

생약복합물 용매추출물과 조다당획분의 생리활성

신현영 · 김 훈* · 신지영** · 이수정*** · 유광원****

고려대학교 의생명융합과학과 석사과정, *경희대학교 피부생명공학센터 연구교수, ** (주)코시스바이오 연구소장,
경기대학교 식품생명공학전공 박사후연구원, *한국교통대학교 식품영양학전공 교수

The Physiological Activity of Crude Polysaccharide Solvent Extracted from Herbal Medicine Mixture

Hyun-Young Shin, Hoon Kim*, Ji-Young Shin**, Sue Jung Lee*** and †Kwang-Won Yu****

Master's Student, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

**Research Professor, Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University, Suwon 16229, Korea*

***Research Director, Cosis-Bio Co. Ltd., Jincheon 27867, Korea*

****Post-Doc, Major in Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea*

*****Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea*

Abstract

After ethanol (BM-E and RW-E) and hot-water (BM-HW and RW-HW) extracts were fractionated from two herbal mixtures (BM and RW), their physiological activities were investigated. All extracts consisted of more than 50% of neutral sugar, with their total polyphenol levels higher than flavonoid levels. Radical scavenging activities of EtOH extracts remained significantly higher compared to that of hot-water extracts, and in particular, RW-E showed consistently higher antioxidant activity than BM-E. When anti-inflammatory activities of the extracts were evaluated by LPS-stimulated RAW 264.7 cells at 10~500 µg/mL non-cytotoxicity doses, BM-E showed significantly higher levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, and nitric oxide inhibitory activity than those of hot-water extracts and RW-E. Murine peritoneal macrophage cells were shown to be enhanced in crude polysaccharides (BM-CP and RW-CP fractionated from BM-HW and RW-HW) compared to hot-water extracts and polysaccharide K (PSK, positive control). Especially, RW-CP exhibited higher activity than BM-CP, and component sugar analysis showed that BM-CP mainly contained galacturonic acid, glucose, arabinose, galactose, and xylose (34.5%, 33.9%, 16.1%, 7.1%, and 6.3%, respectively), whereas RW-CP showed different measurements (29.5%, 59.2%, 5.0%, 4.5%, and 0.2%). In conclusion, two herbal mixtures could contain varying sets of physiological activities dependent on different extraction and fractionation methods.

Key words: herbal medicine, solvent extract, anti-oxidant activity, anti-inflammatory activity, macrophage-stimulating activity

서 론

생약이란, 전통적인 민간요법에서 뿐만 아니라 한방에서 원료로 사용되는 자연계 물질 중 인체에 약효를 나타내거나 약효가 있다하여 사용되는 약용식물(medicinal plants, Ryu 등 2020)을 말한다. 생약재들은 낮은 독성과 부작용으로 인하여 우리나라와 동양권에서 민간요법으로 오랫동안 이용되어 왔

고, 통증완화, 해독, 항산화, 방부, 항염증, 면역강화 등의 다양한 생리활성 효능이 있어 치료와 예방의 목적으로 활용되고 있다(Kim 등 1997; Han & Lim 2001; Lee & Rhee 2015). 생약으로 사용되는 부위로는 주로 식물체의 전체 또는 지상부 부분만을 이용해 왔으나, 민간약 대부분은 전초류 생약으로 한방에서는 그 자체를 건조하여 다른 생약과 배합한 후 주로 탕제로 이용되어 왔다(Kim 등 2015). 최근 생약재료부

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

터 다양한 기능성과 활성화합물을 검토되었으며(Rivera 등 2010), 생약으로부터 분리한 추출물 또는 활성성분이 최근 기능성식품 및 천연물 의약품 원료로 활용되고 있는 상황이다(Korea Health Supplements Association 2016).

한편, 현대인에게 식품에 대한 개념은 단순히 활동 및 성장을 위한 에너지 급원의 역할을 넘어 건강증진에 도움을 줄 수 있는 새로운 생리기능성 물질의 섭취에 관심이 집중되고 있다(Hsieh & Ofori 2007). 특히, 전 세계적으로 고령화가 빠르게 진행되고 있으며 우리나라는 2026년을 전후하여 65세 이상 인구가 총 인구의 20% 이상을 차지하는 초고령 사회로 진입할 예정으로 이에 대비한 노인성 질환 연구개발의 중요성이 더욱 커지고 있다(Park 등 2014). 한편, 전통적으로 생약은 질병치료를 위한 목적으로 그들의 효능을 증진시키고 독성이나 부작용을 줄이기 위하여 복합물의 형태로 많이 사용되고 있다(Kim 등 2008). Kang 등(2009)은 13종의 한약재 복합 추출물이 체내 지질 조성 및 간 기능 회복에 미치는 영향을 평가하였으며, Suh 등(2020)은 17종의 생약재로부터 항염증 효능이 가장 우수하게 확인된 2종의 생약을 혼합하여 기관지 염증의 억제효과 증진 가능성을 보고하였다. 또한 국내에서는 식품원료로 사용 가능한 백수오, 속단, 당귀 등의 천연식물을 원료로 한 백수오 등 복합추출물이 개발되어 부작용은 나타나지 않으면서 폐경기 증상을 개선시키는 것으로 확인되었으며(Lee 등 2005), 이러한 과학적인 결과를 토대로 최근 생약복합제가 건강기능식품의 기능성 원료로 인정되고 있는 실정이다(Korea Health Supplements Association 2016). 특히, 여러 생약재의 혼합을 통해 상승작용(synergistic effect)을 규명한 결과가 점차 증가하고 있으며(Yang 등 2014), 이를 통해 많은 연구자들이 다양한 생약재 복합물을 통해 기능성을 증가시키기 위한 시도가 진행되고 있다. 이와 같이 생약 복합물이 약물간의 상호작용을 통해 더욱 유효한 효과를 발휘하고 있다는 점에서, 생약들을 배합하여 상승효과를 나타내는 복합제의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 기본 약제와 함께 혼합되는 생약을 달리하여 조제한 2종 생약복합물의 항산화, 항염증 및 면역활성 등의 생리활성을 평가하고자 하였다. 이를 위해 2종 생약복합물은 주정 및 열수추출물로 조제되었으며, 용매추출물에 따른 생리활성을 비교함으로써 건강기능성 식품 소재로의 적용가능성을 타진하기 위한 기초 자료로 활용하고 생약복합물의 식품분야에서의 이용성을 증대시키는데 기여하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 방법

본 실험에 사용된 2종 생약복합물은 동의보감 등을 참고

하여 건강증진을 목적으로 기본 생약(당귀, 천궁, 칩뿌리, 감초, 복령, 산약, 생강)에 산수유, 백출, 백작약, 계피의 4종 생약(BM)과 하수오, 사삼, 마가목의 3종 생약(RW)을 일정 비율로 혼합하여 조제한 생약혼합물(Table 1)을 (주)코시스바이오(Chungbuk, Korea)로부터 제공받았다. 구성 생약은 모두 식품원료로 사용가능하며 복합물은 grinder(Bazzatra, Gyeonggi-do, Korea)로 파쇄한 후 품질유지를 위해 -70°C 의 급속냉동기에 보관하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu 시약, gallic acid, quercetin, L-ascorbic acid 및 라디칼 조제와 관련된 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid)와 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 한편, 항염증 및 대식세포 활성측정을 위한 세포배양에 사용된 RPMI-1640 및 DMEM 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin과 streptomycin은 GenDepot(Katy, TX, USA)사에서 입수하였고 세포 독성과 증식활성용 EZ-cytox는 DoGenBio Co., Ltd.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 또한, 세포 실험의 경우에는 assay계의 적합성과 양성대조군으로서 endotoxin인 *Escherichia coli* O127:B8 유래의 lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich)를 사용하였다.

