

고수(*Coriandrum sativum* L.) 지상부 추출물의 항산화 및 항염증 활성 효과*

난리** · 이창현*** · 최유나*** · 추병길****

Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from Aerial Part of *Coriandrum sativum* L.

Nan, Li · Lee, Chang-Hyun · Choi, You-Na · Choo, Byung-Kil

Coriandrum sativum L., an annual herbaceous plant of *Apiaceae* family. The present study evaluated the anti-oxidant activities and anti-inflammatory effects of ethanol extracts of *C. sativum*. The anti-oxidant activities of *C. sativum* were measured by total contents of polyphenol, flavonoid, DPPH and ABTS radical scavenging and reducing power activity. And anti-inflammatory effects of *C. sativum* were measured by LPS-induced RAW 264.7 cells. The results showed that the contents of total polyphenol and flavonoid were 76.03 ± 1.36 mg of gallic acid equivalents/g and 182.23 ± 4.32 mg of rutin equivalents/g at concentration 1 mg/mL of *C. sativum*. The DPPH radical scavenging activity was found to be 52.8% at 500 μ g/mL. The ABTS radical scavenging activity was shown in 58.3% after exposure to 1,000 μ g/mL. Reducing power activity was found to be 66.8% at 2,000 μ g/mL. The inhibitory effect of NO production was found to be 65% concentration 500 μ g/mL. In the generation quantity of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β in cell culture medium, the expression levels of inflammatory proteins in cells were showed decrease with the increase of concentration. Therefore, we suggest that the *C. sativum* should be a potential source of alternative anti-inflammatory drug with good anti-inflammatory effects.

Key words : *anti-inflammation, antioxidant, cytokine, coriandrum sativum, NF- κ B signaling pathway*

* 본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호 : PJ01422704)의 지원에 의해 이루어진 것임.

** First author, 전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과

*** 전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과

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

I. 서 론

호흡 과정에서 몸 속으로 들어간 산소는 에너지를 만들기 위한 필수적인 물질이지만 자외선 노출, 스트레스, 불규칙적인 식습관, 술, 흡연 등의 외부 자극으로 인해 활성산소(Reactive oxygen species; ROS)로 변환되고 DNA, RNA, 단백질, 세포막 및 세포구조에 손상을 입힐 수 있으며 이로 인해 피부노화, 뇌 경색, 암, 탈모 등의 여러 가지 질병이 일어날 수 있다(Grabowski, 1997; Kim and Kim, 2015). 활성산소를 소거하기 위해 체내에 존재하는 효소적 항산화제인 superoxide dismutase (SOD)와 비효소적 항산화제인(Vitamin E) 등의 방어 체계가 있지만 활성산소의 과량 생성 시, 합성 항산화제 섭취를 필요로 한다(Cha and Lee, 2004; Lee, 2014). 대표적인 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)과 butylated hydroxytoluene (BHT)은 높은 항산화 효과를 나타내지만, 장기 복용 시 간 손상이나 발암물질 또한 체내 순환 계통 파괴 등의 부작용 발생으로 인해 안전성에 논란이 있어 사용을 엄격히 제한되고 있다(Jayalakshmi and Sharma, 1986; Han, 2006; Lee et al., 2011b).

염증은 외부로부터 오는 자극에 대한 면역반응으로 대식세포들이 상처부위나 감염된 부위에서 반응하여 발열, 피부 부종, 통증과 같은 증상이 나타나는 생체조직의 방어반응이지만 지속적인 염증은 류머티스 관절염, 알츠하이머병, 암 등의 질병을 유발할 수 있다(Hotamisligil, 2006; Mantovani et al., 2008; Azizi et al., 2015). 염증 매개인자인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)는 염증성 단백질인 inducible nitric oxide (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 과량 생성되며(Lee et al., 2011a; Hou et al., 2016), iNOS와 COX-2 및 통증과 발열에 관여하는 TNF- α 및 IL-1 β cytokine 발현은 전사인자 NF- κ B/MAPK signaling pathway의 활성화에 의해 유도된다(Moynagh, 2005). 현재 주로 사용되는 항염증제로는 염증세포 활성화 억제 및 염증성 단백질의 발현 억제를 위한 비스테로이드제(non-steroidal)와 스테로이드제(steroidal) 약물들이 있다. 이러한 항염제는 탁월한 효과를 가지는 반면 소화불량, 위장출혈 등의 부작용이 보고된 바 있다(Ju et al., 2010). 이에 따라 염증 질환에 대한 효과를 가지며 부작용을 최소화한 대체 약물 소재 개발이 요구되고 있다.

