

질경이 추출물의 항산화 및 항염증 활성

최유경** · 추병길*

Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Plantago asiatica* L. Extract

Choi, Yukyung · Choo, Byung-Kil

Plantago asiatica L. (*P. asiatica*) is a perennial plant belonging to the plantaginaceae and is useful in treating a various diseases such as wounds, bronchitis, and chronic constipation. The bioactive effects of *P. asiatica* extract was evaluated to determine its potential for use as a variety materials in the food, pharmaceutical, and agricultural industries. Polyphenol and flavonoid contents, free radical scavenging, reducing power activity, and reactive oxygen species (ROS) expression were measured to identify the antioxidative activity. Anti-inflammatory effects were evaluated via analysis of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cell. As a result of measuring the antioxidant activities of the *P. asiatica* extract, the total polyphenol content was 50.91 ± 0.78 mg gallic acid equivalents/g and the flavonoid content was 100.99 ± 0.44 mg rutin equivalents/g, and both DPPH and ABTS radical scavenging activities and reducing power increased depending on the concentration. Also, intracellular ROS production was inhibited by the *P. asiatica* extract. No cytotoxicity was observed when *P. asiatica* extract was treated, and NO and inflammatory protein expression were inhibited, and nuclear factor kappa B (NF- κ B) phosphorylation was also inhibited in a concentration-dependent manner. In conclusion, *P. asiatica* is a functional natural resources of antioxidant and anti-inflammatory agents that can be used in various industries, including food and agriculture.

Key words : *Plantago asiatica* L. anti-inflammatory, antioxidant, functional materials, NF- κ B

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

** 숙명여자대학교 약학대학 약학연구소

I. 서 론

최근 우리나라에서는 AI, 설사, 호흡기질환 등의 면역체계와 관련된 가축 질병의 빈번한 발생으로 축산농가에서의 폐사와 생산성 감소로 인한 경제·사회적 피해가 야기되고 있으며, 이에 따른 항생제 대체물질의 개발과 질병에 대한 면역력 증강, 항산화 및 항바이러스 등의 기능성을 갖춘 사료첨가제, 동물약품 개발 및 원천기술 개발 연구가 요구되고 있다(Kiarie and Mills, 2019; Chuang et al., 2021). 이러한 질병을 유발하는 원인 중 nitric oxide (NO)와 reactive oxygen species (ROS)는 염증 반응에서 중요한 역할을 하며, 과도한 생성은 산화 스트레스 유발 및 DNA, 단백질 변형 등의 세포 손상으로 이어질 수 있다(Huang et al., 2013).

항산화제는 ROS 발생으로 인한 손상으로부터 보호할 수 있으며(Nagaiyothi et al., 2015), 이는 크게 합성 항산화제와 천연 항산화제로 나눌 수 있다. 합성 항산화제의 경우 탁월한 효과가 있지만, 장기 복용 시 동반되는 부작용과 안정성의 문제로 천연 항산화제에 대한 개발의 필요성이 더욱 대두되고 있다(Sánchez, 2017; Choi et al., 2020). 대부분의 식물에는 항산화 작용을 하는 페놀성 화합물이 다량으로 존재하기 때문에 이를 선별하여 개발하는 것이 효율적일 것이다(Bubonja-Sonje et al., 2011).

염증은 감염 및 조직 손상과 같은 유해한 자극 및 조건에 의해 유발되는 반응이며 급성 뇌졸중, 고혈압 및 암을 포함한 다양한 질병을 일으키는 주요 원인이다(Medzhitov, 2008; Schmid-Schönbein, 2006). 염증 반응에서 lipopoly-saccharide (LPS)로 자극된 대식세포는 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 전사인자를 활성화하여 염증 매개체인 nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 등의 발현을 촉진한다(Kang et al., 2011; Huang et al., 2015). 이를 완화하기 위해 주로 쓰이는 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)는 효과적일 수 있지만 천연의약품이 특히 장기간 사용 시 더 안전하고 효과적인 대체 치료법일 수 있다(Maroon et al., 2010).

질경이(*Plantago asiatica* L.)는 질경이과(Plantaginaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 전국의 산야, 길가 또는 건물 주변 등에 자생하고 있으며, 식품 원료로 사용이 가능한 식물이다(Jeong et al., 2004). 한국, 중국, 일본에서는 민간 약재로 흔히 사용되며, 질경이 추출물은 상처, 콜레스테롤혈증, 설사, 기관지염 및 만성 변비와 같은 다양한 질병을 치료하는 데 사용되었다(Chathuranga et al., 2019). 한방에서는 차전초(车前草)라 불리며 요혈(尿血), 강심(強心), 임질(淋疾), 태독(胎毒), 난산(難産)등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Park et al., 2011). Jeong 등(2004)과 Park 등(2011)에 의해 항산화 활성 및 항균 활성이 보고되었으나, 질경이 추출물의 염증에 관한 생리활성 연구는 아직 부족한 실정이다.