2. 생약복합물 용매추출물 및 조다당획분 분석

일정크기로 파쇄한 2종의 생약복합물(BM과 RW)을 환류 플라스크에 넣고 95% 주정을 5배(w/v) 첨가한 후 환류관에 연결하여 2시간 동안 처리($50\sim 60^{\circ}\text{C}$, 5회)하고 여과액을 모두 모아 농축한 후 원심분리($9,000\times g$, 5°C , 30 min)로 얻은 상등

Table 1. Composition of individual herbs for preparing herbal medicine mixture (BM and RW)

No	BM		RW	
	Composition herb	%	Composition herb	%
1	<i>Angelica gigas</i>	25	<i>Angelica gigas</i>	25
2	<i>Cnidium officinale</i>	15	<i>Cnidium officinale</i>	15
3	<i>Cornus officinalis</i>	10	<i>Fallopia multiflora</i>	10
4	<i>Pueraria montana</i>	10	<i>Pueraria montana</i>	10
5	<i>Atractylodes macrocephala</i>	10	<i>Atractylodes macrocephala</i>	10
6	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	5	<i>Dioscorea polystachya</i>	10
7	<i>Paeonia japonica</i>	5	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	5
8	<i>Wolfiporia extensa</i>	5	<i>Wolfiporia extensa</i>	5
9	<i>Dioscorea polystachya</i>	5	<i>Sorbus commixta</i>	5
10	<i>Cinnamomum cassia</i>	5	<i>Zingiber officinale</i>	5
11	<i>Zingiber officinale</i>	5		
	Total (%)	100	Total (%)	100

액을 동결건조하여 주정추출물(BM-E와 RW-E)로 조제하였다. 또한, 열수추출물은 파쇄한 2종 생약복합물에 20배(w/v)의 증류수를 넣고 decoction 방법으로 처리(90~95°C, 3회)한 후 여과액을 모아 농축 및 원심분리로 회수한 상등액을 동결건조하여 조제하였다(BM-HW와 RW-HW). 한편, 열수추출물은 다시 증류수에 용해시키고 5배(w/v)의 주정을 넣어 상온에서 충분히 교반한 후 원심분리로 회수한 침전을 증류수에서 투석(MWCO 12-14 kDa, Spectra/Por™, Spectrum Lab. Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)하고 투석액을 농축 및 원심분리한 후 회수한 상등액을 동결건조하여 조다당획분(BM-CP와 RW-CP)으로 분획하였다.

3. 생약복합물 용매추출물의 구성분 및 조다당획분의 구성당 분석

중성당, 산성당 및 단백질 함량은 glucose(Glc), galacturonic acid(GalA) 및 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등 1956), *m*-hydroxybiphenyl법(Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973) 및 Bradford법(Bradford MM 1976)으로 분석하였다. 또한, 2종 생약복합물의 열수추출물로부터 분획된 조다당획분의 구성당은 조다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 처리하여 단당류 aldose로 분해한 후 NaOH와 PMP(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline)를 첨가하여 단당류의 PMP 유도체로 전환시킨다(Honda 등 1989). 다음으로 당-PMP 유도체는 HCl로 중화하고 물과 클로로포름 혼합용매에서 물층만을 회수하여 PVDF membrane filter(0.45 µm, Jaema Trade Inc., Gwangwon-do, Korea)로 여과한 후 Thermo Scientific Accaim 120 C18 column(5 µm, 2.1×100 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)이 장착된 HPLC(YL 9100, Young Lin Instrument Co. Ltd., Gyeonggi-do, Korea)에서 UV(254 nm)로 분석하고 단당류의 mole%는 peak area와 response factor로부터 결정하였다.

4. 생약복합물 용매추출물의 항산화

2종 생약복합물의 항산화 활성을 평가하기 위하여 먼저, 생약복합물 용매추출물에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드 항산화 성분의 함량을 분석하였다. 총 폴리페놀 화합물의 경우에는 2종 생약복합물 용매추출물 100 µL에 2% Na₂CO₃ 1 mL과 50% Folin-Ciocalteu 시약 100 µL을 반응시킨 후 750 nm(Nanoquant Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)에서 측정하고(Marinova 등 2005), gallic acid를 표준물질로 사용하여 mg gallic acid equivalent(GAE)/용매추출물 g으로 표시하였다. 또한, 총 플라보노이드 함량은 2종 생약복합물 용매추출물 100 µL에 80% 에탄올, 10% Al(NO₃)₃·9H₂O 및 1 M potassium acetate 용액을 반응시킨 후 415 nm에서 측정하

고(Stanković MS 2011), quercetin을 표준물질로 사용하여 mg quercetin equivalent(QE)/용매추출물 g으로 나타내었다. 한편, 2종 생약복합물 용매추출물의 항산화 활성은 potassium persulfate와의 반응으로 형성된 ABTS 라디칼(Choi 등 2006)과 시판품 DPPH 라디칼(Goupy 등 2003)과의 반응을 통한 흡광도 값 변화를 734 nm와 517 nm로 측정하고, L-ascorbic acid를 표준물질로 사용하여 mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)/용매추출물 g으로 표시하였다.

5. 생약복합물 용매추출물의 항염증

2종 생약복합물의 항염증 활성은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구매한 RAW 264.7 대식세포주를 LPS로 자극한 염증모델에서 평가하였다. 먼저 시료의 RAW 264.7 세포주에 대한 독성여부와 무독성 시료 농도를 구하기 위하여 각각의 용매추출물을 대식세포주와 배양한 후 saline 음성대조군과 세포 생존율을 비교하였다(Ishiyama 등 1996). 한편, 이와 같이 얻은 무독성 시료농도의 범위에서 항염증 활성은 다음과 같이 진행되었는데, DMEM배지에서 배양한 RAW 264.7 세포주를 1×10⁶/mL로 희석하여 96 well plate에 200 µL씩 분주한 후 12시간 배양하고 새로운 DMEM 배지를 넣어주고 시료를 일정 농도(최종농도 10~500 µg/mL)로 처리하여 30분간 배양한다. 다음으로 LPS를 처리하고 24시간 추가배양을 통해 염증반응을 유발한 후 배양액의 염증촉진 사이토카인 interleukin(IL)-1β, IL-6 및 tumor necrosis factor(TNF)-α는 BD Biosciences(San Diego, CA, USA)사 메뉴얼에 따라 ELISA법으로 측정하고 또 다른 중요한 염증촉진 인자인 nitric oxide(NO)는 Griess법을 이용하여 분석하였다(Tursun 등 2016). 항염증 활성은 염증 관련 사이토카인과 NO 표준물질로부터 얻은 검량곡선을 이용하여 각각의 양을 산출한 후 염증모델에서의 용매추출물에 대한 생산억제능으로 나타내었다.