고수(*Coriandrum sativum* L.)는 산형과의 1년생 초본식물로 원산지는 지중해, 아프리카, 중앙아시아 등이며 현재 중국, 인디아, 호주 등에서 널리 재배되고 있다. 고수의 지상부는 음식의 비린내를 제거해주는 향신료로 사용되거나 튀김요리를 비롯한 다양한 요리에 장식용으로 많이 사용되고 있다. 또한 한방에서는 호유자(胡荽子)라는 한약재로 쓰이는 고수의 종자는 위장보호 및 소화촉진에 대한 효능이 있다고 알려져 있다(Chaudhry and Tariq, 2006). 현재 고수의 추출물 관한 생리활성 연구로는 Sathishkumar 등(2016)에 의해 고수 잎의 에탄올 추출물이 여드름 치료와 지방암에 대한 효과가 보고되었으며, 고수 종자 추출물의 항염증 효과에 대한 연구가 보고된 바 있다. 또한 Tang 등(2013)에 의해 고수의 부위 별(뿌리, 잎 및 줄기) 추출물의 항산화 활성 및 DNA 손상 보호에 대한 효과가 다른 다른 결

과가 보고된 바 있다(Tang et al., 2013; Sathishkumar et al., 2016; Ishida et al., 2017). 그러나 고수 지상부 에탄올 추출물의 항산화와 및 항염증 활성의 잠재적인 molecular mechanism에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 고수 지상부 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성 평가를 실시하였으며, 이를 통해 고수 지상부 에탄올 추출물의 기능성 식품 및 대체 의약 소재로서의 가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 고수는 전라북도 장수군에서 구입하여 사용하였다. 고수 지상부를 세척한 후 45°C에서 음건하였고 분쇄기(HR2171, Artreal Huiyang, Manufacturing Ltd, China)를 이용해 분말(0.5 mm screen 사용)로 만들어 추출용 시료로 사용하였다.

2. 추출물 제조

분쇄 한 시료 10 g에 70% 에탄올 100 mL을 가하여 2시간씩 3회 반복 추출하였다. 추출물을 filter paper를 장착한 kimble-filtering flask를 이용하여 여과한 뒤 용액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, ELELA)를 사용하여 45~50°C의 수온에서 감압농축 후 동결건조(FD5508, IIShin) 하였다. 건조된 시료를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 분석 측정 시료로 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다(Velioglu et al., 1988). 추출 시료 25 μ L와 10% folin-ciocalteau's phenol reagent 500 μ L를 혼합하여 실온에서 5 분간 반응시킨 후 7.5% sodium carbonate 500 μ L를 가하여 30°C incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (Multiscan spectrum, Thermo Scientific)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 Gallic acid를 표준물질로 이와 같은 방법으로 측정하여 작성한 표준 곡선에 의한 식으로 함량을 구하였다.

4. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis 방법으로 측정하였다(Chae et al., 2002). 추출 시료 300 μL 에 diethylene glycol 600 μL 를 첨가하여 잘 섞어준 후 실온 차광 상태에서 5분간 반응시킨 후에 1 N NaOH 6 μL 를 더하여 37°C에서 1시간 동안 보관하였다. 이후에 microplate reader (Multiscan spectrum, Thermo Scientific)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 rutin를 표준물질로 작성한 표준곡선을 이용하여 측정하였다.

5. DPPH radical 소거능 측정

DPPH free radical 소거능 활성의 측정은 추출물의 DPPH에 대한 소거 효과로 측정하였다(Roberta et al., 1999). 고수의 70% 에탄올 추출물을 DMSO에 녹여 증류수로 농도 별로 희석하여 사용하였다. 각 시료와 0.2 mM DPPH 용액을 1:1로 혼합하였고, 37°C incubator에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader (Multiscan spectrum, Thermo Scientific)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH free radical 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 시료 첨가구를 비교하여 radical 소거활성을 백분율로 표시하였으며 양성 대조구로 ascorbic acid를 사용하였다.

6. ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능 활성은 Jing 등(2015)의 방법을 이용하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM의 potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 용액을 2:1로 혼합하여 실온 차광 상태에서 약 16시간 방치하여 ABTS 양이온(ABTS^+)을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 이 되게 100% ethanol로 희석하였다. 48 well plate에 희석된 용액 990 μL 에 고수 추출물 10 μL 를 첨가하여 실온에서 3분간 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 환원력 측정

환원력 활성(Reducing power activity)은 Oyaizu (1999)의 방법으로 측정하였다. 시료 100 μL 에 sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) 100 μL 를 가하여 50°C에서 20분간 heating하였다. 반응 후, 10% TCA (trichloroacetic acid) 100 μL 를 첨가한 뒤 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액 100 μL 와 증류수 100 μL 를 넣고 0.1% ferric chloride (FeCl_3)를 10 μL 씩 더하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 세포 배양

마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 cell는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)로부터 구입하여 사용하였다. RAW 264.7 cell는 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin & 100 µg/mL streptomycin (P/S)가 들어있는 Dublecco's modified eagle medium (DMEM)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

9. 세포 생존율

고수 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위해 proliferation and cytotoxicity assay kit를 이용하여 측정하였다. 5×10^6 cells/mL의 세포를 96 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 125, 250, 500 µg/mL 농도의 추출물을 처리하고 incubator에서 24시간 배양하여 2,500 rpm, 5분간 원심분리하고 상층액 분리시킨 후 proliferation and cytotoxicity 용액을 100 µL씩 첨가하여 35분 정도 반응시켰다. 그 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

고수 추출물의 Lipopolysaccharide (LPS) 자극에 의해 NO 생성량 억제 활성을 평가하기 위해 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 96 well plate에 5×10^6 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 주한 세포에 125, 250, 500 µg/mL 농도의 추출물을 처리하고 1시간 흡수시킨 후에 1 µg/mL의 LPS를 첨가하여 overnight 반응시킨 후 배지에서 분비된 NO의 함량을 Griess 시약과 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LPS 자극으로 인해 생성된 NO의 함량은 sodium nitrate를 표준물질로 사용하여 표준곡선을 작성한 후 정량하였다.