본 연구에서는 질경이 에탄올 추출물을 통해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH 및 ABTS radical 소거능, 환원력과 세포 내 ROS 측정을 통해 항산화 활성을 확인하고, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포를 이용하여 NO 생성량과 염증성 단백질(iNOS, COX-2), NF- κ B

(NF- κ B, I κ B- α)의 발현량 측정을 통해 기능성을 평가하여 산업화 소재로서의 가능성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출

본 실험에 사용된 질경이는 강원도 인제군에서 재배된 건조된 시료를 구입하여 사용하였다. 이를 분쇄하여 분말 10 g에 70% 에탄올 100 mL을 가하고 각 2시간씩 3회 추출한 후 여과하였다. 추출물은 45°C에서 회전 감압농축기 (JP/N-1000x, EYELA)를 사용하여 농축 후 동결건조하였다. 분말 시료를 dimethyl sulfoxide에 녹여 50 mg/mL의 stock 용액을 -20°C에 보관하여 분석시료로 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis 법을 참고하여 분석하였다(Appel et al., 2001). 질경이 추출 시료(1 mg/mL) 25 μ L와 10% folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L를 첨가하고 차광 상태로 5분간 반응시켰다. 7.5% sodium carbonate 500 μ L를 첨가한 후 1시간 동안 37.5°C에서 반응시켰다. Microplate reader (Multiscan spectrum, Thermo Scientific)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. GAE (Gallic acid equivalent)를 기준으로 검량선을 작성한 후 이를 기준으로 질경이 추출 시료의 총 페놀 함량을 계산하였다.

3. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 법을 참고하여 분석하였다(Choi et al., 2020). 질경이 추출 시료(1 mg/mL) 300 μ L에 diethylene glycol 600 μ L를 첨가하고 차광 상태로 5분간 반응시켰다. 1N NaOH 10 μ L를 첨가하여 1시간 동안 37.5°C에서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, rutin을 표준물질로 하여 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

4. DPPH radical 소거능 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거능을 정량화하기 위해 질경이 추출 시료

농도별(100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL 와 DPPH 100 μL 를 혼합한 후 차광 상태로 30분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = [(A_b - A_s) / A_b] \times 100 \quad (1)$$

A_b : 무처리구 흡광도

A_s : 시료처리구 흡광도

5. ABTS radical 소거능 측정

ABTS (2,2'-azino-bis-3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical 소거능은 ABTS 용액(7 mM)과 potassium persulfate (2.45 mM)을 2:1의 비율로 혼합하고, 차광 상태로 12~16시간 반응시켜 ABTS 양이온(ABTS^+)을 형성하고, 100% ethanol로 희석하여 734 nm에서 0.70 ± 0.02 의 흡광도를 얻었다. 100 μL 의 질경이 추출 시료와 900 μL 의 ABTS 용액을 혼합한 후 차광 상태로 3분 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{ABTS radical 소거능(\%)} = [(A_b - A_s) / A_b] \times 100 \quad (2)$$

A_b : 무처리구 흡광도

A_s : 시료처리구 흡광도

6. 환원력 측정

환원력 측정을 위해 질경이 추출 시료 100 μL 에 0.2 M sodium phosphate (pH 6.6) 100 μL 를 넣고 5분간 반응시킨 후, 50°C 항온기에서 1% potassium ferricyanide 100 μL 를 넣고 20분간 가열하였다. 이 혼합물에 10% trichloroacetic acid 100 μL 를 넣은 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 100 μL 의 상층액을 얻은 후, 증류수 100 μL 와 0.1% ferric chloride 10 μL 를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin (1 mM)이 표준으로 사용되었다.

7. 세포 배양

마우스 대식세포인 RAW 264.7은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입했다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum와 1% penicillin/streptomycin이

첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)을 사용하였으며, 세포는 5% CO₂, 37.5°C 조건의 incubator에서 배양하였다.

8. 세포 생존율 측정

RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/mL의 농도로 96 well plate에 24시간 배양한 후 각각의 well에 질경이 추출 시료(50, 100, 200 µg/mL)를 첨가하였다. 1시간 후에 LPS (1 µg/mL)를 첨가하고, 18시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 Ez Cytos Assay Kit (DoGenbio, Seoul, Korea)를 사용하여 측정되었다.