6. 생약복합물 용매추출물의 대식세포 자극활성

생후 5주령 웅성의 BALB/c 마우스를 두얼바이오텍(Seoul, Korea)사로부터 구입하여 정수와 실험동물용 펠릿사료(Samyang Co., Incheon, Korea)를 자유공급하면서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였고, 모든 실험은 경기대학교 실험동물윤리위원회(2019-012)의 승인을 거쳐 진행하였다. 대식세포 자극활성은 BALB/c 마우스 복강에 1 mL thioglycollate medium(Sigma-Aldrich)을 주사하여 3일 동안 복강으로 대식세포를 침출시킨 후 RPMI-1640 배지로 대식세포를 회수하고 1×10⁶ cells/RPMI-1640 mL로 현탁한 세포현탁액을 96 well plate에 200 µL씩 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 plate벽에 부착한 대식세포 monolayer를 형성하였다(Conrad RE 1981). RPMI-1640 배지를 이용한 세척

과정으로 plate에 부착되지 않은 세포를 제거한 후 FBS-함유 RPMI-1640 배지를 plate well에 180 μ L씩 분주한 다음 용매추출물을 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 대식세포와 배양하였다. 대식세포 자극활성은 세포배양 상등액을 취하여 BD Biosciences사 메뉴얼에 따라 ELISA법을 이용하여 표준물질의 검량곡선으로부터 사이토카인 양을 산출한 후 시료에 따라 대식세포로부터 생산되는 대식세포 활성화 촉진 사이토카인(IL-6, IL-12와 TNF- α) 생산능으로 측정하였다.

7. 통계처리

모든 실험은 3번 반복하여 측정하였으며 결과는 평균 \pm S.D.(standard deviation)로 나타낸 후 항염증과 대식세포 자극 활성의 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하여 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정한 반면, 항산화 활성은 유의성 평가를 위해 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 생약복합물의 용매추출물

기능성식품의 원료로 활용하기 위해 2종의 생약복합물인 BM과 RW를 파쇄한 후, 95% 주정을 이용하여 조제한 주정추출물과 열수로 추출한 열수추출물로 각각 조제한 결과, 2종의 생약복합물 모두 주정추출물보다는 열수추출물에서 높은 수율로 확인되었다(Table 2). BM의 주정추출물(BM-E)과 RW의 주정추출물(RW-E)은 각각 18.9%와 21.6%의 수율을 보였으며, RW-E의 수율이 다소 높은 것으로 확인되었다(Table

2). 또한 BM 열수추출물(BM-HW)과 RW 열수추출물(RW-HW)은 각각 27.3%와 29.9%의 수율을 나타내어 주정추출물과 마찬가지로 BM보다는 RW의 수율이 약간 더 높은 것으로 확인되었다. 2종의 생약복합물로부터 제조된 4종의 용매추출물에 존재하는 구성성분을 분석한 결과, 주정추출물의 경우 중성당(BM-E; 56.15% 및 RW-E; 56.88%)이 가장 높은 함량을 보였고 산성당(BM-E; 3.88% 및 RW-E; 4.35%)과 폴리페놀성 화합물(BM-E; 77.2 mg GAE/g 및 RW-E; 89.1 mg GAE/g)이 소량 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Table 2). 열수추출물도 주정추출물과 유사한 결과를 보였는데, 중성당(BM-HW; 54.73% 및 RW-HW; 62.86%)이 가장 높은 함량을 보였으며, 산성당(BM-HW; 5.87% 및 RW-HW; 6.56%)과 폴리페놀성 화합물(BM-HW; 57.4 mg GAE/g 및 RW-HW; 51.6 mg GAE/g)이 포함되어 있는 것으로 나타났다. 열수추출물과 주정추출물을 비교해 본 결과, 주정추출물에 함유된 총 폴리페놀성 화합물은 열수추출물에서 감소한 것으로 나타난 반면, 산성당의 경우에는 반대로 열수추출물에서 높고 주정추출물에서 감소한 것으로 확인되었다(Table 2). 한편, 4종의 추출물은 모두 1% 미만의 플라보노이드 함량을 보였는데, 주정추출물(BM-E; 3.4 mg QE/g 및 RW-E; 3.3 mg QE/g)보다는 열수추출물(BM-HW; 5.3 mg QE/g 및 RW-HW; 9.0 mg QE/g)에서 총 플라보노이드 함량이 높은 것으로 확인되었다(Table 2).

2. 생약복합물 용매추출물의 항산화 활성

한편, 시료의 항산화력은 2종류의 라디칼을 이용한 라디칼 소거활성으로 평가하였다. 용매추출물 4종의 ABTS 라디칼 소거능은 RW-E(59.5 mg AEAC/g) > BM-E(51.8 mg AEAC/g) > BM-HW(43.7 mg AEAC/g) > RW-HW(41.3 mg AEAC/g)의 순으로 나타났으며, DPPH 라디칼 소거활성 결과에서는 BM-E(22.8 mg AEAC/g) > RW-E(19.5 mg AEAC/g) > BM-HW(18.3

Table 2. Yield and chemical component of solvent extract

	EtOH extract		Hot-water extract	
	BM-E	RW-E	BM-HW	RW-HW
Yield (%) ¹⁾	18.9	21.6	27.3	29.9
Neutral sugar (%)	56.15 \pm 0.81 ^{bc2)}	56.88 \pm 1.05 ^b	54.73 \pm 0.52 ^c	62.86 \pm 0.89 ^a
Uronic acid (%)	3.88 \pm 0.09 ^d	4.35 \pm 0.03 ^c	5.87 \pm 0.01 ^b	6.56 \pm 0.06 ^a
Protein (%)	0.32 \pm 0.00 ^c	0.62 \pm 0.00 ^a	0.17 \pm 0.00 ^d	0.61 \pm 0.00 ^b
Total polyphenol (mg GAE/g)	77.2 \pm 1.5 ^b	89.1 \pm 2.9 ^a	57.4 \pm 1.5 ^c	51.6 \pm 1.0 ^d
Total flavonoid (mg QE/g)	3.4 \pm 0.0 ^c	3.3 \pm 0.1 ^c	5.3 \pm 0.4 ^b	9.0 \pm 0.2 ^a

All results are expressed as mean \pm standard deviation for four independent experiments.

¹⁾ Yield (%) was calculated against the raw materials (BM and RW).

