한국식생활문화학회지 33(2): 104-111, 2018
J. Korean Soc. Food Cult. 33(2): 104-111, 2018
본 논문의 저작권은 한국식생활문화학회에 있음.
Copyright © The Korean Society of Food Culture

ISSN 1225-7060(Print)
ISSN 2288-7148(Online)
https://doi.org/10.7318/KJFC/2018.33.2.104

버드나무(*Salix Koreensis* Andersson) 가지 추출물의 항산화 및 항염증 효과

김 미 혜*
호서대학교 생명보건대학 식품영양학과 및 기초과학연구소

Antioxidant Activity and Anti-inflammatory Effects of *Salix Koreensis* Andersson Branches Extracts

Mi-Hye Kim*
Department of Food and Nutrition, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University

Abstract

This study aims to compare and analyze a willow tree (*Salix Koreensis* andersson) extract's antioxidant and anti-inflammatory activity by investigating its: total polyphenol, flavonoid content, SOD-like activity, DPPH vitality. the willow tree was induced with LPS to determine its active anti-inflammatory effects. as a result, the willow methanol extract showed a higher total polyphenol and flavonoid content than those of willow distilled water extract, but the willow distilled water extract showed a higher SOD than that of willow methanol extract. in its DPPH scavenging ability, the willow methanol extract's antioxidant activity was higher than that of the willow distilled water extract. the willow extract's measurements such as the production of NO, inflammatory cytokine (TNF-α, IL-6 measurement) were significantly reduced as its concentration level went down. according to the research outcomes, when induced, he will extract's macrophage produces mediator-like substances such as NO and inflammatory cytokine that can be used to alleviate the inflammatory response. therefore, the willow tree proved to be a useful raw plant material for the products designed to combat inflammatory activities due to its natural antioxidant and anti-inflammatory response substances such as NO and cytokine.

Key Words: *Salix Koreensis* andersson, SOD-like activity, anti-inflammatory effects, anti-oxidative effects, raw 264.7 macrophages

I. 서 론

버드나무(Salix Koreensis Anderss)는 우리나라 대부분의 하천변에 생육하고, 전세계에 약 300-500종이 분포하고 있다(Lee et al. 2001). 하천식생으로서 생태환경의 중요한 위치를 가지고 있기도 한(Ahn et al. 2001) 버드나무는 전통적으로 음식 섭취 후 잇솔질에 이용하여 구강을 청결히 유지 하였고, 구강염증, 치아우식예방에 사용되었다(Park 2006). 버드나무의 강인한 생명력 때문에 특정 지역을 상징하기도 하고, 충무공 일화에 등장하여 주인공의 불굴의 의지를 부각시키는 향토음식으로 개발되어 스토리텔링 소재가 되기도 하였다(Kim & Chung 2010). 버드나무는 고대부터 해열제, 진통제, 염증 치료제로 사용 되어졌다(Du et al. 2007; Freischmidt et al. 2012). 또한 버드나무 가지는 식품의약품 안전처의 식품공전에 수록되어 식품 활용 가능성이 커지고 있다(Ministry of food and drug safety). 최근 인공첨가물에 대한 거부감으로 자연 추출물에 대한 관심이 높아지면서 버드나무, 느릅나무, 은행나무 등의 추출물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 버드나무의 항산화력(Alam et al. 2006), 염증치료 효과(Li et al. 2008), 비만과의 관련성(Han et al. 2003), 특히 암을 치료하는 효과(Sultana & Saleem 2003)까지 보고되면서 버드나무 잠재적 가능성이 더욱 커지고 있다. 버드나무에는 페놀화합물과 플라보노이드 등의 기능성 물질이 다량 함유되어 있기 때문이다.

항산화물질(antioxidant)은 대사과정 중 생성되는 여러 활성 산소종($^1O_2$, H_2O_2, OH)에 의한 지질의 과산화반응을 억제하여 동맥경화, 심혈관계 질환, 염증, 당뇨, 및 노화를 예방해 줄뿐만 아니라 불포화지방산의 자동산화에 의해 생성되는 과산화물을 억제하여 식품산패를 억제해 주는 천연항산화제로 크게 각광을 받고 있다(Halliwell & Gutterigde 1996; Emerit & Chaudiere 2008). 식품 가공 산업이 발달하면서 항산화제 수요는 급증하나, 합성 항산화제 사용은 독

*Corresponding author: Mi-Hye Kim, Department of Food and Nutrition, Hoseo University, Hoseo ro 79-20, Asan, Chungnam 31499, Korea
Tel: 82-41-540-9663 Fax: 82-41-548-0670 E-mail: Kimmihye92@hoseo.edu