11. TNF- α 및 IL-1 β 생성 억제 활성

고수 추출물의 LPS 자극으로 인해 TNF- α 및 IL-1 β 생성량 억제 활성을 평가하기 위해 ELISA kit (R&D system Inc., Minneapolis, MN, USA, Cat No. SMLB00C, SMTA00B)를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 96 well plate에 5×10^6 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 분주한 세포에 125, 250, 500 µg/mL 농도의 추출물을 처리하고 1시간 흡수시킨 후에 1 µg/mL의 LPS를 첨가하여 18시간 반응시켰다. 배지에서 분비된 TNF- α 및 IL-1 β 의 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정한 뒤 450 nm에서 흡광도를 측

정하였다.

12. Western blotting

고수 추출물의 LPS 자극으로 인해 염증성 단백질 생성과 NF- κ B signaling pathway 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해 western blotting을 하였다. RAW 264.7 cell을 6 well plate에 5×10^6 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 분주한 세포에 250, 500 μ g/mL 농도의 추출물을 처리하고 1시간 흡수시킨 후에 1 μ g/mL의 LPS를 첨가하여 1시간 or 18시간 반응시켰다. 수집한 세포를 ice lysis buffer를 이용하여 세포 단백질을 추출하였다. 단백질 정량은 Bio-rad protein assay reagent A and B (Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 작성한 표준곡선을 이용하였고 정량된 단백질과 lysis buffer를 이용하여 loading sample을 제조하였다. 등량의 loading sample을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 이용하여 단백질 크기 별로 분리시킨 후 PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)으로 transfer 하였고 5% skim milk로 1시간 30분 동안 실온에서 blocking하였다. 그 후에 1:1000의 iNOS, COX-2, p-NF- κ B, p-I κ B α , p-p38, p-ERK의 1차 항체를 첨가하여 4°C에서 overnight incubating하였다. 1:10,000의 2차 항체를 붙여 실온에서 2시간 반응시킨 후 발색시약 luminol reagent A & B를 1:1로 혼합하여 발색시킨 후 Chemidoc 및 Bio-Rad images software (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) 이용하여 분석하였다.

13. 통계처리

모든 결과 값은 3 반복으로 측정하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. SPSS 12.0K 통계분석 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA과 Least significant difference (LSD) multiple comparisons 분석을 사용하여, $P < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성을 나타내었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀 및 플라보노이드는 페놀성 화합물로 식물체에 널리 함유하고 있는 2차 대사산물이며 생체 내 생성되는 활성산소를 소멸하는 천연 화합물로 잘 알려져 있고(Zillich et al., 2015), 페놀성 물질은 한 분자 내에 2개의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지고 있는 구조적

특징으로 단백질 등의 큰 분자들과 쉽게 결합하므로 항산화 및 항염증 등의 다양한 생리 활성 효과를 나타낸다고 보고되어 있다(Jang et al., 2008). 고수 추출물의 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 1 mg/mL 농도에서 76.03 ± 1.36 mg gallic acid equivalents/g 으로 정량되었다(Table 1). Kamel 등(2013)의 연구에서는 고수 용매 별(hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, water) 추출물에서 1 mg/mL 농도에서 ethyl acetate 추출물의 총 폴리페놀 함량이 31.38 ± 2.75 mg gallic acid equivalents/g으로 나타났으며 Kamel 등(2013)의 연구에서는 고수 열매 methanol 추출물에서 1.09 ± 0.02 mg gallic acid equivalents/g으로 나타났다. 이러한 결과와 비교하였을 때 고수 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 높은 수준으로 나타났다. 플라보노이드 함량 측정결과, 1 mg/mL 농도에서 182.23 ± 4.32 mg rutin equivalents/g으로 측정되었다. Yang 등(2015)의 연구에서는 고수 잎, 줄기, 뿌리의 부위별로 에탄올 추출물 플라보노이드 함량을 측정하였을 때 각각 102.00, 20.00, 13.00 mg rutin equivalents/g으로 확인되었다. 이와 비교하였을 때 본 연구에서는 고수의 지상부 에탄올 추출물에서 더 높은 플라보노이드를 함유하고 있음을 확인하였다.

Table 1. Total polyphenol contents and flavonoid contents of *C. sativum*

Plant extract (1 mg/ml)	Total polyphenol ^a	Total flavonoid ^b
Above ground	76.03 ± 1.36	182.23 ± 4.32

Note: ^a mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight. ^b mg rutin equivalent/g dry weight.

2. DPPH 및 ABTS radical 소거활성

DPPH 및 ABTS radical 소거능 측정 실험은 전자공여능을 측정하는 방법으로 물질의 항산화 활성 평가하는 데에 널리 응용되고 있는 방법이다. DPPH radical는 전자를 내어주는 항산화 물질과 반응하게 되면 환원반응이 이루어져 phenoxy radical을 생성하게 되어 DPPH 고유의 보라색이 노란색으로 변하게 된다(Kim and Kim, 2015). 고수 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정된 결과(Fig. 1a), 표준물질인 Ascorbic acid는 100 µg/mL 농도에서 88.4%의 소거능을 보였으며 고수 추출물은 125, 250, 500 µg/mL 농도에서 각각 11.99%, 25.02%, 52.19%의 소거능을 나타냈다. 이는 추출물 IC₅₀ 값이 15.875 µg/mL으로 나타난 Yang 등(2015)의 연구 결과와 비교하였을 때 매우 높은 것으로 나타났다.