²⁾ The difference in the superscript letter of the content value means a significant difference at $p < 0.05$.

mg AEAC/g) > RW-HW(12.1 mg AEAC/g) 순으로 확인되었다. 두 시료 모두 라디칼 소거활성에서 열수추출물보다는 주정추출물이 우수한 것으로 나타났으며, ABTS에서는 RW-E가 BM-E보다 유의적으로 높게 나타났으나 DPPH에서는 반대의 경향으로 확인되었다(Fig. 1). 한편, 열수추출물로부터 분획한 조다당획분의 경우에는 열수추출물보다도 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성 모두 현저히 감소되는 것으로 나타났는데(Fig. 1), 다당 및 단백다당 등 고분자 물질이 주로 포함된 조다당획분은 항산화 활성에 크게 관여하지 않는 것으로 사료될 수 있었다. 일반적으로 식물에 존재하는 많은 항산화 성분 중 폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 여러 가지 생약에 널리 분포하여 천연 항산화제로 작용하고 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 추후 생약복합물에 존재하는 주요한 폴리페놀 및 플라보노이드 성분을 분석함으로써 항산화 활성과의 상관관계를 연구하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

3. 생약복합물의 항염증 활성

염증반응은 면역반응 초기에 유도되는 화학주화성 관련 필수적인 반응이나 면역반응의 완료에 따라 조절 및 종결되지 않으면 퇴행성 질환이나 만성염증에 따라 암을 유발하는 등 다양한 질환과 연관되어 있어(Alazawi 등 2016), 과도한 염증반응의 조절은 생체보호를 위해 대단히 중요한 것으로 알려져 있다(Cao 등 2015). 이를 위해 RAW 264.7 대식세포주에 endotoxin인 LPS로 염증을 촉진한 후 염증을 촉진하는 nitric oxide(NO)와 함께 염증 관련 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등의 생산이 급증하는 LPS-유도 RAW 264.7 세포주 염증모델을 이용하는 것이 가장 일반적이다. 따라서 본 실험에서도 RAW 264.7 대식세포주에 LPS로 처리하여 염증

을 유발한 세포주에 10~500 μ g/mL 농도범위의 생약복합물을 첨가하여 배양한 후 항염증 활성을 측정하였다. 한편, 이러한 측정방법에 따른 항염증 활성은 LPS-자극 세포주의 염증인자 생산 억제를 측정하는 실험이기 때문에 시료가 RAW 264.7 세포주에 세포독성을 나타내면 염증 관련 인자들의 생산능 감소가 유발되어 활성이 나타나는 것으로 잘못 판단될 수 있기 때문에 이러한 오차를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포주에 대한 시료의 독성여부를 먼저 평가하였다. Fig. 2A에 나타낸 바와 같이, 10~500 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군에 비해 낮은 생존율을 보이는 시료는 확인되지 않았는데, 이는 주정추출물, 열수추출물 및 조다당획분 모두 측정된 농도범위에서 세포독성이 없다는 것으로 판단되었으며, 이후 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 NO에 대한 억제활성은 10~500 μ g/mL의 농도범위에서 진행하기로 하였다. IL-1 β 억제활성 평가 결과, 열수추출물인 BM-HW 및 RW-HW에서는 LPS 대조군 대비 유의적인 억제활성을 보이지 않았으나, 주정추출물인 BM-E 및 RW-E에서 농도-의존적인 억제활성이 확인되었다(Fig. 2B). 특히, BM-E와 RW-E는 500 μ g/mL 농도에서 각각 70.8% 및 52.7%의 통계학적으로 유의한 억제활성을 보였다. IL-6 억제활성 평가 결과, 주정추출물인 BM-E 및 RW-E에서는 농도-의존적인 억제활성이 나타났는데(Fig. 2C), 500 μ g/mL의 고농도에서 각각 75.0% 및 48.5%의 억제활성으로 확인되었다. 그러나 열수추출물에서는 LPS 대조군 대비 유의한 억제활성이 나타나지 않았다. TNF- α 억제활성의 경우, IL-1 β 및 IL-6 결과와 마찬가지로 열수추출물을 제외한 주정추출물(BM-E 및 RW-E)에서 농도-의존적인 억제활성이 확인되었는데, 500 μ g/mL의 농도에서는 각각 67.4% 및 45.7%의 억제활성으로 확인되었다(Fig. 2D). 마지막으로, NO 억제활성 결과에서는 BM-E를 제외한 나머지 시료들에서는 LPS 대조군 대비 유의적인 억제활성이 확인되지 않았다. BM-E 처리군에서는 농도-의존적인 NO 억제활성이 확인되었으며, 특히 500 μ g/mL의 농도에서 26.3%의 억제활성으로 나타났다(Fig. 2E). 종합해 보면, BM과 RW의 열수추출물은 10~500 μ g/mL 농도범위에서 항염증 활성이 거의 나타나지 않는 것으로 확인되었으나, 주정추출물에서는 농도-의존적인 억제활성이 확인되었으며, 특히 BM-E가 RW-E에 비해 더 우수한 항염증 활성을 가지는 것으로 판단되었다. 한편, 열수추출물로부터 분획된 조다당획분인 BM-CP 및 RW-CP의 경우 동일농도범위에서 유의적인 항염증 활성을 나타나지 않았다(data not shown). Lee 등(2011)의 단일 생약제와 생약복합제로부터 조제한 주정추출물의 항염증 활성비교에서는 단일보다 생약복합제의 활성이 증진되었음이 알려져 있으며 또한 감국과 황금의 추출복합물 처리가 감국 또는 황금 단일 추출물 처리에 비해 세포독성은 감소시키면서 기

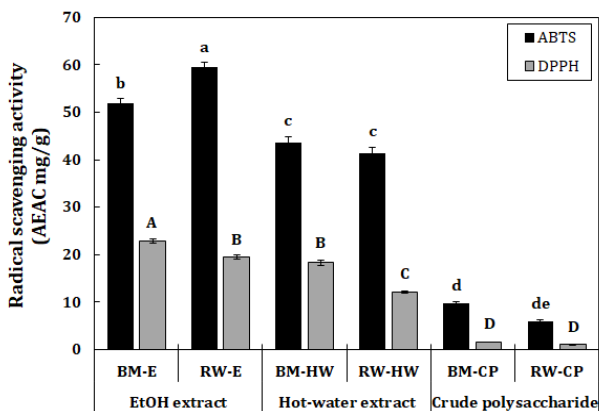


Fig. 1. Anti-oxidative activity on radical scavenging assay. The difference between lower (ABTS) and upper (DPPH) case letters on the bar means that there is a significant difference ($p < 0.05$) among tested groups.