성 등의 문제가 제기되고 있어, 안전하면서 효과적인 천연 항산화제 사용 요구가 커지고 있다(Branen 1975; Ito et al. 1985). 염증은 생체 조직에 감염, 화학 물질 등의 자극에 대한 방어기전으로 지속적인 염증 반응은 조직 점막을 손상시켜 관절염, 동맥경화증 및 암 등을 발생시킨다(Liao et al. 2011). 염증성 cytokine, nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2) 등은 체내 염증반응 시 분비되는 대표적 염증 매개 물질들이다. 일반적으로 NO은 박테리아 사멸, 종양 제거 등 면역반응의 역할을 한다(Moncada et al. 1991). 그러나 lipopolysaccharide(LPS)나 염증성 cytokine (TNF-α, IL-6) 등에 의해 발현이 유도된 과다한 NO 생성은 염증 반응을 더욱 심화시켜 유전자 변이 및 조직손상 등을 일으킨다(Yun et al. 1996; Weisz et al. 1996). 식물에 들어있는 폴리페놀 화합물은 강력한 항산화 활성을 가지고 있어 염증반응을 매개하는 TNF-α, IL-6, iNOS, cyclooxygenase-2 (COX-2), NO 및 PGE_2의 활성을 저해한다고 보고되었다(Sarkar & Bhaduri 2001; O'Coinceanainn et al. 2003).

산화적 스트레스와 염증반응과 관련하여 천연물로부터 항산화제 소재를 발굴하기 위한 활발한 연구가 진행되고 있다(Leem et al. 2011; Joo 2013; Hyun et al. 2015). 그 중 전통적으로 진통, 염증 치료제로서 쓰인 버드나무 추출물에 대한 연구도 일부 진행되고 있다. Kim et al.(2007)은 제주도에서 자생하고 있는 버드나무 추출물의 항산화 활성 및 주름 효소 활성에 대한 저해능력을 측정한 결과 elastase의 활성 저해 효과가 있는 것으로 나타나 기능성화장품의 원료로서 주목하였다. Kim & Kim(2016)은 버드나무 잎의 항산화와 항염증 효과를 관찰하였다. 또한 Kim & Chung(2010)은 이순신 일화에 소개되고 있는 버드나무 껍질 스토리를 활용하여 아산의 향토음식인 귀류탕을 개발 하였다. 하지만 버드나무 가지 추출물의 식품 저장성 향상이나 기능성 식품 소재로 이용하기 위한 기초 자료로는 아직 미비한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 버드나무 가지 추출물의 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량, SOD 유사활성, DPPH 활성 등 항산화 활성을 측정하고, 염증반응을 유도시킨 RAW 264.7 cell에 대한 버드나무 가지 추출물의 항염증 활성 효과를 알아보고자 하였으며, 이를 활용한 기능성 식품소재 개발의 기초자료로 활용되고자 한다.

II. 연구내용 및 방법

1. 버드나무 가지 추출

본 실험에 사용된 버드나무 가지는 아산시 소재에서 재배된 것으로 2016년 5월 채취하여 이용하였으며, 잘게 분쇄하여 증류수와 80% 메탄올에 24시간 shaking 추출하였다. 각 추출물을 감압농축(Rotary evaporator N-1,000, EYELA)시킨 다음 동결건조(24시간, –60ºC, 120 mesh)하여 사용하였다. 시료 추출수율은 버드나무 가지 100 g당 증류수 추출물은 130 mg으로 0.13%였으며, 메탄올 추출물은 150 mg으로 0.15%였다.

2. 항산화 활성 분석

버드나무 가지 추출물의 총 페놀성 화합물 정량을 위하여 시료 0.1 mL에 2.0 mL의 2% Na_2CO_3을 가하고 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 흡광도(750 nm)를 측정하였다. 버드나무 가지 추출물의 페놀성 화합물을 정량하기 위한 검량선으로는 0-1.0 mg/mL 농도의 Catechin을 이용하였다(Bevenuti et al. 2004). 총 플라보노이드 함량은 Lee et al. (1997)의 방법을 변형하여 각 시료 400 μL에 Diethylene glycol 4 mL를 첨가하고, 다시 1 N-NaOH 40 μL를 잘 혼합하여 37ºC에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선을 바탕으로 환산하였다. 버드나무 가지 추출물의 SOD (Superoxide Dismutase) 유사활성 측정을 위하여 Tsuda et al. (1995)의 방법을 참고하였다. SOD 유사활성 측정은 각 추출물 0.2 mL (1000 μg/mL)에 tris-HCl buffer (pH 8.5) 3.0 mL와 0.2 mM pyrogallol 0.5 mL를 가하여 10분간 방치한 후 1 N-HCl로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 UV-visible spectrophotometer (Phanrmaca biotech Ultraspec 3000, England)로 측정하였다. SOD-liked activity (%)=100–(A/B×100) (A: 시료 첨가군의 흡광도, B: 시료 무 첨가군의 흡광도). 전자공여능 측정은 추출물 0.5 mL에 0.15 mM DPPH 용액 3.5 mL 가하여 잘 섞은 후 517 nm에서 30분간 흡광도의 변화를 측정하여 계산하여 나타내었다(Kang et al. 2001).