9. 세포 내 ROS 측정

RAW 264.7 세포를 3×10^5 cells/mL의 농도로 96 well black plate에 24시간 동안 배양하였다. 질경이 추출 시료는 50 µL씩 농도별(50, 100, 200, 400 µg/mL) 처리하였다. 1시간 후 LPS (1 µg/mL)를 첨가하여 8시간 동안 배양하였다. 1 mM의 DCFH₂-DA를 100 µL씩 투여 후 30분 후 multimode microplate reader (PerkinElmer, EnSpire)를 이용하여 형광강도를 측정하였다.

10. Nitric Oxide 생성량 측정

Nitric oxide (NO) 생성량은 Griess 방법을 사용하여 측정되었다. 질경이 추출시료와 LPS 처리 후 인큐베이터에서 18시간 동안 반응시킨 후 원심분리하고 상층액 50 µL에 1% sulfanilamide 50 µL를 넣고 7분간 차광시킨 후 0.1% N-1-naphthylethylenediamine 50 µL를 넣고 7분간 차광시켰다. 흡광도는 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 측정되었다. NO 생성은 sodium nitrite의 표준 곡선을 사용하여 계산되었다.

11. 세포의 형태학적 변화

RAW 264.7 세포의 LPS와 질경이 추출 시료 처리 시 형태학적 변화를 관찰하기 위해 96 well plate에 3×10^5 cells/mL의 농도로 세포를 인큐베이터에 배양하였다. 24시간 배양 후, 질경이 추출 시료(100, 200 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 18시간 동안 배양하였다. Nikon eclipse TS100 위상차현미경(Nikon Instruments Inc. Melville, NY, USA) 및 HK Basic 3.7 program (Koptics)을 이용해 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

12. 세포 단백질 추출

RAW 264.7 cell을 6 well plate에 5×10^5 cells/mL 및 1×10^6 cells/mL의 농도로 배양 후 질경이 추출 시료(100, 200 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하였다. 1시간 후 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 첨가하여 18시간 또는 1시간 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 2회 세척한 후 세포 단백질 추출을 위해 EzRIPA lysis buffer를 가하여 30 min 동안 ice에 보관한 뒤 상등액을 수집하여 분석용 시료로 사용하였다.

13. Western Blotting

단백질은 bio-rad protein assay reagent (Santa Cruz, CA, USA)을 사용하여 정량하였으며, loading sample은 Laemmli sample buffer를 사용하여 제조하였다. 단백질은 Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide 겔 전기영동을 이용하여 단백질을 크기별로 분리하고 100V에서 1시간 15분 동안 transfer 후, skim milk를 이용하여 1시간 30분 동안 blocking 하였다. 1×PBST를 사용하여 세척 후 4°C에서 1차 항체(1:1,000)를 overnight 하였다. 2차 항체(1:10,000)를 상온에서 1시간 30분 동안 반응 후 western blotting luminol reagent A&B (Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 발색시켰다. 단백질 발현은 image software (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)를 사용하여 확인하였다.

14. 통계처리

모든 통계 분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 소프트웨어(SPSS Inc., IL, USA)를 사용하여 one-way ANOVA 분석과 LSD 사후분석을 하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정되었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

식물에 존재하는 페놀 화합물은 항산화 및 항균 활성을 포함한 다양한 생리활성을 갖고 있으며, 자유 라디칼을 제거하여 이로 인한 손상으로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있다 (Bubonja-Sonje et al., 2011). 이러한 항산화 활성을 나타내는 페놀 화합물의 함유량을 확인하기 위해 질경이 추출물에서의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과, 1 mg/mL 농도에서

50.91±0.78 mg GAE/g으로 나타났다(Table 1). 플라보노이드는 식물에서 분리된 페놀성 물질 중 하나로 항알레르기, 항바이러스, 항염증 및 항산화를 포함한 다양한 생물학적 활성을 가지고 있다(Pietta, 2000). 질경이 추출물의 총 플라보노이드 함량 측정 결과, 1 mg/mL 농도에서 100.99±0.44 mg rutin/g으로 나타났다(Table 1). 페놀 화합물의 함유량 측정 결과를 통해 질경이 추출물에서 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 나타남을 확인하였으며, 폴리페놀 함량에 비해 플라보노이드 함량이 더 높게 확인되었다.

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of *P. asiatica*

<i>P. asiatica</i> (1 mg/mL)	Polyphenol (mg GAE/g)	Flavonoid (mg rutin/g)
Contents	50.91±0.78	100.99±0.44

2. DPPH 및 ABTS radical 소거능

DPPH와 ABTS radical 분석은 천연물의 항산화 활성을 확인하기 위해 광범위하게 사용되는 가장 안정적인 방법이다(Sridhar et al., 2019). DPPH radical은 항산화제에 의해 환원되면 안정한 DPPH 분자가 되어 짙은 보라색에서 옅은 노란색으로 색상이 변한다(Sirivibulkovit et al., 2018). 이를 이용하여, DPPH radical 소거능은 517 nm에 대한 흡광도를 비교하여 계산하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid의 항산화 활성을 측정하였고, 질경이 추출물의 100, 200, 400 µg/mL 농도에서 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 각각 21.5%, 43.9%, 83.1%으로 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 1a). Ryu 등의 연구에서 질경이 추출물 400 µg/mL에서 90%의 소거활성을 보인 연구결과와 유사한 활성을 보였다.