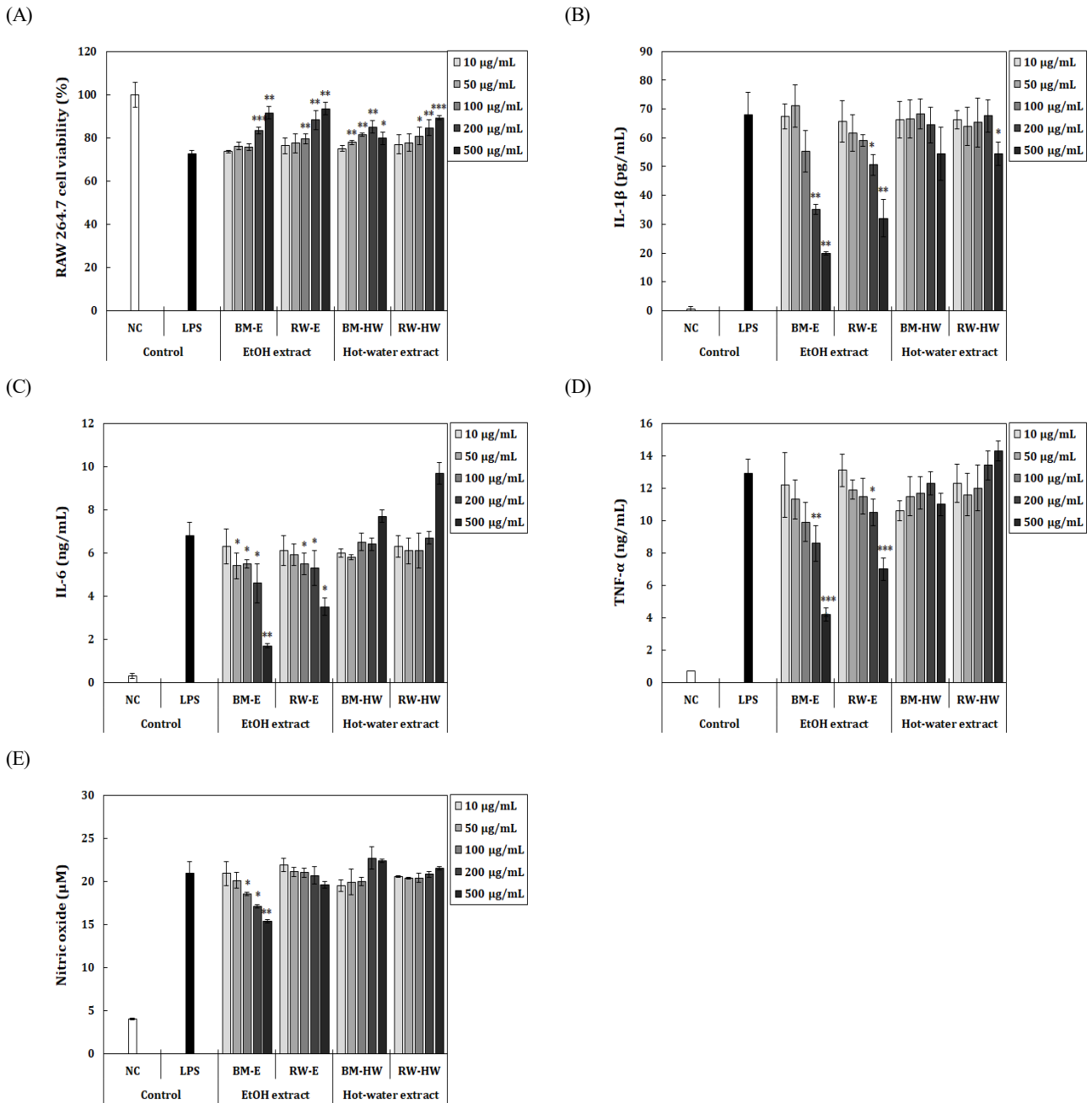


Fig. 2. Anti-inflammatory activity of ethanol and hot-water extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cell viability and inhibitory activity of (B) IL-1β, (C) IL-6, (D) TNF-α, and (E) nitric oxide were estimated by WST and ELISA methods. NC means negative control treated with only saline. LPS means inflammation-induced control treated with only LPS (1 µg/mL). Different asterisks on the column indicated significant difference between LPS and each sample by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

관지 염증 억제활성을 증진시킬 수 있다고 보고되었다(Suh 등 2020). 결론적으로, 생약복합물인 BM과 RW의 주정추출물은 항염증 소재로서의 활용 가능성을 추측해 볼 수 있었으며, BM이 RW보다 우수한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사

료되었다.

4. 생약복합물의 면역증진 활성

최근 코로나-19 감염상태로 인하여 신체 면역활성이 바이

러스 등으로부터의 생체보호를 위해 매우 중요하게 다루어지고 있다(Jackman 등 2017). 특히 선천면역계의 대식세포는 미생물이나 바이러스 등의 식세포 작용과 항원-항체복합체의 제거뿐만 아니라 및 후천면역계 조절에 관여하는 중요한 세포로 알려져 있다. 본 연구에서는 BALB/c 마우스에서 유래한 복강 대식세포에 BM과 RW의 열수 및 주정추출물을 처리하고 면역활성 사이토카인 생성능을 평가하였다. 먼저 열수 및 주정추출물 4종은 10과 100 µg/mL의 농도로 세포에 처리되었는데, 결과적으로 100 µg/mL 농도의 RW-HW 처리가 saline 대조군과 비교하여 유의적으로 증가된 TNF-α 생성능을 보인 것을 제외하고(Fig. 3C), 4종의 용매추출물은 모두 IL-6 및 IL-12 생성 증진활성을 나타내지 않았다(Fig. 3A, Fig. 3B). 결과적으로, 주정추출물인 BM-E 및 RW-E에서는 어떠한 면역활성 사이토카인 생성도 확인되지 않았기 때문에, 이후 마우스 유래 복강 대식세포를 이용한 면역활성의 재평가에서는 일반적으로 면역활성이 우수하다고 보고된 조다당획분을 분획하여 평가하기로 하였다. 이를 위해 BM-HW와 RW-HW로부터 에탄올 침전법을 통해 조다당획분(crude polysaccharide, CP)을 분획하였다. BM-HW 및 RW-HW로부터 분획된 조다당획분인 BM-CP(수율 3.3%)와 RW-CP(수율 4.2%)는 용매추출물에서와 마찬가지로 RW-CP가 BM-CP보다 더 우수한 수율을 보였다(Table 3). 조다당획분의 면역활성은 Fig. 3의 결과를 참고하여 측정 농도범위를 10~1,000 µg/mL로 확장하였으며, 양성대조군으로 시판 면역증가제로 사용되는 polysaccharide-K(PSK)를 사용하여 시료의 면역활성과 비교하였다(Tzianabos O 2000). 먼저, 활성화된 대식세포로부터 분비되어 획득면역계의 중요한 세포인 B 세포의 증식과 항체생산에 기여하는 것으로 알려진 IL-6 생산능을 측정할 결과, 양성대조군인 PSK는 10~1,000 µg/mL 농도범위에서 71.9~1,722.6 pg/mL의 농도-의존적인 IL-6 생성 활성을 보였으며, 이는 saline 대조군 대비 4.6~111배 증진된 것으로 확인되었다(Fig. 4A). BM-HW와 RW-HW는 동일농도범위에서 각각 18.2~163.3 pg/mL (1.2~10.5배 증진) 및 20.3~398.6 pg/mL(1.3~25.7배 증진)의 IL-6 생성능을 나타내어 PSK와 비교했을 때 유의적으로 낮은 수준으로 확인되었다(Fig. 4A). 반면 BM-HW로부터 분획된 조다당획분인 BM-CP에서는 10~1,000 µg/mL 농도범위에서 43.3~1,759.4 pg/mL(2.8~113.5배 증진)의 IL-6 생성 활성을 보여 BM-HW에 비해 활성이 월등히 증가된 것으로 나타났으며, 이는 동일농도범위에서 PSK의 활성과 유사한 수준으로 판단되었다. RW-HW의 조다당획분인 RW-CP의 경우, LPS 대조군을 제외한 모든 측정시료들 중에서 가장 우수한 IL-6 생성 활성(121.2~1,932.0 pg/mL; 7.8~124.6배 증진)으로 확인되었는데, 특히 10 µg/mL 농도에서는 1,358.0 pg/mL의 생성능(87.6배 증진)을 보여 동일농도의 PSK(736.8