3. 항염증 효과 분석

1) 세포 배양

본 연구에 사용된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. Raw 264.7 세포를 10% FBS, penicillin (100 U/mL) 및 streptomycin (100 μg/mL)을 혼합한 Dulbecco's modifide Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37ºC, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

2) 세포 독성 측정(MTT assay)

시료의 세포 독성을 분석하기 위해 Green et al.의 방법에 따라 3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 formazan의 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. RAW 264.7 cell이 1×10^5 cells/well의 농도가 되게 96 well plate에 분주하고, 37ºC, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 RAW 264.7 세포는 serum free 배지로 교체한 후 LPS

(100 ng/mL)와 시료를 처리하여 24시간 배양하여 5 mg/mL의 MTT 용액 10 μL를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다.

배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

3) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2의 형태로서 Griess reagent system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 제조사에서 제시한 방법대로 Griess 시약을 첨가하여 반응시킨 뒤 540 nm 파장에서 microplate reader (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다.

4) TNF-α, IL-6 의 측정

버드나무 가지 추출물이 염증 반응시 대식세포가 분비하는 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해, RAW 264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5/well이 되도록 분주하고 각 시험물질 (5 μg/mL)과 100 ng/mL 농도의 LPS 로 동시 처리 또는 LPS를 단독 처리하여 4시간(TNF-α) 혹은 24시간(IL-6) 배양하였다. 배양 후 상층액을 얻어, 세포 상층액 중으로 분비한 TNF-α와 IL-6를 enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 처리 후 분광광도계 겸용 효소면역분석기로 분석하였으며 그 결과는 LPS 처리군의 결과에 대한 시료처리에 의해 나타나는 수치를 저해율(%)로 환산하여 LPS 처리군에 비교한 각 시험물질의 효과를 나타내었다.

4. 통계처리

본 연구의 실험 결과들은 3회 반복하여 측정하여 평균값±표준편차로 나타내었으며, 모든 자료의 통계처리는 SPSS (Statistical Package for Science, version 18.0 SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였다. 각 실험 농도별 표준차이를 검증하기 위해 t-test와 ANOVA test를 수행하였으며, 유의성이 발견된 경우 Tukey's HSD test에 의해 농도간의 유의성을 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

다양한 식물에 존재하는 페놀화합물과 플라보노이드 등은 항산화 활성 및 항암효과 등이 있는 것으로 밝혀지고 있다 (Velioglu et al. 1998). 이차 대사물질로 식물계에 널리 분포

<Table 1> Total phenolic contents, total flavonoid contents of SKB (*Salix Koreensis* Branches)

Groups	Total phenolic acid (mg/mL)	Total Flavonoid (mg/mL)
WSB[1)]	1.11±0.00	1.12±0.04
MSB[2)]	1.47±0.02	1.36±0.05
p-value	0.001*	0.003*

[1)]WSB: Water extract of *Salix Koreensis* Branches
[2)]MSB: 80% Methanol of *Salix Koreensis* Branches
*Significant difference at $p<0.05$ by t-test

되어 있는 폴리페놀은 활성산화를 제거하는 항산화 기능으로 심장질환, 면역력감소 및 각종 질환을 예방 및 증상을 개선시킬 수 있다(Nozaki 1986; Nakatani 1990). 또한 플라보노이드는 산화촉진인자의 금속이온과 착염을 형성하여 free radical 소거효과 및 순환혈관계 질환의 예방효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 버드나무 가지의 항산화 활성을 측정하고자 증류수와 메탄올로 추출하여 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 <Table 1>과 같다.

버드나무 가지를 증류수로 추출한 WSB의 총폴리페놀 함량은 1.11 mg/mL이었고, 메탄올 추출물(MSB)은 1.47 mg/mL로서 메탄올 용매 추출물의 총 폴리페놀 함량이 유의적 수준에서 높게 나타났다($p<0.001$). Lee et al.(2011)의 연구에서도 싸리나무 줄기를 다양한 용매로서 추출하여 얻은 시료의 총 폴리페놀 함량 분석 결과 메탄올 추출 시료 216.5 mg/g tannic acid equivalent(TAE)가 가장 높았으며, 증류수 추출물 경우 149.5 mg/g TAE로 가장 낮은 추출 수율을 보였다.

총 플라보노이드 함량의 경우 WSB에서는 1.12 mg/mL이었고, MSB의 경우에는 1.36 mg/mL이었다. 총 플라보노이드 함량도 용매별 유의적 차이를 보였는데, 메탄올 추출물의 경우 높게 나타났다($p<0.005$). 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량비는 식물종에 따라 각기 다른데(Jeong et al. 2007), 녹차 중 총 플라보노이드 함량이 44.7 mg/g으로 가장 높게 나타난 것으로(Lee et al. 2001) 보고되었다.