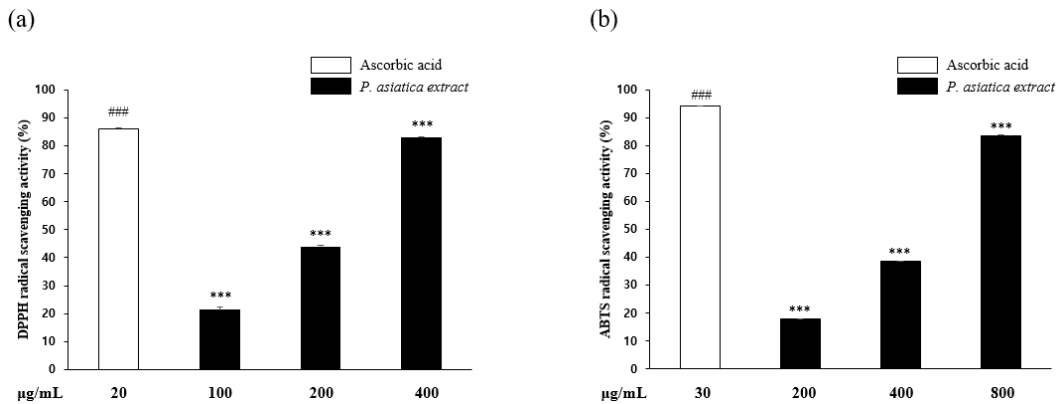


Fig. 1. DPPH (a) and ABTS (b) radical scavenging activities of *P. asiatica* extract. Data represent mean ± SD. Significant difference at ***p < 0.001 compared with untreated control.

ABTS 분석은 양이온 라디칼에 대한 시료의 항산화 활성을 측정하는 방법으로(Erel, 2004), ABTS와 potassium persulfate의 반응을 통해 청색 ABTS+를 생성시킨 후, 항산화 활성에 따른 탈색 정도를 분광광도계를 사용하여 계산하였다(Re et al., 1999). 질경이 추출물의 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 ABTS radical 소거능은 각각 17.7%, 38.5%, 83.6%으로 농도 의존적으로 증가했다(Fig. 1b).

3. 환원력 측정

항산화 작용은 수소 원자의 공여를 통해 자유 라디칼 사슬 간의 반응을 차단함으로써 나타나는 것으로 화합물의 환원 능력은 잠재적인 항산화 활성의 중요한 지표 역할을 할 수 있다(Habtemariam, 2007). 최근 발표된 질경이 추출물 항산화 연구 결과에서는 폴리페놀, 플라보노이드, DPPH 라디칼 소거능 측정 결과를 통해 항산화 활성 정도를 평가하였으나 중요한 지표 중 하나인 환원 능력에 대한 검증은 확인되지 않았다. 따라서, 질경이 추출물의 정확한 항산화 활성 분석을 위해 본 연구에서는 질경이 추출물의 환원력을 평가하였다. 환원력 측정 결과, 질경이 추출물의 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 29.3%, 46.6%, 78.2%의 환원력을 보였다(Fig. 2).

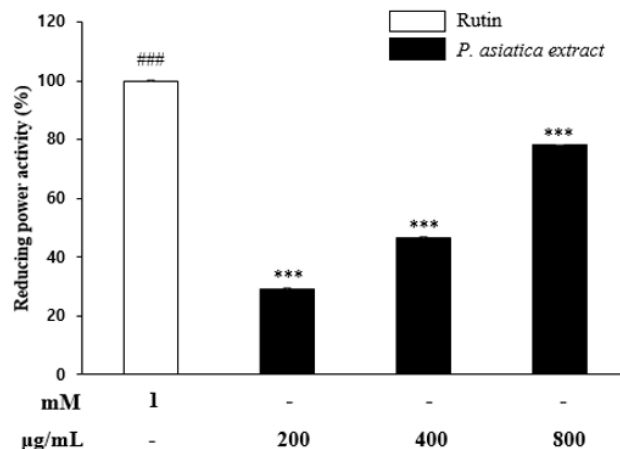


Fig. 2. Reducing power activity of *P. asiatica* extract. Data represent mean \pm SD. Significant difference at *** $p < 0.001$ compared with untreated control.