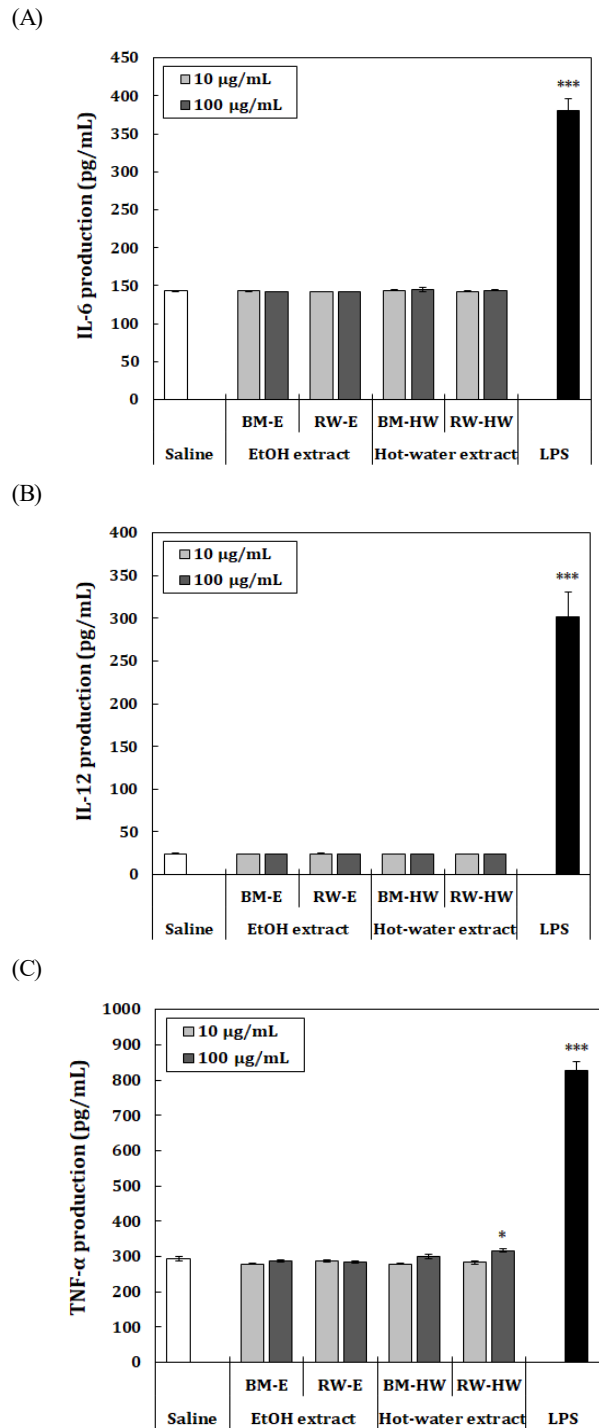


Fig. 3. Effect of ethanol and hot-water extracts on the production of IL-6 (A), IL-12 (B), and TNF-α (C) in murine peritoneal macrophages. Saline and LPS (1 µg/mL) were used as negative and positive control, respectively. Different asterisks on the column indicate significant difference between saline and each group by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Table 3. Component sugar of crude polysaccharide on HPLC analysis

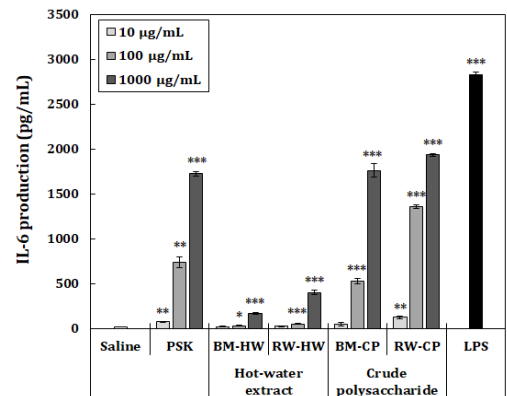
	BM-CP	RW-CP
Yield ¹⁾	3.3	4.2
Component sugar (mol%)		
Arabinose	16.1	5.0
Xylose	6.3	0.2
Fucose	0.1	0.1
Rhamnose	1.3	0.9
Mannose	0.3	0.2
Glucose	33.9	59.2
Galactose	7.1	4.5
Glucuronic acid	0.5	0.4
Galacturonic acid	34.5	29.5

After crude polysaccharide was prepared into PMP-sugar derivative, the component sugar was calculated as a mole % by comparison with the peak of the standards.

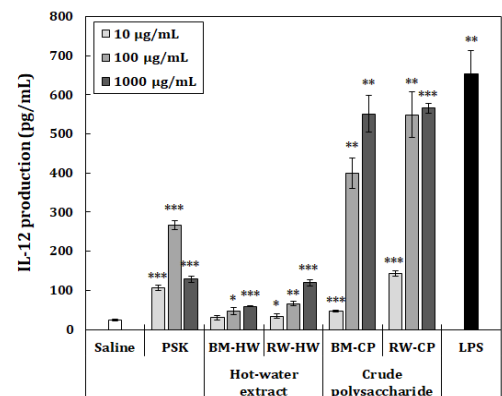
¹⁾ Yield (%w/w) was calculated against the raw materials (BM and RW).