2. 항산화 효능 측정

1) SOD 유사 활성과 EDA 활성

생체 내 활성산소 O_2^- (superoxide) 소거에 관여하는 SOD (superoxide dismutase) 효소는 생성된 활성 산소의 체내 산화현상을 억제한다. 따라서 버드나무 가지 추출물의 SOD 유사활성을 통하여 항산화 효능을 측정하고자 하였다. 활성산소(Superoxide)로부터 물질산화의 억제 작용을 알아보기 위해 Superoxide와 반응하여 갈변물질을 내는 피로갈롤(pyrogallol)의 자동 산화반응을 측정한 결과는 <Table 2>와 같다. 버드나무 가지의 열수(WSB) 추출물은 22.79% SOD 유사 활성을 보였고, 메탄올 추출물(MSB)은 17.17% 활성을

<Table 2> Effect of SKB on SOD-like activity and DPPH radical scavenging activity

samples	SOD-Liked activity (%)	EDA (%)
WSB[1)]	22.79±11.14	43.88
MSB[2)]	17.17±5.42	78.07
p-value	0.476	-

[1)]WSB: Water extract of *Salix Koreensis* Branches (1000 μg/mL)
[2)]MSB: 80% Methanol of *Salix Koreensis* Branches (1000 μg/mL)
Data are mean±standard deviation
EDA: Electron donating ability

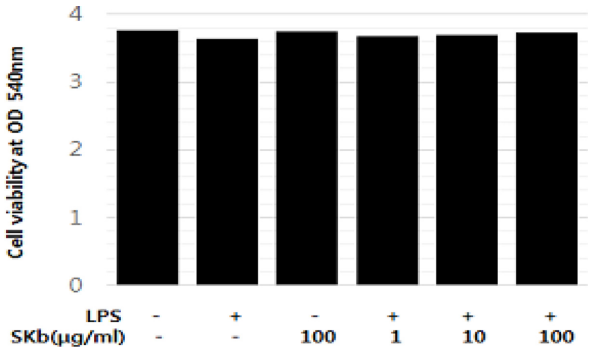
보여 열수 추출물의 활성능이 높게 나타났다. 이는 주박의 열수와 에탄올 추출물의 SOD 유사활성을 비교했을 때도 열수 추출물의 활성능이 2배 정도 높게 나타난 연구와 같은 결과이다(Kim et al. 2010).

다양한 생화학적 반응에서 생성된 자유라디칼에 의한 산화적손상은 식물소재 천연 추출물이 감소시키는 것으로 보고된 바 있다(Dragland et al. 2003; Valko et al. 2006). 진보라 색의 DPPH는 항산화 활성 물질과 반응하여 색깔이 옅어져 radical 소거 활성 측정이 쉽게 관찰된다. 일반적으로 페놀성 물질함량이 높을수록 DPPH radical 소거능은 증가된다(Choi et al. 2006; Jeong et al. 2007; Choi et al. 2013). 버드나무 가지의 열수 추출(WSB)과 메탄올 추출물(MSB)의 전자공여능(EDA)에 미치는 영향을 실험한 결과는 <Table 2>와 같다. 항산화력을 나타내는 전자 공여능 실험에서 버드나무 가지 열수 추출물(WSB)은 43.88%의 소거능을 보였고, 메탄올 추출물(MSB)은 78.07%의 소거능을 나타냈다. 즉, 버드나무 가지의 전자공여능은 메탄올 추출물 항산화력이 높음을 알 수 있다. 조릿대 열수출물의 소거능은 80.71%이었으며, 에탄올 추출물의 경우 83.59% 소거능을 보여 에탄올 용매 추출물이 유의적으로 높은 활성을 나타낸 것과(Song et al. 2015) 같은 결과이다. Moon et al.(2004)의 연구에서 약용식물인 백지, 당귀, 갈근 메탄올 추출물의 DPPH 소거능이 41.28%로 나타났다. 버드나무 가지 메탄올 추출물은 약용식물인 백지, 당귀보다 더 높은 자유라디칼 소거활성을 가져 천연 항산화제로서의 이용가치가 기대된다.

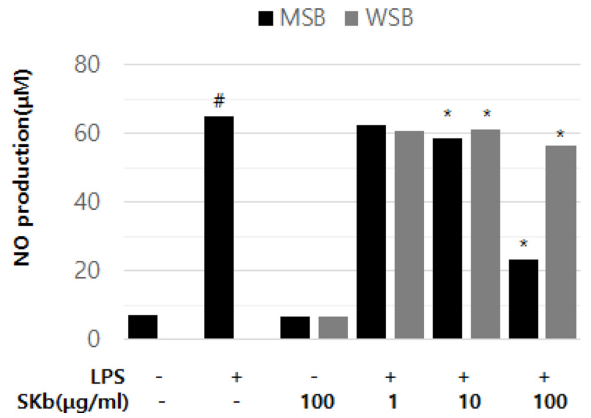
3. 항염증 효능 측정

1) 세포 독성 측정(MTT assay)