4. 세포 내 ROS 측정

세포 내에서 질경이 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해, 손상이 유도된 대식세포에서 질경이 추출물 처리에 의한 ROS 생성량을 측정하였다. ROS는 항상성을 유지하는 데 필

수적인 역할을 하지만, 산화스트레스가 유발되면 ROS가 생성된다. 과도한 ROS 생성은 단백질과 세포의 변형 및 손상을 일으키며 체내 세포의 정상적인 기능 발현에 장애를 초래한다(Nam et al., 2021). LPS로 손상이 유도된 RAW 264.7 세포에서는 일반 세포에 비해 ROS 생성이 유의미하게 증가하였으며, 질경이 추출물 50, 100, 200, 400 µg/mL를 처리했을 때 손상이 유도된 처리군에 비해 84.4%, 68.9%, 45.8%, 25.8%로 ROS 생성량이 농도 유의미하게 점차 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

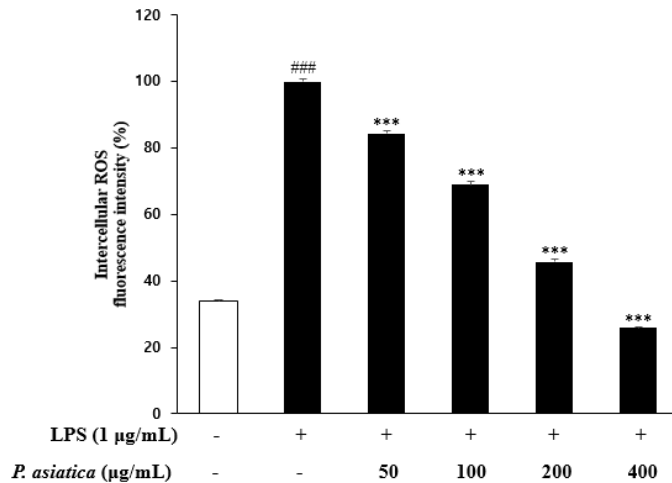


Fig. 3. Effect of *P. asiatica* extract on ROS production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Data represent mean ± SD. Significant difference at ###p < 0.001 compared with normal control, ***p < 0.001 compared with LPS control.

5. 세포 생존율

질경이 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 EzCyttox Assay Kit를 이용하여 생존율을 측정하였다. 본 실험 결과, 질경이 추출물 50, 100, 200 µg/mL에서 RAW 264.7 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 4a).

6. Nitric Oxide 생성량 측정

NO는 염증에서 중요한 역할을 하는 신호 분자이지만, 과발현 시 다양한 형태의 염증, 쇼크 및 발암을 비롯한 다양한 질병을 유발시킬 수 있다(Mayer et al., 1997; Lee et al., 2007). 본 연구에서는 LPS 유도 RAW 264.7 세포를 질경이 추출물을 처리하여 NO 생성에 대한 질경이 추출물의 억제 효과를 평가하였다. 정상세포에 비해 LPS로 처리된 세포에서는 NO 생

성이 유의하게 증가하였으며, LPS 및 질경이 추출물로 처리된 세포에서는 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4b).

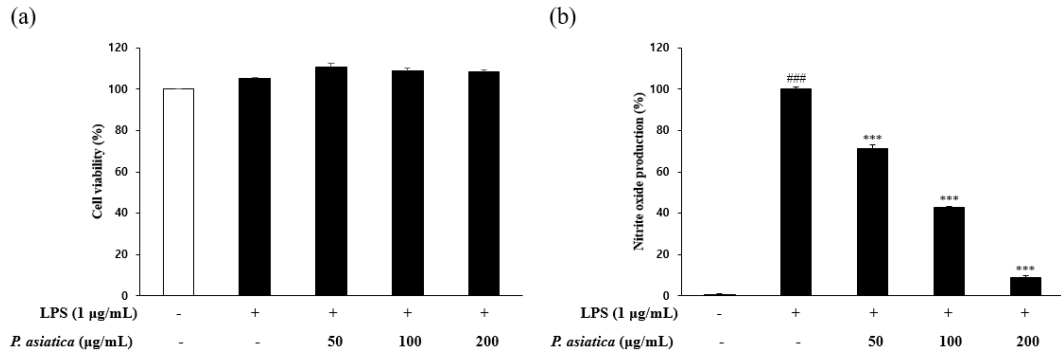


Fig. 4. Effects of *P. asiatica* extract on cell viability (a), NO production (b) in LPS (1 µg/mL) induced RAW 264.7 cells. Data represent mean ± SD. Significant difference at ###p < 0.001 compared with normal control, ***p < 0.001 compared with LPS control.

7. 세포의 형태학적 변화

RAW 264.7 세포에 LPS와 추출물을 처리하였을 때 정상세포 대비 LPS 처리와 추출물 처리에 의한 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다(Fig. 5). 정상세포에 비해 LPS로 처리된 세포에서 손상으로 인한 유의미한 형태학적 변화가 관찰되었으나, 이러한 형태학적 변화는 질경이 추출물 처리군에서 농도 유의미하게 감소되는 것을 확인하였다.