pg/mL; 47.5배 증진)와 비교하여 약 1.8배 높은 활성으로 평가되었다(Fig. 4A). 다음으로 대식세포 활성화 관련 사이토카인으로 자연살해세포와 보조 T 세포의 성숙과 분화를 촉진하는 IL-12의 생성 활성을 평가한 결과는 Fig. 4B에 나타내었다. BM-HW와 RW-HW는 10~1,000 µg/mL 농도범위에서 각각 30.5~58.7 pg/mL 및 34.3~119.1 pg/mL의 농도-의존적인 IL-12 생성 증진활성을 나타냈으며, 이는 saline 대조군에 비해 각각 1.3~2.4배 및 1.4~4.9배 증가된 것으로 확인되었다. 조다당획분인 BM-CP와 RW-CP에서는 활성이 크게 증가하여 동일농도범위에서 각각 47.1~551.3 pg/mL(1.9~22.7배 증진) 및 142.5~565.1 pg/mL(5.9~23.2배 증진)을 보였는데, 이는 양성대조군인 PSK 대조군(4.3~10.9배 증진)에 비해서도 월등히 높은 활성으로 평가되었다. 마지막으로, 활성화된 대식세포에서 분비되어 변형세포의 자살(apoptosis)이나 바이러스 복제의 억제를 유도하는 TNF-α 생성능을 평가한 결과는 Fig. 4C에 나타내었다. 시료 대조군으로 사용된 PSK는 10~1,000 µg/mL의 농도범위에서 255.4~1,023.1 pg/mL의 TNF-α 생성능을 보여 saline 대조군 대비 19.1~76.4배의 증진으로 평가되었다. BM-HW와 RW-HW에서는 10~1,000 µg/mL 농도범위에서 각각 40.1~436.6 pg/mL(3.0~32.6배 증진) 및 42.7~624.5 pg/mL(3.2~46.6배 증진)의 농도-의존적인 TNF-α 생성 증진활성을 보였으나, PSK 대조군에 비해 상대적으로 낮은 수준으로 평가되었다. 하지만 이들로부터 분획된 조다당획분인 BM-CP 및 RW-CP에서는 활성이 크게 증가하여 71.9~880.0 pg/mL(5.4~65.7배 증진)과 217.4~720.5 pg/mL(16.2~53.8배 증

(A)



(B)



(C)

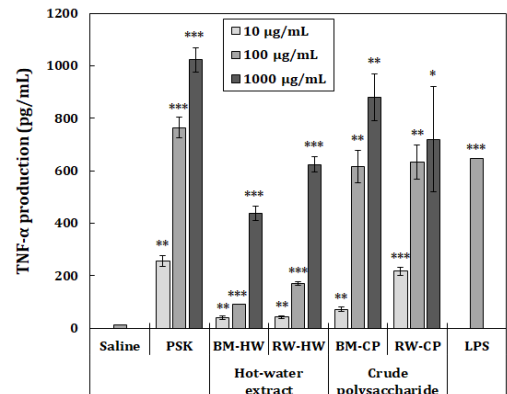


Fig. 4. Effect of ethanol and hot-water extracts on the production of IL-6 (A), IL-12 (B), and TNF-α (C) in murine peritoneal macrophage. Saline was used as negative control, whereas PSK (polysaccharide K) and LPS (1 µg/mL) were used as positive control, respectively. Different asterisks on the column indicated significant difference between saline and each sample by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

진)의 TNF- α 생성 증가를 보여주었으며, 이는 PSK 대조군과 비교하여 유사한 수준의 활성으로 사료될 수 있었다.

2종의 생약복합물인 BM과 RW로부터 조제된 용매추출물 4종과 조다당 획분 2종의 면역활성을 검토한 결과를 종합해 보면, 주정 및 열수추출물에서는 상대적으로 낮은 활성을 나타낸 반면, 조다당 획분에서 우수한 활성을 나타냈으며, 특히 RW-CP가 BM-CP보다 전반적으로 더 우수한 대식세포 자극활성을 나타낼 뿐만 아니라 시판 면역증강제로 사용되는 PSK보다도 높은 활성을 나타내기도 하였다. 따라서 생약복합물의 다당 또는 단백다당류 등의 고분자 물질에 의한 대식세포 자극활성은 면역계의 활성화에 관여하는 다양한 사이토카인 분비를 유도하여 생체의 면역반응과 면역조절 작용에 기여할 수 있음을 보여줌으로써 면역활성 기능성소재로서의 높은 활용 가능성을 기대해 볼 수 있다고 사료된다.

5. 면역활성 조다당획분의 구성당 분석

열수추출물의 주정 침전에 의해 분획되는 조다당획분에는 일반적으로 단백다당이나 다당류로 구성되어진 고분자 획분을 포함한다고 알려져 있기 때문에(Kim 등 2010), PMP-유도체화법을 통해 C18 칼럼이 장착된 HPLC-UVD를 이용하여 구성당을 분석하였다(Table 3). BM-CP에 포함되어 있는 주요 구성당으로는 galacturonic acid(GalA; 34.5%), glucose(Glc; 33.9%) 및 arabinose(Ara; 16.1%)가 확인되었으며, galactose(Gal; 7.1%) 및 xylose(Xyl; 6.3%)가 10% 미만으로 존재하는 것으로 나타났다. 하지만 rhamnose(Rha), glucuronic acid(GlcA), mannose(Man) 및 fucose(Fuc)는 상대적으로 미량 포함되어 있었다. RW-CP의 주요 구성당은 Glc와 GalA로 BM-CP와 유사하였으나, GalA는 다소 낮았으며 Glc는 현저히 높게 확인되었으며, Ara와 Xyl이 현저히 낮은 함량을 보여 RW-CP와 BM-CP는 서로 다른 다당류를 함유하고 있음을 확인할 수 있었다(Table 3). 즉, RW-CP에는 Glc와 GalA가 각각 59.2%와 29.5%로 가장 많은 함량을 차지하고 있었으며, Ara와 Gal은 5.0% 및 4.5%로 확인되었다. Rha, GlcA, Xyl, Man 및 Fuc는 1% 미만을 함유하는 것으로 나타났다. 구성당 결과를 종합해 봤을 때, 두 종류의 조다당획분에서 모두 높은 함량을 함유하고 있는 GlcA와 Glc는 일반적으로 식물 세포벽을 구성하는 성분으로 pectin의 구성성분으로 주쇄를 구성하는 homogalacturonan과 glucan의 일종인 β -glucan의 존재를 추측해 볼 수 있었으며(Burton 등 2010), Gal, Ara 및 Xyl의 존재를 통해 pectin 또는 hemicellulose의 구성성분으로 heterogalactan, hetero-arabinan 및 heteroxylan의 존재를 짐작해 볼 수 있었다(Kim 등 2016). 추후 다양한 chromatographic separation을 통한 조다당획분의 분획과 methylation analysis, mass chromatography 등의 추가적인 구조분석을 통해 BM-CP 및 RW-CP에 존재하는

다당의 정확한 구조규명이 필요할 것으로 사료된다(Kim 등 2017).