세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법 중 하나인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)분석은 노란색 기질인 MTT tetrazolium을 미토콘드리아 탈수소 효소작용에 의해 파란색의 formazan으로 환원시키는 검사법이다(Choi et al. 2013). MTT assay는 살아있는 세포수에 비례해서 흡광도를 나타내는데, 시료의 세포 독성을 측정하기 위해 이용하였다. 세포 생존율은 메탄올 추출



<Figure 1> Effect of the SKB composites on cell viability in RAW 264.7 cells.
Each value represents the mean±SD of the determinations made in triplicate experiments. Cells were pretreated with SKB (1, 10, 100 μg/mL) for 1 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 h. Cell viabiliyy was determined with an MTT assay. LPS, lipopolysaccharide; SKB, *Salix Koreensis* Andersson branches.

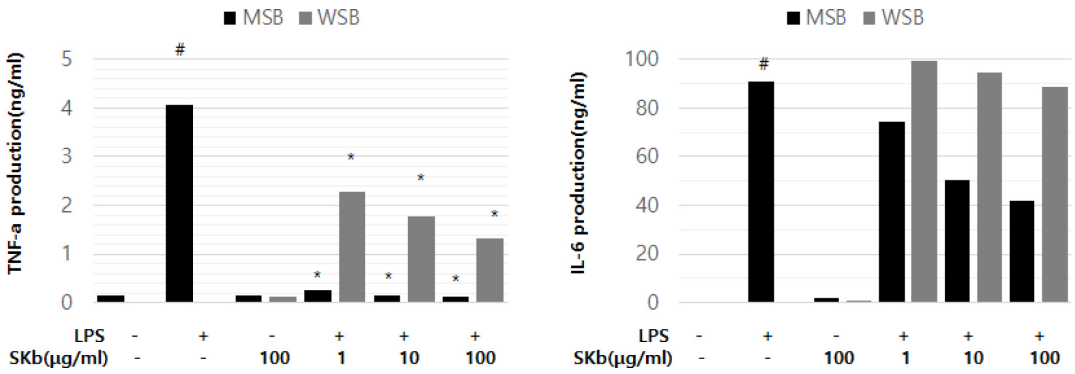


<Figure 2> Effects of SKB on LPS-induced NO production.
Cells were pretreated with SKB (1, 10, 100 μg/mL) for 1 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 48 h. No production was measured by Griess method. #p<0.05: significantly different from the unstimulated cells. *p<0.05: significantly different from te LPS-stimulated cells. LPS, lipopolysaccharide; SKB, *Salix Koreensis* Andersson branches.

물 100 μg/mL 농도까지 영향을 미치지 않았으며, RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 보여진다<Figure 1>.

2) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

활성 질소종(reactive nitrogen species)의 하나인 NO (nitric oxide)는 면역반응, 세포독성 및 염증유발에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Tang et al. 2004). 버드나무 추출물의 NO의 생성 저해에 대한 효과를 알아보기 위하여 LPS로 NO 생성을 유도한 뒤 버드나무 가지 추출물을 처리하였다. 그 결과 RAW 264.7 세포에 생성된 NO의 농도가 버드나무 가지 추출물에 의해 유의적으로 저해되는 것으로 나타났다<Figure 2>.



<Figure 3> Effect of te SKB composites on TNF-α and IL-6 production in RAW 264.7 cells.

Cells were pretreated with SKB (1, 10, 100 μg/mL) for 1 h and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 h. The levels of TNF-α and IL-6 were measured by ELISA method. Data are mean±SD values of three independent experiments performed in duplicate. #p<0.05: significantly different from te unstimulated cells; *p<0.05: significantly different from te LPS-stimulated cells. LPS, lipopolysaccharide; SKB, *Salix Koreensis* Andersson branches.

RAW 264.7 세포에 1 μg/mL의 LPS 단독 처리구에서 NO 생성량은 65.10±0.39 μM이었는데, WSB 추출물 농도가 1 μg/mL일 때 60.78±0.63 μM, 10 μg/mL일 때 61.28±0.35 μM, 100 μg/mL일 때 56.58±0.44 μM로서 추출물 농도가 증가할수록 NO 생성량이 유의적으로 감소하였다. MSB 추출물의 경우에도 농도가 1 μg/mL일 때 62.48±0.43 μM, 10 μg/mL일 때 58.80±0.16 μM, 100 μg/mL일 때 23.48±0.80 μM로서 농도가 증가할수록 NO 생성량이 유의적으로 감소함을 알 수 있다($p<0.05$). RAW 264.7 세포에 대한 황금 추출물의 NO 생성저해효과는 농도 의존적으로 NO의 생성이 감소되었으며(Yoon et al. 2011), 에틸아세테이트로 추출한 작약은 추출물 100 μg/mL의 농도에서 50% 이상의 NO 생성 저해효과를 보였으며(Im & Lee 2012), 단삼 메탄올 추출물은 300 μg/mL 농도에서 95% 수준의 NO 저해활성이 보고되었다(Yoon et al. 2007).