ABTS radical 소거능은 ABTS를 potassium persulfate (K₂S₂O₈)와의 반응에 의해 생성된 청록색의 양이온 ABTS⁺가 항산화 물질에 의해 제거되면서 탈색이 이루어진 흡광도 값으로 ABTS radical 소거 활성을 평가할 수 있다. 본 연구에서 ABTS radical 소거능 측정된 결과, 항산화 활성이 없는 DW와 비교하였을 때 추출물 농도 250, 500, 1000 µg/mL에서 각각 17.47%, 32.25%, 58.29%의 소거능을 나타냈다. Kim 등(2015)의 연구에서는 약용작물인 인

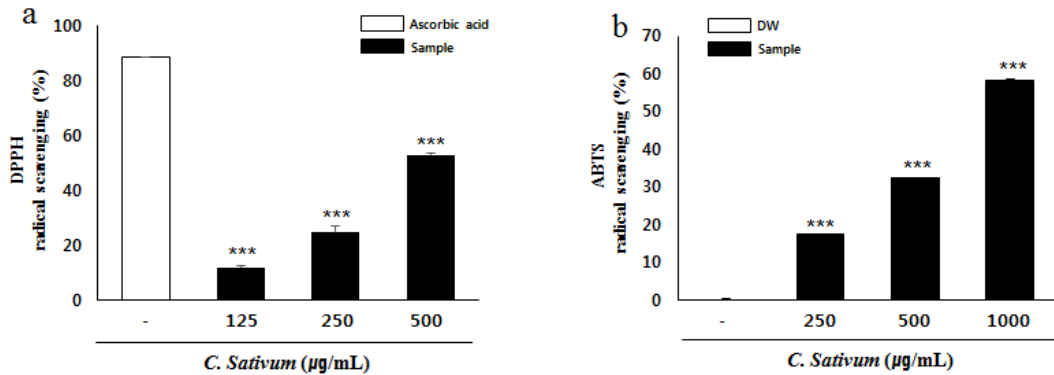


Fig. 1. DPPH and ABTS radical scavenging activities of *C. sativum*. The results were expressed as mean \pm SD (Significance of results, *** $P < 0.001$).

진호의 80% 에탄올 추출물의 ABTS 소거능을 측정하였을 때, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 50% 이상의 소거활성을 나타나 본 연구에서 고수 에탄올 추출물이 이와 비슷한 ABTS radical 소거능을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

3. 환원력

환원력 활성 Reducing power activity (RPA)은 항산화 활성을 평가하는 지표로 환원능력이 높을수록 항산화 효과가 강하게 나타나며 체내에서 연쇄 자동 산화 반응을 하는 활성 산소에 수소 원자를 공여함으로써 금속이온을 환원시켜 그 반응을 정지시킨다(Kim et al., 2015). 본 연구에서 고수 추출물의 환원력을 측정한 결과, 항산화제인 1 mM Rutin 표준물질(100%)와 비교하였을 때 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 33.01%, 45.00%, 66.82%로 나타났다(Fig. 2).

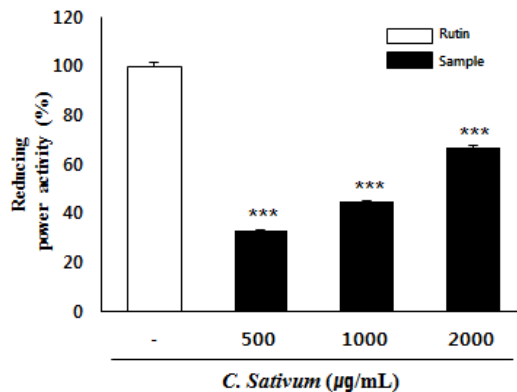


Fig. 2. Reducing power activity of *C. sativum*. The results were expressed as mean \pm SD (Significance of results, *** $P < 0.001$).

4. 세포 생존율

고수 추출물의 RAW 264.7 cell 생존율을 측정된 결과, 125, 250, 500 µg/mL 농도에서 세포 생존율이 모두 100% 이상으로 나타나 고수 추출물은 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 3a).

5. Nitric Oxide 생성 억제 효과

인체 내에 적절한 함량의 NO는 필수적인 신경 전달 물질로 존재하지만 자극에 의해 과도하게 생성된 NO는 염증유발 등의 질병을 초래한다(Grabowski et al., 1997; Laroux et al., 2001; Aktan, 2004). NO 생성량의 억제 효과를 평가하는 방법은 물질의 항염증 활성을 확인하는 방법으로 널리 응용되고 있다(Lu et al., 2017). 고수 추출물의 NO 생성 억제 효과를 평가하기 위해 염증 유발 물질인 LPS를 이용하여 세포 염증 유발한 뒤, NO의 생성량을 측정하였다. 그 결과, LPS 자극으로 인해 NO 생성량이 극히 증가하였으며 고수 추출물 처리에 의해 NO 생성량이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였고 500 µg/mL의 농도에서 50% 이상의 억제 효과를 나타냈다(Fig. 3b).