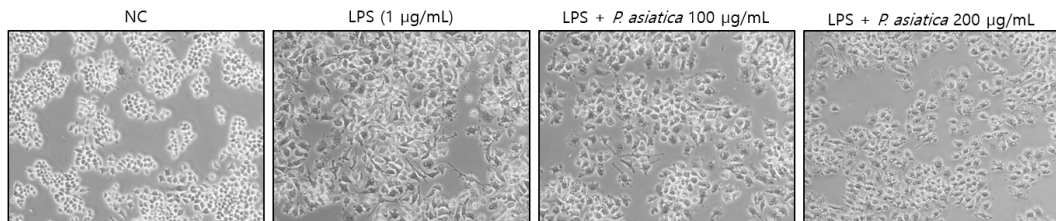


Fig. 5. Effect of *P. asiatica* extract on morphological transformation.

8. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과

Inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 일반적으로 NO를 생성하는 염증 과정에서 중요한 역할을 한다(Fang et al., 2021). 본 연구에서는 LPS 처리로 인해 염증이 유도된 세포 내에서 질경이 추출물 처리에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 억제 효과

를 확인하였다(Fig. 6). 질경이 추출물(100, 200 µg/mL)을 처리하였을 때 LPS 처리군에 비해 iNOS와 COX-2 발현 정도가 농도 의존적으로 유의하게 감소했다. iNOS와 COX-2 발현량은 NO 생성량 변화와 유사하게 나타났으며, 이러한 결과는 질경이 추출물이 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 각각 억제함으로써 NO의 과발현을 조절함으로써 항염증 효과를 나타낸 것으로 확인된다.

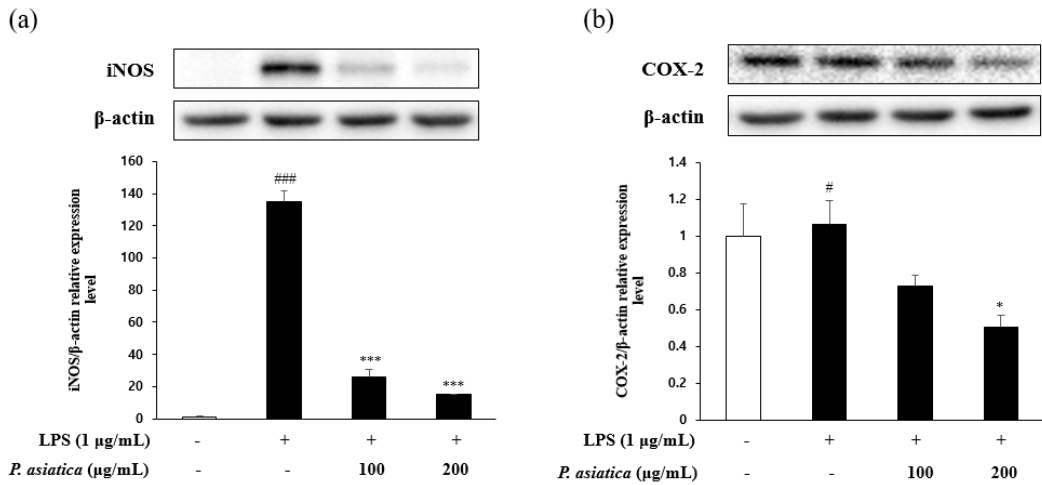


Fig. 6. Effects of *P. asiatica* on expression level of iNOS (a) and COX-2 (b) in LPS (1 µg/mL) induced RAW 264.7 cells. Data represent mean ± SD. Significant difference at ^{###}p < 0.001 and [#]p < 0.05 compared with normal control, ^{***}p < 0.001 and ^{*}p < 0.05 compared with LPS control.

9. NF-κB 및 IκB-α 인산화 억제 효과

Nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 전염증성 사이토카인, 케모카인, 세포 사멸 단백질 및 성장 인자를 조절하는 중앙 형성의 촉진제이다(Umeslma et al., 2010). 정상적인 조건에서, NF-κB는 억제 단백질 IκB-α에 결합하고 세포질에 존재하지만, LPS와 같은 외부 자극으로 인해 인산화 및 염증 매개체의 전사가 촉진된다(Surh et al., 2001). 따라서 NF-κB 신호 전달 경로의 억제는 염증성 질환의 효과적인 치료 전략이 될 수 있다(Fang et al., 2021). 본 연구에서는 LPS 유도 RAW 264.7 세포를 질경이 추출물로 처리하였을 때 NF-κB와 IκB-α의 인산화 억제 정도를 평가하였다(Fig. 7). LPS가 처리된 그룹에서 NF-κB와 IκB-α의 인산화 수준은 정상군에 비해 증가하였으며, 질경이 추출물(100, 200µg/mL) 처리에 의해 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과는 질경이 추출물이 NF-κB의 신호 전달 경로를 억제하여 항염증 활성을 보이는 것으로 사료된다.