3) Cytokine 함량(TNF-α, IL-6 측정)

LPS는 대식세포 등의 염증세포와 반응하여 NO, 과산화물(ydrogen peroxide; $_2O_2$), IL-1, TNF-α, IL-6 등을 분비하는 대표적 발열물질이다(Jung et al. 2007; Lin et al. 2008). LPS로 염증반응을 일으키면 세포는 TNF-α, IL-1β 및 IL-6와 같은 전 염증성 cytokine을 생산하게 된다(Kim et al. 2011; Kim & Son 2012). 버드나무 가지 추출물을 통한 TNF-a, IL-6 cytokine 억제 실험결과는 <Figure 3>과 같다. LPS를 RAW 264.7 세포에 반응시켰을 때, TNF-α 생성량은 4.07±0.47 ng/mL이었다. WSB 추출물 농도가 1 μg/mL일 때 1.78±0.36 ng/mL, 10 μg/mL일 때 1.32±0.10 ng/mL, 100 μg/mL일 때 0.11±0.12 ng/mL로서 LPS에 비해 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). 또한, MSB 추출물의 경우에도 농도가 1 μg/mL일 때 0.16±0.12 ng/mL, 10 μg/mL일 때 0.12±0.12 ng/mL, 100 μg/mL일 때 0.13±0.03 ng/mL로서 LPS에 비해 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

골수성 림프계 세포에서 생성되며 IL-6는 면역반응에 관여하는 cytokine으로 감염이나 손상 등의 급성반응을 조절한다(Kim et al. 2009). 또한 염증병변 반응에서 IL-6이 증가하는 것으로 알려져 있다(Kim & Son 2014). LPS를 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 IL-6의 생성량은 90.84±2.90 ng/mL로 증가하였으나, WSB 추출물 농도가 1 μg/mL일 때 94.52±22.40 ng/mL, 10 μg/mL일 때 88.93±15.64 ng/mL, 100 μg/mL일 때 52.46±3.48 ng/mL로서 WSB 추출물 농도가 100 μg/mL일 때 유의적 수준에서 IL-6의 생성이 억제되었다($p<0.05$). MSB 추출물의 경우에도 농도가 1 μg/mL일 때 50.17±11.43 ng/mL, 10 μg/mL일 때 41.85±6.46 ng/mL, 100 μg/mL일 때 13.13±2.20 ng/mL로서 MSB 농도가 100 μg/mL일 때 유의적 수준에서 IL-6의 생성이 억제되었다($p<0.05$). 황금과 작약으로 구성된 황금 작약탕을 LPS로 처리된 RAW 264.7 세포에 처리 시 IL-6의 발현을 강하게 억제시키는 것으로 나타났다(Kim et al. 2013).

IV. 요약 및 결론

본 연구의 목적은 식품공전에 수록되어 있으며, 전통적으로 다양한 염증치료에 활용되어 온 버드나무 가지를 추출 용매를 달리하여 추출물의 항산화, 항염증 활성을 비교, 분석해 보고자 하였다. 추출물의 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량, SOD 유사활성, 자유 라디칼 소거능(DPPH) 등 항산화 활성을 조사하고, 염증반응을 LPS로 유도한 RAW 264.7 cell에 버드나무 가지 추출물을 처리하여 항염증 활성 효과를 알아보고자 하였다. 그 결과 버드나무 가지 메탄올 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 증류수 추출물보다 높게 나타났으나, SOD 유사활성은 오히려 버드나무 증류수 추출물에서 높게 나타났다. 전자공여능은 메탄올 추출물의 항산화력이 높음을 관찰할 수 있었다. 산화질소(NO) 생성, 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6 측정) 함량 측정에서도

버드나무 가지 추출물의 농도가 높아짐에 따라 현저하게 감소하는 것으로 관찰되었다. 이러한 연구결과로 볼 때 버드나물 추출물이 대식세포(macropage)에 의해 생성되는 염증 반응의 매개물질인 산화질소(NO), 염증성 사이토카인(cytokine) 등의 생성을 억제함으로 염증 반응을 완화시켜 줄 것으로 판단된다. 따라서 버드나무 가지는 천연 항산화 및 항염증 활성을 갖는 제품 개발에 있어 유용한 식물자원 원료로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

건강 지향적 식품을 선호하고 음식으로 질병을 치료하고 예방하려는 시대적 흐름으로 약선 음식이 더욱 주목받고 있다. 일부 지역의 민간요법으로 전승되어 오던 버드나무 가지를 이용한 보양식품은 본 실험결과를 통하여 항산화 및 항염증 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 항산화, 항염증 효과가 있는 버드나무 가지 추출물은 이를 활용한 두부, 묵 등의 가공 전통식품의 기능성 향상 및 저장성 연장 등으로 활용될 수 있을 것이다. 또한, 약선 음식의 기능성 재료는 음식 고유의 맛을 유지하거나 향상시키는 것이 중요한데, 버드나무 가지는 독특한 향과 쓴맛 등의 이취가 거의 없어 관능적으로 우수한 약선 음식 개발에 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