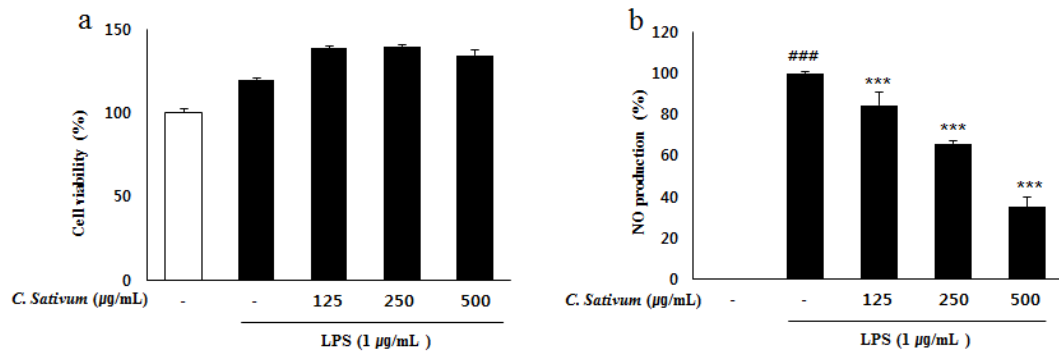


Fig. 3. Effects of *C. sativum* on cell viability (a) and NO production (b) in LPS-induced RAW 264.7 cells. ### $P < 0.001$ vs. without LPS treatment (normal cells); *** $P < 0.001$ vs. only LPS-treated cells.

6. TNF-α 및 IL-1β 생성 억제 효과

LPS 자극으로 인해 세포에 염증반응이 유발되며 cytokine 인 TNF-α 및 IL-1β의 분비량이 증가하게 된다. 이로 인해 염증반응이 더 심해져 조직 손상 및 각종 질병을 유발한다(Popa et al., 2007; Harris et al., 2011). 고수 추출물의 TNF-α의 생성에 대한 억제 효과를 평가한

결과, 대조구에서는 TNF- α 의 함량이 검출되지 않았고 LPS 처리구에서는 TNF- α 생성량이 282.91 pg/mL으로 나타났으며 고수 추출물을 농도별로 처리함으로써 TNF- α 의 함량이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4a). 특히, 500 μ g/mL의 농도에서 50% 억제됨을 확인하였다. 고수 추출물의 LPS 유도된 IL-1 β 의 생성에 대한 억제 효과를 평가한 결과, LPS 처리구에서 IL-1 β 생성량이 67.51 pg/mL으로 나타났으나 고수 추출물 처리에 의해 IL-1 β 의 함량이 극히 감소된 것으로 확인되었으며, 125 μ g/mL의 농도에서 70% 이상, 500 μ g/mL의 농도에서 90% 이상의 억제 효과를 보였다(Fig. 4b).

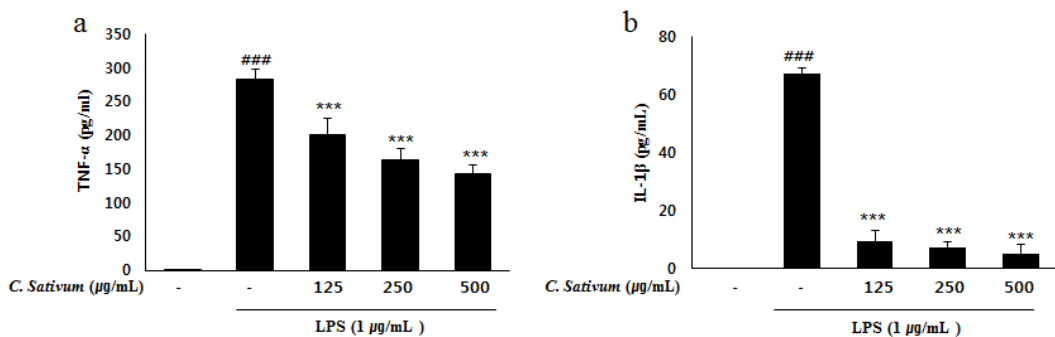


Fig. 4. Effects of *C. sativum* on TNF- α (a) and IL-1 β production in LPS-induced RAW 264.7 cells. $^{###}P < 0.001$ vs. without LPS treatment (normal cells); $^{***}P < 0.001$ vs. only LPS-treated cells.

7. iNOS 및 COX-2의 발현량 억제 효과

Nitric oxide synthase (산화질소 합성효소, NOS)는 신경세포, 대식세포, 혈관의 내피세포 등에 존재하며 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS)의 세 종류가 있다(Aktan, 2004). iNOS는 염증 반응 시 세포에서 발현되는 단백질로 과도한 NO 생성을 유발하여 염증반응 악화에 기인하여 조직 손상을 비롯한 다양한 질병을 유발한다. Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 염증으로 인한 조직 손상 시 발현되는 유도형 효소로 PGE2 등의 염증성 매개물질의 생성을 유발한다(Ranganathan et al., 2013). 이에, 본 연구에서는 고수 추출물의 LPS의 자극으로 인해 염증이 유도된 세포에서 iNOS 및 COX-2의 발현에 대한 억제효과를 평가하기 위해 western blotting을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 무처리구에서 iNOS가 발현되지 않았으나 LPS 처리구에서 무처리구에 비해 유의하게 발현이 증가하였고 고수 추출물을 처리하였을 때 농도 유의하게 iNOS 발현량이 감소되었다. 또한, 250 μ g/mL 농도에서 43%의 억제율을 나타냈고 500 μ g/mL 농도에서 90% 이상의 억제효과를 나타냈다(Fig. 5a). COX-2는 무처리구에 비해 LPS 처리구에서 유의하게 발현이 증가하였고, 고수 추