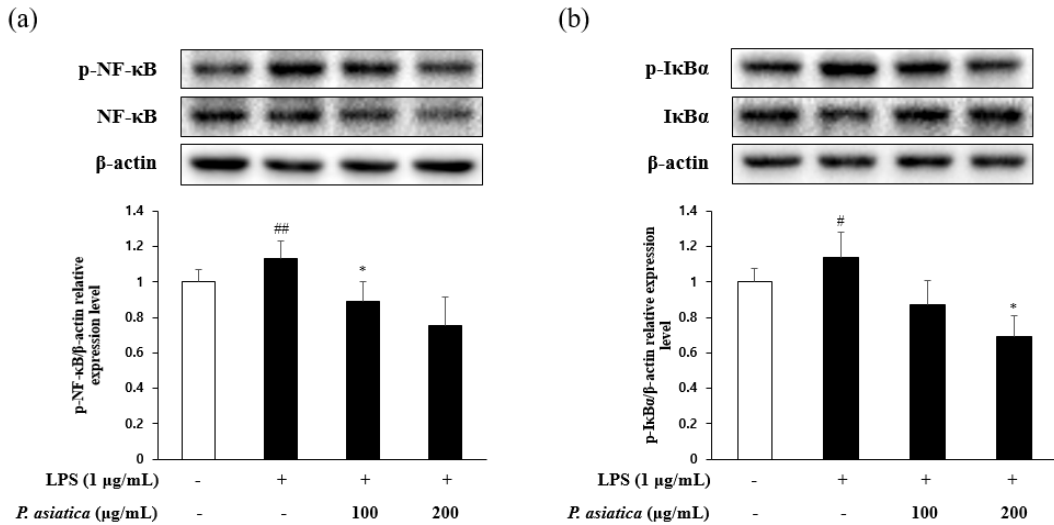


Fig. 7. Effects of *P. asiatica* on phosphorylation level of NF-κB (a) and IκB-α (b) in LPS (1 μg/mL) induced RAW 264.7 cells. Data represent mean ± SD. Significant difference at ^{##} $p < 0.01$ and [#] $p < 0.05$ compared with normal control, ^{*} $p < 0.01$ compared with LPS control.

IV. 적 요

본 연구에서는 페놀 화합물, 라디칼 소거능, 환원능력 분석 및 세포 내 ROS 측정을 통해 질경이 추출물의 항산화 능력을 확인하였다. 질경이 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 50.91 ± 0.78 mg GAE/g, 100.99 ± 0.44 mg rutin/g으로 나타났으며, DPPH 및 ABTS radical 소거능과 환원력 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 또한, 세포 내 ROS는 질경이 추출물에 의해 생성이 억제됨을 확인하였다. 항염증 활성은 RAW 264.7 세포를 이용하여 염증을 유도한 뒤 NO 측정과 western blot 분석을 통해 염증성 단백질 발현량을 확인하였다. 질경이 추출물은 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 NF-κB의 신호 전달 경로를 억제하여 염증성 단백질인 iNOS 및 COX-2의 발현량을 조절하였으며, 이로 인해 NO의 생성량을 억제하였다. 본 실험 결과를 통해 질경이 추출물의 항산화 및 항염증에 대한 우수한 활성을 확인하였으며, 식의약품 분야를 비롯한 농산업 분야에서 다양한 기능성 천연 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Appel, H. M., H. L. Govenor, M. D'ascenzo, E. Siska, and J. C. Schultz. 2001. Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *Journal of chemical ecology*. 27(4): 761-778.
2. Bubonja-Sonje, M., J. Giacometti, and M. Abram. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*. 127(4): 1821-1827.
3. Chaturanga, K., M. S. Kim, H.-C. Lee, T.-H. Kim, J.-H. Kim, W. Gayan Chaturanga, P. Ekanayaka, H. Wijerathne, W.-K. Cho, and H. I. Kim. 2019. Anti-respiratory syncytial virus activity of *Plantago asiatica* and *Clerodendrum trichotomum* extracts in vitro and in vivo. *Viruses*. 11(7): 604.
4. Choi, Y. N., Y. K. Choi, L. Nan, and B. K. Choo. 2020. Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from *Leonurus japonicus* Houtt. on LPS-induced RAW 264.7 Cells. *Korean J. Organic Agric*. 28(4): 659-677.
5. Chuang, W. Y., L. J. Lin, H. D. Shin, Y. M. Shy, S. C. Chang, and T. T. Lee. 2021. The Potential Utilization of High-Fiber Agricultural By-Products as Monogastric Animal Feed and Feed Additives: A Review. *Animals*. 11(7): 2098.
6. Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 37(4): 277-285.
7. Fang, Y., L. Yang, and J. He. 2021. Plantanone C attenuates LPS-stimulated inflammation by inhibiting NF- κ B/iNOS/COX-2/MAPKs/Akt pathways in RAW 264.7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 143: 112104.
8. Habtemariam, S. 2007. Antioxidant activity of Knipholone anthrone. *Food chemistry*. 102(4): 1042-1047.
9. Huang, B.-P., C.-H. Lin, H.-M. Chen, J.-T. Lin, Y.-F. Cheng, and S.-H. Kao. 2015. AMPK activation inhibits expression of proinflammatory mediators through downregulation of PI3K/p38 MAPK and NF- κ B signaling in murine macrophages. *DNA and cell biology*. 34(2): 133-141.
10. Huang, S.-S., C.-S. Chiu, T.-H. Lin, M.-M. Lee, C.-Y. Lee, S.-J. Chang, W.-C. Hou, G.-J. Huang, and J.-S. Deng. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract of *Centipeda minima*. *Journal of Ethnopharmacology*. 147(2): 395-405.
11. Jeong, C.-H., Y.-I. Bae, K.-H. Shim, J.-S. Choi. 2004. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of plantain (*Plantago asiatica* L.) extracts. *Journal of the Korean*