Ahn YH, Yang YC, Chun SH. 2001. A study on the distribution patterns of salicaceae species at the an-sung stream-refered to woldongcheon, yokjungcheon, joyoungcheon and gisolcheon. Kor. J. Env. Eco., 15(3):213-223

Alam MS, Kaur G, Jabbar Z, Javed K, Athar M. 2006. Evaluation of antioxidant activity of salix capreaflowers. Phytother Res., 20(6):479-483

Bevenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D. 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid and radical scavenging activity of rubus, ribes and aronia. J Food Sci., 69(3):164-169

Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J Am Oil Chem. Soc., 52(2):59-63

Choi EO, Kim HS, Han MH, Choi YH, Park C, Kim BW, Hwang HJ. 2013. Effects of hizikia fusiforme fractions on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. J. Life Sci., 23(12):1495-1500

Choi YM, Chung BH, Lee JS, Cho YG. 2006. The antioxidant activities of artemisia spp. collections. Kor. J. Crop Sci., 51(1S):209-214

Dragland S, Senoo U, Wake K, Holte K, Blomhoff R. 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. J. Nutr., 133(5):1286-1290

Du Q, Jerz G, Shen L, Xiu L, Winterhalter P. 2007. Isolation and structure determination of a lignan from the bark of salix alba. Nat Prod Res., 21(5):451-454

Emerit J, Chaudiere J. 2008. Free radicals and lipid peroxidation in cell pathology. In handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press. pp 177-185

Freischmidt A, Jrgenliemk G, Kraus B, Okpanyi SN, Mller J, Kelber O, Weiser D, Heilmann J. 2012. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised willow bark extract. Phytomedicine, 19(3-4):245-252

Halliwell B, Gutteridge J. 1996. Free radicals, ageing, and disease. In free radicals in biology and medicine. Clarendon Press. pp 416-423

Han LK, Sumiyoshi M, Zhang J, Liu MX, Zhang XF, Zheng YN, Okuda H, Kimura Y. 2003. Anti-obesity action of salix matsudana leaves (Part 1). Anti-obesity action by polyphenols of salix matsudana in high fat-diet treated rodent animals. Phytother Res., 17(10):1188-1194

Hyun JM, Park KJ, Kim SS, Park SM, Lee YJ, An HJ. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory effects of solvent fractions from the peel of the native jeju citrus ‘Hongkyool’ and ‘Pyunkyool’. J. Life Sci., 25(10):1132-1138

Im DY, Lee KI. 2012. Nitric oxide production inhibitory effect and antibacterial activity of the extract and fractions from paeoniae radix. Kor. J. Pharmacogn. 43(2):173-178

Ito N, Fukushima S, Fukushima H. 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenicity response by BHA and BHT, and other antioxidants. CRC Crit Rev. Food Technol., 15(2):109-150

Jeong JA, Kwon SH, Lee CH. 2007. Screening for antioxidative activities of extracts from aerial and underground parts of some edible and medicinal ferns. Korean J. Plant Res., 20(2):185-192

Joo SY. 2013. Antioxdant activities of medicinal plant extracts. Korean J. Food Sci. Nutr., 42(4):512-519

Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F. 2007. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: Elevation of prostaglandin D2 levels. Arthritis Res. Ther., 9(4):R64

Kang MH, Park CG, Cha MS, Seong ES, Chung HK, Lee JB. 2001. Component characteristic of each extract prepared by different extract methods from by-products of glycyrrhizia uralensis. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.,

30(1):138-142

Kim HJ, Park TS, Jung MS, Son JH. 2011. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo bansi). J. Appl. Bio. Chem., 54(2):71-78

Kim JY, Yang HJ, Lee KH, Jeon SM, Ahn YJ, Won BR, Park SN. 2007. Antioxidative and Antiaging Effects of Jeju Native Plant Extracts (II). J soc. cosmetic scientists of korea, 33(3):165-173

Kim MH, Chung HK. 2010. Development on native local food contents through literature. J. East Asian Soc. Dietary Life, 20(5):639-654

Kim MH, Kim EJ. 2016. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of salix koreensis andersson in DC. leaf methanol extract in vitro models. TANG (humanitas medicine), 6(4):28

Kim MR, Kang OH, Kim SB, Kang HJ, Kim JE, Hwang HC, Kim IW, Kwon DY. 2013. The study of anti-inflammatory effect of Hwanggeumjakyaktang extract in RAW264.7 macrophage. Kor. J. Herbol, 28(1):43-50