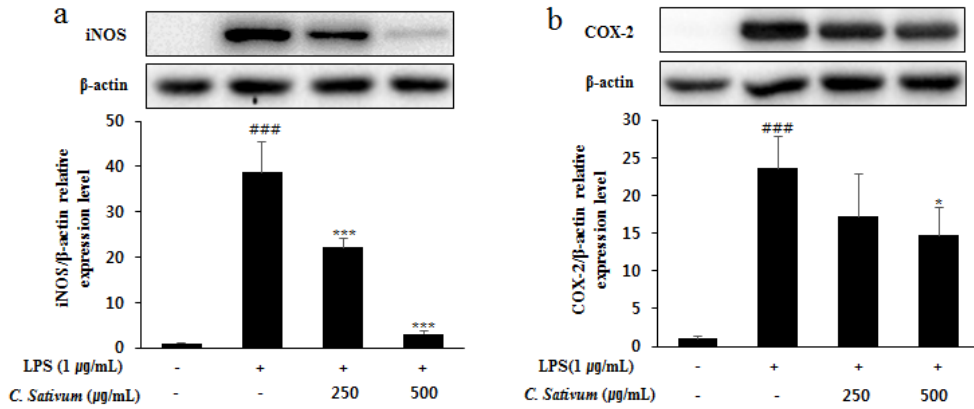


Fig. 5. Effects of *C. sativum* on the expression level of iNOS (a) and COX-2 (b) in LPS-induced RAW 264.7 cells. ^{###} $P < 0.001$ vs. without LPS treatment (normal cells); ^{***} $P < 0.001$, ^{*} $P < 0.05$ vs. only LPS-treated cells.

출물 처리에 의해 COX-2의 발현량이 감소되었으며 500 μg/mL 농도에서 40% 억제율을 보였다(Fig. 5b).

8. NF-κB 및 IκBα 인산화 억제 효과

NF-κB signaling pathway는 다양한 염증질환 mechanism에 관여하며 안정적인 세포에서는 NF-κB가 억제 단백질인 IκBα과 결합하여 세포질에서만 존재하지만, TNF-α나 LPS 등의 외부

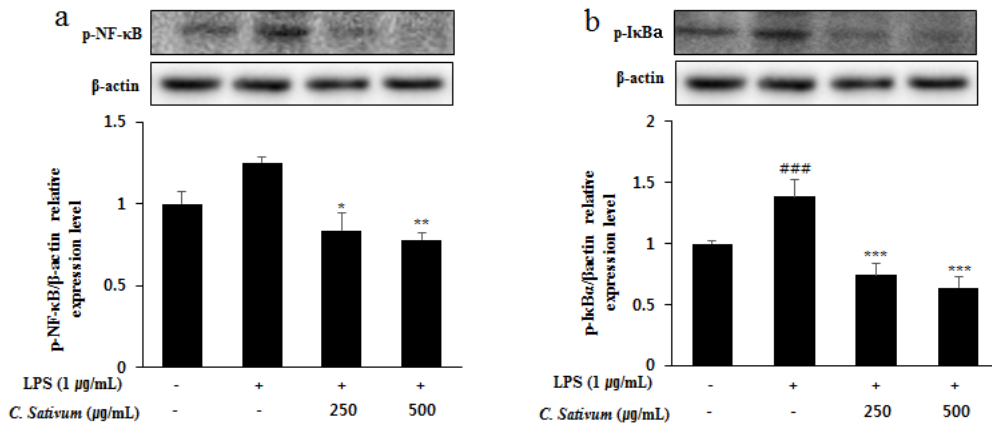


Fig. 6. Effects of *C. sativum* on the phosphorylation level of NF-κB (a) and IκBα (b) in LPS-induced RAW 264.7 cells. ^{###} $P < 0.001$ vs. without LPS treatment (normal cells); ^{***} $P < 0.001$, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ vs. only LPS-treated cells.

자극에 의한 불안정한 세포 상태에서는 I κ B α 가 인산화로 NF- κ B가 세포핵으로 방출되어 염증성 단백질(iNOS, COX-2 등)와 cytokines (TNF- α , IL-1 β 등)의 전사를 촉진시킨다(Lawrence, 2009; Liu et al., 2016). 본 연구에서 고수 추출물의 LPS로 유도된 세포에서 NF- κ B 활성화 억제 효과를 평가한 결과, LPS의 자극으로 인해 NF- κ B와 I κ B α 의 인산화 수준이 모두 증가하였고 고수 추출물 처리에 의해 NF- κ B (Fig. 6a)와 I κ B α (Fig. 6b)의 인산화 수준이 모두 감소된 것으로 나타났다.

9. ERK 및 P38 인산화 억제 효과

MAPK cascade pathway는 여러 가지의 염증성 단백질(iNOS, COX-2 등)의 발현을 조절하는 데에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 잘 알려져 있으며 외부 자극에 의해 염증 반응이 생길 때 MAPK subgroup인 JNK, ERK, p38가 인산화 되어 iNOS 등의 염증 관련된 물질의 유전자 발현을 조절한다 (Kaminska, 2005). MAPK signaling pathway에 관여하는 단백질 발현 수준을 분석한 결과, LPS로 유도된 세포에서는 ERK 및 p38가 활성화 되어 무처리구에 비해 인산화 정도가 유의하게 증가하였고 고수 추출물 처리에 의해 ERK (Fig. 7a) 및 p38 (Fig. 7b)의 인산화가 모두 농도 의존적으로 감소된 것으로 나타났다.