- Society of Food Science and Nutrition. 33(10): 1601-1605.
12. Jung, Y. H., M. J. Ryu, Y. H. Jung, and M. J. Ryu, 2018. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Codonopsis lanceolata* skin extracts. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*. 16(3): 347-357.
 13. Kang, S. R., K. I. Park, H. S. Park, D. H. Lee, J. A. Kim, A. Nagappan, E. H. Kim, W. S. Lee, S. C. Shin, and M. K. Park. 2011. Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chemistry*. 129(4): 1721-1728.
 14. Kiarie, E. G. and A. Mills. 2019. Role of Feed Processing on Gut Health and Function in Pigs and Poultry: Conundrum of Optimal Particle Size and Hydrothermal Regimens. *Front Vet Sci*. 19: 19.
 15. Lee, M. H., J. M. Lee, S. H. Jun, S. H. Lee, N. W. Kim, J. H. Lee, N. Y. Ko, S. H. Mun, B. K. Kim, and B. O. Lim. 2007. The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. *Journal of ethnopharmacology*. 112(1): 49-54.
 16. Maroon, J. C., J. W. Bost, and A. Maroon. 2010. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical neurology international* 1.
 17. Mayer, B. and B. Hemmens, 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences*. 22(12): 477-481.
 18. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428-435.
 19. Nagajyothi, P., S. J. Cha, I. J. Yang, T. Sreekanth, K. J. Kim, and H. M. Shin. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 146: 10-17.
 20. Nam, H. H., L. Nan, and B. K. Choo. 2021. Inhibitory effects of *Camellia japonica* on cell inflammation and acute rat reflux esophagitis. *Chinese Medicine*. 16: 1-12.
 21. Nan, L., C.-H. Lee, Y.-N. Choi, and B.-K. Choo. 2019. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from aerial part of *Coriandrum sativum* L. *Korean Journal of Organic Agriculture*. 27(4): 513-528.
 22. Park, S.-J., E.-H. Sihm, and C.-A. Kim. 2011. Component Analysis and Antioxidant Activity of *Plantago asiatica* L. *Korean Journal of Food Preservation*. 18(2): 212-218.
 23. Pietta, P.-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63(7): 1035-1042.

24. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 26(9-10): 1231-1237.
25. Ryu, M. J. and S. Y. Lee. 2010. Antioxidant effects of *Plantago asiatica* and protective effects on Human HaCaT Keratinocyte. *Journal of the Korea Soc. Beauty and Art*. 11: 15-25.
26. Sánchez, C. 2017. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and systems biotechnology*. 2(1): 13-22.
27. Schmid-Schönbein, G. W. 2006. Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8: 93-151.
28. Sirivibulkovit, K., S. Nouanthavong, and Y. Sameenoi. 2018. based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical sciences*: 34(7): 795-800.
29. Sridhar, K. and A. L. Charles. 2019. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*. 275: 41-49.
30. Surh, Y.-J., K.-S. Chun, H.-H. Cha, S.S. Han, Y.-S. Keum, K.-K. Park, and S. S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 480: 243-268.
31. Umesalma, S. and G. Sudhandiran. 2010. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 107(2): 650-655.