요약 및 결론

생약복합물을 기능성 식품 원료로 활용하기 위해 2종류의 생약복합물(BM 및 RW)을 조제하고 항산화, 항염증 및 면역증진 활성을 평가하였다. 2종의 생약복합물은 각각 주정추출물(BM-E 및 RW-E)과 열수추출물(BM-HW 및 RW-HW)로 조제되었다. 모든 추출물들은 50% 이상의 중성당을 함유하고 있었고, 총 폴리페놀 함량은 플라보노이드보다 높았다. 산성당과 단백질의 함량은 모든 추출물들에서 매우 낮은 함량을 나타냈으며, 에탄올 추출물의 라디칼 소거활성은 열수추출물보다 유의적으로 높았다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 추출물들의 항염증 활성은 독성이 없는 10-500 μ g/mL의 농도범위에서 평가되었다. 열수추출물에 비해 주정추출물은 유의적으로 높은 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 산화질소 억제 활성을 보였는데, 특히 BM-E가 모든 추출물들 중에 가장 우수한 효과를 나타내었다. 마우스 유래 복강 대식세포를 이용한 면역활성 평가에서는 열수추출물로부터 분획된 조다당획분(BM-CP 및 RW-CP)이 BM-HW와 RW-HW 또는 양성대조군으로 사용된 polysaccharide K (PSK)에 비해 유의적으로 증가된 활성을 보였으며, 특히, RW-CP가 BM-CP보다 우수한 활성으로 확인되었다. 구성당 분석 결과 BM-CP는 galacturonic acid, glucose, arabinose 및 galactose(각각 34.5%, 33.9%, 16.1% 및 7.1%)를 주로 포함하는 것으로 나타난 반면, RW-CP는 galacturonic acid, glucose, arabinose 및 galactose(각각 29.5%, 59.2%, 5.0% 및 4.5%)를 함유하여 다른 조성으로 확인되었다. 결론적으로, 본 연구의 2종 생약복합물은 추출방법 및 분획방법에 따라 다양한 생리활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

2020년 한국교통대학교와 (주)코시스바이오의 지원을 받아 수행하였습니다.

References

- Alazawi W, Pimadjud N, Lahiri R, Bhattacharya S. 2016. Inflammatory and immune responses to surgery and their clinical impact. *Ann Surg* 264:73-80
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:

- 484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat Chem Biol* 6:724-732
- Cao Y, Zhao D, Xu AT, Shen J, Ran ZH. 2015. Effects of immunosuppressants on immune response to vaccine in inflammatory bowel disease. *Clin Med J* 128:835-838
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99:381-387
- Conrad RE. 1981. Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. In Herscovitz BH, Holden HT, Ballanti JA, Ghaffar A (Eds.), *Manual of Macrophage Methodology*. pp.5-11. Marcel Dekker
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles O. 2003. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem* 51: 615-622
- Han SH, Lim JK. 2001. Effect of *Cnidium officinale* Makino aqua-acupuncture solution (COMAS) and *Cnidium officinale* Makino water-extracted solution (COMWS) on the induction of phase II detoxification enzymes. *J Korean AM-Meridian Pointol Soc* 18:13-18
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Hsieh YHP, Ofori JA. 2007. Innovations in food technology for health. *Asia Pac J Clin Nutr* 1:65-73
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520
- Jackman C, Tomay F, Duong L, Abdol Razak NB, Pixley FJ, Metharom P, Nelson DJ. 2017. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils. *Ageing Res Rev* 36: 105-116
- Kang MJ, Shin JH, Lee SJ, Chung MJ, Sung NJ. 2009. Effect of garlic and medicinal plants composites on the liver function and lipid metabolism of rats administered with ethanol during the short-term. *J Life Sci* 7:934-942
- Kim D, Ahn M, Jung J, Kwon S, Park EJ, Koo KH, Woo JM. 2015. Perspectives on the market globalization of Korean herbal manufacturers: A company-based survey. *Evid Based Complementary Alternat Med* 2015:515328
- Kim H, Hong HD, Shin KS. 2017. Structure elucidation of an immunostimulatory arabinoxylan-type polysaccharide prepared from young barley leaves (*Hordeum vulgare* L.). *Carbohydr Polym* 157:282-293
- Kim H, Kwak BS, Hong HD, Suh HJ, Shin KS. 2016. Structural features of immunostimulatory polysaccharide purified from pectinase hydrolysate of barley leaf. *Int J Biol Macromol* 87:308-316
- Kim H, Park CK, Jeong JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. 2010. Immune stimulation and anti-metastasis of crude polysaccharide from submerged culture of *Hericium erinaceum* in the medium supplemented with Korean ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1535-1542
- Kim SN, Li YC, Xu HD, Yi DG, Kim MS, Lee SP, Yi KT, Lee JK, Kim SJ, Kwon MS, Chang PS, Kwak BY. 2008. Phytoestrogenic effects of combined plant extracts on the change of bone metabolism of OVX rats. *Korean J Food Sci Technol* 40:316-320
- Kim YE, Lee YC, Kim HK, Kim CJ. 1997. Antioxidative effect of ethanol fraction for several Korean medicinal plant hot water extracts. *Korean J Food Nutr* 10:141-144
- Korea Health Supplements Association. 2016. Approved Functional Ingredients for Health Functional Foods in Korea (Individually Recognized by the Government). Available from http://khsa.or.kr/user/eng/Khsa.do?_menu=103 [cited 1 December 2020]
- Lee KH, Lee DJ, Kim SM, Je SH, Kim EK, Han HS, Han IK. 2005. Evaluation of effectiveness and safety of natural plant extract (estromon) on perimenopausal women for 1 year. *J Korean Soc Menopause* 11:16-26
- Lee KH, Rhee KH. 2015. Screening of anti-inflammatory herbs having the activation of MAPK family proteins. *Korean J Food Nutr* 28:343-350
- Lee SG, Jeong HJ, Lee EJ, Kim JB, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from

- medicinal herb mixtures. *Korean J Food Sci Technol* 43: 200-205
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Technol Metall* 40:255-260
- Park S, Yang MJ, Ha SN, Lee JS. 2014. Effective anti-aging strategies in an era of super-aging. *J Menopausal Med* 20: 85-89
- Rivera G, Bocanegra-García V, Monge A. 2010. Traditional plants as source of functional foods: A review. *CyTA J Food* 8:159-167
- Ryu JY, Park JY, Sung AD, Sung SH, 2020. The utilization of traditional herbal medicine for treatment in traditional Korean medicine clinics. In Hassan B (Ed.), *Medicinal Plants: Use in Prevention and Treatment Diseases*. pp.82-92. IntechOpen
- Stanković MS. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci* 33:63-72
- Suh MG, Choi HS, Cho K, Park SS, Kim WJ, Suh HJ, Kim H. 2020. Anti-inflammatory action of herbal medicine comprised of *Scutellaria baicalensis* and *Chrysanthemum morifolium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 84:1799-1809
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, AkberAisa H. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190
- Tzianabos O. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 13:523-533
- Yang Y, Zhang Z, Li S, Ye X, Li X, He K. 2014. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* 92:133-147
-

Received 02 December, 2020

Revised 26 December, 2020

Accepted 11 January, 2021