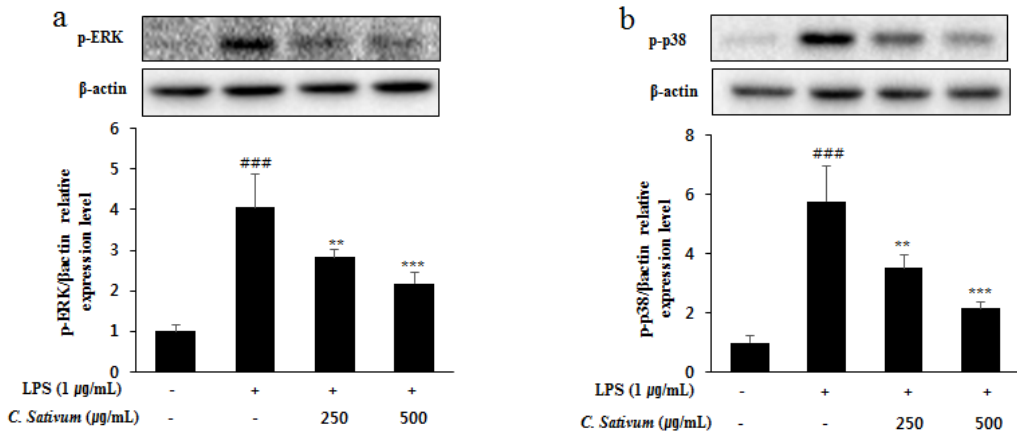


Fig. 7. Effects of *C. sativum* on the phosphorylation level of ERK (a) and p38 (b) in LPS-induced RAW 264.7 cells. ^{###} $P < 0.001$ vs. without LPS treatment (normal cells); ^{***} $P < 0.001$, ^{**} $P < 0.01$ vs. only LPS-treated cells.

IV. 적 요

본 논문은 고수 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 항염증 효과를 평가하기 위하여 수행되었다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 1 mg/mL 농도에서 각각 76.03 ± 1.36 mg of Gallic acid equivalents/g, 182.23 ± 4.32 mg of Rutin equivalents/g으로 나타났고 DPPH와 ABTS radical 소거능은 각각 500 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 52.8%, 58.3%의 소거율을 확인하였으며 2000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 환원력을 나타냈다. 세포독성 검사 결과, LPS와 함께 처리한 세포에서 고수 추출물 (0-500 $\mu\text{g/mL}$)에 의한 독성이 나타나지 않았고 염증 매개인자인 NO, 염증성 cytokine인 TNF- α 및 IL-1 β 의 생성량을 농도의존적으로 유의하게 감소시켰다. 또한 염증성 단백질인 iNOS 및 COX-2의 발현 수준을 유의하게 감소시켰고 이런 염증성 단백질 발현을 조절하는 전사인자 NF- κ B/MAPK signaling pathway의 활성화 수준도 유의하게 억제시킨 것으로 나타났다. 이와 같이 고수 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성을 나타냄으로써 활용 가치가 기능성 식품 및 대체 의약 소재로 이용될 수 있다고 사료된다.

[Submitted, September. 24, 2019 ; Revised, October. 17, 2019 ; Accepted, October. 23, 2019]

References

1. Azizi, G., S. S.Navabi, A. Al-Shukaili, M. H. Seyedzadeh, R. Yazdani, and A. Mirshafiey. 2015. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Sultan Qaboos Univ Med J. 15: 305-316.
2. Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci. 75: 639-653.
3. Chae, S. K., G. S. Kang, S. J. Ma, K.W. Bang, and M. W. Oh. 2002. Standard food analysis. Paju Korea. pp. 381-382.
4. Cha, B. C. and E. H. Lee. 2004. Antioxidant and anti-inflammation activities of *Prunus persica* tree extracts. Kor J Med Crop Sci. 12: 289-294.
5. Chaudhry, N. and P. Tariq. 2006. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. Pak J Pharm Sci. 19: 214-218.9.
6. Grabowski, P. S., P. K. Wright, R. J. Van't Hof, M. H. Helfrich, H. Ohshima, S. H. Ralston. 1997. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Br J Rheumatol. 36: 651-655.