Kim SY, Lee EB, Jeong EJ. 2009. Anti-inflammatory action of the fractions of platycodi radix. Korean J Food & Nutr., 22(4):618-624

Kim TY, Jeon TW, Yeo SH, Kim SB, Kim JS, Kwak JS. 2010. Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of jubak *e*xtracts. Korean J. Food & Nutr., 23(3):299-305

Kim YJ, Son DY. 2012. Antioxidant and inhibitory effects of Korean panax ginseng extract on pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 41(10):1371-1377

Kim YJ, Son DY. 2014. Inflammatory mediator regulation of the Zizyphus jujube leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse macrophage. Kor. J. Food Preserv, 21(1):114-210

Lee IS, Lee PH, Son SG, Kim CS, Oh KH. 2001. Distribution and community structure of salix species along the environmental gradients in the nam-river watershed. Korean J. Ecol., 24(5):289-296

Lee JM, Oh SS, Han DS, Son ES. 2001. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. Korean J. Dietary culture, 16(5):504-514

Lee KI, Yang SA, Kim SM. 2011. Antioxidative and nitric oxide production inhibitory activities of lespedeza bicolor stem extracts depending on solvent. Korean J. Medicinal Crop. Sci, 19(5):368-372

Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. 1997. Compositions of Opuntia ficus-indica. Korean J. Food Sci. Technol., 136(5):847-853

Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (Eugenia caryophyllata Thunb). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 40(10):1361-1370

Li X, Liu Z, Zhang XF, Wang LJ, Zheng YN, Yuan CC, Sun GZ. 2008. Isolation and characterization of phenolic compounds from the leaves of salix matsudana. Molecules, 13(8):1530-1537

Liao JF, Chiou WF, Shen YC, Wang GJ, Chen CF. 2011. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of evodia rutaecarpa (Wuzhuyu) and its major bioactive components. Chinese Med., 6(1):1-8

Lin QY, Jin LJ, Cao ZH, Lu YN, Xue HY, Xu YP. 2008. Acanthopanax senticosus suppresses reactive oxygen species production by mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. Phytother. Res., 22(6):740-745

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev., 43(2):109-142

Moon JS, Kim SJ, Park TM. 2004. Activities of anti-oxidation and alcohol dehydrogenase inhibition of methanol extracts from some medicinal herbs. Korean J. Food Preser., 11(2):201-206

Nakatani N. 1990. Recent advances in the study on natural antioxidants. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37(7):569-576

Nozaki K. 1986. Current aspect and future condition of phytogenic antioxidants. Fragrance. J. 6(1):99-106

O'Coinceanainn M, Astill C, Baderschneider B. 2003. Coordination of aluminium with purpurogallin and theaflavin digallate. J. Inorg. Biochem., 96(4):463-468

Park YD. 2006. A study about control of gingivitis and plaque of dentifrice containing tranexamic acid and willow tree bark. J. Korean Acad. dent health, 30(3):271-279

Sarkar A, Bhaduri A. 2001. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species:comparison with its individual catechin constituents and green tea. Biochem. Biophys. Res. Commun., 284(1):173-178

Song WY, Byeon SJ, Choi JH. 2015. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of sasa borealis extracts. J. Agriculture & Life Sci., 49(3):145-154

Sultana S, Saleem M. 2003 Salix capreainhibits skin carcinogenesis in murine skin:inhibition of oxidative stress, Ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis. JE thnopharmacol, 91(2):267-276

Tang SY, Whiteman M, Jenner A, Peng ZF and Halliwell B. 2004. Mechanism of cell death induced by an antioxidant extract of cratoxylum cochinchinense (YCT) in jurkat T cells: the role of reactive oxygen species and calcium. Free Radic. Biol. Med., 36(12):1588-1611

Tsuda T, Oshinori YF, Katsumi O, Yamamoto A, Kawakishi S,

Osawa T. 1995. Antioxidative activity of tamarined extract prepared from the seed coat. Nippon Shokuhin Kaishi., 42(6):430-435

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem Cell Biol., 39(1):44-84

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J. Agr. Food & Chem., 46(1):4113-4117

Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-γ, bacterial lipopolysaccharide, and NG-monomethyl-L-arginine. J. Biochem., 316(1):209-215

Yoon HJ, Heo SK, Yun HJ, Park WH, Park SD. 2007. Anti-inflammatory effect of salviae miltiorrhizae radix. Kor. J. Herbol., 22(4): 65-73

Yoon SB, Han HS, Lee YJ. 2011. Effect of Scutellariae radix extract on the proinflammatory mediators in Raw 264.7 cells induced by LPS. Kor. J. Herbol. 26(2):75-81

Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. Crit. Rev. Neurobio, 10(3):291-316

Ministry of food and drug safety. Food code. http// foodsafetykorea.go.kr, [accessed 2018.03.22.]

Received March 20, 2018; revised April 18, 2018; accepted April 18, 2018