. 2009. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1(6): a001651.
 23. Lee, J. Y., D. H. Yoo, and J. W. Chae. 2017. Inhibitory Effect of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai) Extract on the mRNA and Protein Expression of iNOS and COX-2 in Raw 264.7 Cells. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 45(2): 178-183.
 24. Lee, J. Y., Y. R. Cho, E. K. Ahn, C. G. Seo, J. K. Kim, D. W. Seo, and J. S. Oh. 2015c. Anti-oxidant effect of *Ligularia fischeri* ethanol extracts from district areas in Korea. *Food Engineering Progress*. 19(4): 320-328.
 25. Lee, S. G., D. J. Jo, H. J. Chang, and H. Kang. 2015a. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from *Aralia continentalis* Kitagawa. *Journal of Naturopathy*. 4(2): 10-14.
 26. Lee, S. H. and S. O. Lee. 2016. Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Lentil Extracts from Different Cultivars. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 45(7): 973-979.
 27. Lee, S. M., L. Li, J. H. Sung, J. W. Yang, Y. H. Kim, H. S. Jeong, and J. S. Lee. 2015b. Anti-inflammatory Activities of Methanolic Extracts from Different Rose Cultivars. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 28(4): 551-557.

28. Leem, H. H., E. O. Kim, M. J. Seo, and S. W. Choi. 2011. Anti-inflammatory effects of volatile flavor extract from herbal medicinal prescriptions including *Cnidium officinale* Makino and *Angelica gigas* Nakai. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 37(3): 199-210.
29. Mathangi, T. and P. Prabhakaran. 2013. DPPH free radical scavenging activity of the extracts of the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* Linn. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(10): 534-536.
30. Seo, Y. I., S. H. Park, D. J. Min, W. U. Kim, J. K. Min, S. H. Lee, Y. S. Hong, C. S. Cho, and H. Y. Kim. 2001. Effects of rebamipide against nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) induced gastroduodenal mucosal injury. *The Journal of the Korean Rheumatism Association*. 8(2): 73-80.
31. Sharif, O., V. N. Bolshakov, S. Raines, P. Newham, and N. D. Perkins. 2007. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC immunology*. 8(1): 1.
32. Sharifi-Rad, M., G. Tayeboon, J. Sharifi-Rad, M. Iriti, E. Varoni, and S. Razazi. 2016. Inhibitory activity on type 2 diabetes and hypertension key-enzymes, and antioxidant capacity of *Veronica persica* phenolic-rich extracts. *Cellular and Molecular Biology*. 62(6): 80-85.
33. Sibi, G. and S. Rabina. 2016. Inhibition of Pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella Vulgaris* extracts. *Pharmacognosy research*. 8(2): 118.
34. Sim, M. O., H. J. Lee, J. H. Jang, H. E. Lee, H. K. Jung, T. M. Kim, J. H. No, J. Jung, D. E. Jung, and H. W. Cho. 2017. Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai in RAW 264.7 Cells. *Korean Journal of Plant Research*. 30(4): 335-342.
35. Yoon, Y. I., J. S. Hwang, M. A. Kim, M. Y. Ahn, Y. B. Lee, M. S. Han, T. W. Goo, and E. Y. Yun. 2015. Inhibition of Inflammation by *Popillia flavosellata* Ethanol Extract in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Life Science*. 25(9): 993-999.