7. Han, J. T. 2006. Development of functional material using the root of *Rosa multiflora*. Food Ind Nutri. 11: 59-65.
8. Hou, X. M., F. Yang, W. B. Liu, Z. X. Fu, L. Chen, Z. X. Li, C. Ni, M. Liu, and G. W. Cao. 2016. Signaling pathways that facilitate chronic inflammation-induced carcinogenesis. J Cell Signal. 1: 1-9.
9. Hotamisligil, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 444: 860-867.
10. Harris, J., M. Hartman, C. Roche, S. G. Zeng, A. O'Shea, F. A. Sharp, E. M. Lambe, E. M. Creagh, D. T. Golenbock, Tschopp, J. H. Kornfeld, K. A. Fitzgerald, and E. C. Lavelle. 2011. Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting Pro-IL-1 β for degradation. J Bio Chem. 286: 9587-9597.
11. Ishida, M., K. Nishi, N. Kunihiro, H. Onda, S. Nishimoto, and T. Sugahara. 2017. Immunostimulatory effect of aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. seed on macrophages. J Sci Food Agric. 97: 4727-4736.
12. Jayalakshmi, C. P. and J. D. Sharma. 1986. Effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on rat erythrocytes. Environ Res. 41: 235-238.
13. Jang, S. H., E. A. Yu, K. S. Han, S. C. Shin, H. K. Kim, and S. G. Lee. 2008. Changes in total polyphenol contents and DPPH radical scavenging activity of *Agrimonia pilosa* according to harvest time and various part. Korean Med Plan. 16: 379-401.
14. Jing, L. L., H. P. Ma, P. C. Fan, R. M. Gao, and Z. P. Jia. 2015. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. BMC Complement Altern Med. 15: 287-299.
15. Ju, M. S., H. U. Jeong, H. G. Park, Y. S. Youn, Y. O. Kim, S. Y. Kim, and M. S. Oh. 2010. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of Geranii Herba. Kor J Herbology. 25: 97-101.
16. Kaminska, B. 2005. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochim Biophys Acta. 1754: 253-262.
17. Kamel, M., B. J. Mariem, S. Nidhal, B. Olfa, S. Jazia, T. Sonia, B. Iness, J. Iness, K. Sara, L. Ferid, and M. Brahim. 2013. Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit varieties. Arabian J Chem. 10: 3176-3183.
18. Kim, J. S. and K. L. Kim. 2015. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of *Artemisiae Capillaris* Extract. Kor J Aesthet Cosmetol. 13: 805-812.
19. Kim, G. H., N. Y. Kim, S. H. Kang, and H. J. Lee. 2015. Phytochemicals and antioxidant

- activity of *Codonopsis lanceolate* leaves. Kor J Food Sci Tech. 47: 680-685.
20. Laroux, F. S., K. P. Pavlick, I. N. Hines, S. Kawachi, H. Harada, S. Bharwani, J. M. Hoffman, and M. B. Grisham. 2001. Role of nitric oxide in inflammation. Acta Physiol. Scand. 173: 113-118.
 21. Lee, H. E., E. O. Kim, M. J. Seo, and S. W. Choi. 2011a. Anti-inflammatory effects of volatile flavor extract from herbal medicinal prescriptions including *Cnidium officinale* Makino and *Angelica gigas* Nakai. J Soc Cos Sci Kor. 37: 73-80.
 22. Lee, J. H. 2014. Anti-Oxidant and anti-inflammatory effects of *Diospyros kaki* Thumb leaves extracts. Kor J Aesthet Cosmetol. 12: 719-724.
 23. Lee, H. J., G. N. Lim, M. A. Park, and S. N. Park. 2011b. Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts. Kor J Mic Bio. 39: 63-69.
 24. Lu, X. G., M. Li, J. L. Wei, H. X. Guo, Z. J. Bao, J. F. Wang, Z. Wang, Y. Z. Huang and B. C. An. 2017. Heliangin inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation through signaling NF- κ B pathway on LPS-induced RAW 264.7 cells. Bio Phar. 88: 102-108.
 25. Lawrence, T. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1:a001651.
 26. Liu, J., J. Tang, Y. Zuo, Y. Yu, P. Luo, X. Yao, Y. Dong, P. Wang, L. Liu, and H. Zhou. 2016. Stauntonoside B inhibits macrophage activation by inhibiting NF- κ B and ERK MAPK signaling. Pharmacol Res. 111: 303-315.
 27. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. Nature. 454: 436-444.
 28. Moynagh, P. N. 2005. The NF- κ B pathway. J Cell Sci. 118: 4389-4392.
 29. Oyaizu, M. 1999. Studies on products of browning reaction: Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Eiyogaku zasshi. 44: 307-315.
 30. Popa, C., M. Netea, P. L. C. M. van Riel, J. W. M. van der Meer, and A. F. H. Stalenhoef. 2007. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. J Lip Rese. 48: 751-762.
 31. Roberta, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ATBS redical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 26: 1231-1237.
 32. Ranganathan, P. V., C. Jayakumar, R. Mohamed1, Z. Dong, and G. Ramesh. 2013. Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2 mediated PGE2 production. Kidney Int. 83: 1087-1098.

33. Sathishkumar, P., J. Preethi, V. Raji, R. M. Y. Abdull, F. Ameen, S. Suresh, R. Balagurunathan, and T. Palvannan. 2016. Anti-acne, anti-dandruff and anti-breast cancer efficacy of green synthesised silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* leaf extract. *J Photochem Photobiol B*. 163: 69-76.
34. Tang, E. L., J. Rajarajeswaran, S. Y. Fung, and M. Kanthimathi. 2013. Antioxidant activity of *Coriandrum sativum* and protection against DNA damage and cancer cell migration. *BMC Complement Altern Med*. 13: 347-360.
35. Velioglu, Y., G. Mazza, L. Gao, and B. Oomach. 1988. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*. 46: 4113-4117.
36. Yang, Y., X. H. Zhu, and Y. B. Li. 2015. The study on the extraction and antioxidative activity in vitro of flavonoids from coriander. *Chi F Addi*. 6: 114-119.
37. Zillich, O. V., U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner, and M. Kersher. 2015. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmet Sci*. 37: 455-464.