

FARFARE FLOS의 항산화 기전을 통한 산화적 스트레스 및 염증 반응 억제효과

신승안 · 이민자¹ · 이혜숙 · 박원환*

동국대학교 한의과대학 진단학교실, 1: 한의학연구소

Suppressive Effect of *FARFARE FLOS* Extracts on Oxidative Stress and Inflammatory Response through the Antioxidative Mechanism

Seung-An Shin¹, Min-Ja Lee¹, Hye-Sook Lee, Won-Hwan Park*

Department of Diagnostics 1: Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

There is currently increased interest in the identification of antioxidant compounds that are pharmacologically potent and have low or no side effects. Plants produce significant amounts of antioxidants to prevent the oxidative stress caused by photons and oxygen, therefore they represent a potential source of new compounds with antioxidant activity. FARFARE FLOS has been frequently used on the respiratory system including bronchitis, phthisis. In this study, the antioxidant activity of extract from FF was studied in vitro methods by measuring the antioxidant activity by TEAC, measuring the scavenging effects on reactive oxygen species (ROS) [superoxide anion, hydroxyl radical] and on reactive nitrogen species (RNS) [nitric oxide and peroxynitrite] as well as measuring the inhibitory effect on Cu²⁺-induced human LDL oxidation. The FF extracts were found to have a potent scavenging activity, as well as an inhibitory effect on LDL oxidation. And this study was designed to evaluate whether FFEA may ameliorate oxidative stress and inflammatory status through the antioxidative mechanism in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. Treatment of RAW 264.7 cells with FFEA significantly reduced LPS-stimulated inflammatory response in a dose-dependent manner. In conclusion, the FF extracts have anti-oxidative and anti-inflammatory effects in vitro system, which can be used for developing pharmaceutical drug against oxidative stress and atherosclerosis.

Key words : *FARFARE FLOS*, oxidative stress, ROS & RNS, antioxidative, anti-inflammatory, RAW 264.7 cell

서 론

2009년 통계청 자료에 따르면 우리나라 사망원인의 2위와 3위가 뇌혈관질환 및 심장질환인 것으로 발표되어 순환기계질환에 의한 사망률이 전체의 31%를 차지하였다¹⁾. 순환기계질환은 오랜 시간에 걸쳐 서서히 진행되는 만성 퇴행성질환으로 주로 동맥경화와 관련되어 있다. 동맥경화는 지질대사와 관련된 유전적 요인과 식습관, 흡연, 운동부족 등 환경적 요인에 의하여 동맥이 경화되는 질환이다. 동맥경화의 발병에 관한 가설 중 하나는 '산화적 스트레스(oxidative stress)'에 의한 것으로 산화적 스트레스란 세포 내 항산화 방어계(antioxidant defense system)와 활

성산소종(reactive oxygen species; ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS) 간의 불균형이 초래될 때 생성된다. 이는 심혈관계 기능이상, 동맥경화, 염증성 반응, 발암, 약물 독성, 허혈성 질환 및 신경 퇴행성 질환과 같은 여러 만성 퇴행성 질환에 있어 중요한 요인이 되는 것으로 알려져 있다²⁾. ROS와 RNS는 단백질, 지질, DNA, 당질 및 고도불포화지방산과 같은 거대분자를 불활성화 시켜 파괴시키고, 세포 구조를 빠른 속도로 붕괴시킴으로써 결국 세포를 사멸시킨다³⁾.

동맥경화의 산화적 스트레스 및 염증과의 연관성은 죽상동맥경화의 진행 과정에서 나타나게 되는데, 혈관 내의 과도한 ROS 및 RNS가 산화된 저밀도 지단백 (oxidized low-density lipoprotein; Ox-LDL)의 생성을 유도하는 단백질의 산화를 증가시키고, Ox-LDL이 염증성 반응을 개시하여 동맥 벽의 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다. 죽상동맥경화의 발병은 Ox-LDL이

* 교신저자 : 박원환, 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 진단학교실

· E-mail : diapwh@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2373

· 접수 : 2011/02/07 · 수정 : 2011/03/15 · 채택 : 2011/04/11

혈액 중의 monocyte를 intima 안으로 유입시키면서 시작된다. 유입된 monocyte는 대식세포(macrophage)로 분화되어 Ox-LDL을 탐식하고 macrophage를 활성화시킨다⁴⁾. 또한 활성화된 macrophage는 interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), PGE2 등과 같은 여러 가지 cytokine들과 ROS 및 RNS를 생성하여 염증반응의 전사인자인 nuclear factor κ B (NF κ B)를 활성화시키며 그 결과, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 과량의 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E2 (PGE2)를 생성하여 염증을 일으키고, adhesion molecule인 vascular cell adhesion molecule (VACM-1), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin 및 chemoattractant molecule인 monocyte chemotactic protein (MCP)-1 등을 발현시켜 혈액 중의 monocyte 유입을 도와 foam cell을 형성하며 평활근세포의 분화, 이주를 유발하여 동맥경화를 계속 진행시킨다⁵⁾. 그러므로 동맥경화는 산화적 스트레스에 의해 활성화된 macrophage가 중요한 역할을 담당하는 만성적 염증 질환이라 할 수 있다.

이러한 산화적 손상(oxidative damage)은 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Re)와 같은 효소적 항산화제 및 비타민 C, 글루타치온, 토코페롤, 셀레늄, 요산, 페놀 화합물, 카로티노이드 등과 같은 비효소적 항산화제를 포함하는 내인성 항산화 방어계에 의해 억제되어질 수 있다⁶⁾. 항산화 방어계는 ROS와 RNS를 감소시킬 뿐만 아니라 세포 내 redox state를 조절하고 redox signal transduction을 가능하게 하지만, 이러한 방어계는 완벽하지는 않다⁷⁾. 항산화제(antioxidant)는 Ox-LDL의 산화적 변형을 억제하므로 항산화 영양소가 Ox-LDL의 형성을 저해한다면 동맥경화를 비롯한 심혈관계질환의 예방 및 치료에 유용할 것이다.

또한, 최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연물의 약리 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다⁸⁾. 지질의 과산화 방지와 LDL의 산화를 방지하는 항산화제로 Butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ) 등과 같은 합성 항산화제들이 최근 상업적으로 흔히 이용되고 있다. 그러나 합성 항산화제 경우 그의 변이원성 및 독성이 지적되면서 보다 안전하고 효력이 강한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다⁹⁾. 특히, 유기합성 항산화제와 비교하여 'GRAS (generally recognized as safe)'로 평가되는 천연 항산화제의 장점 때문에 최근 들어 유럽 및 미주 지역에서 천연물 유래 약용 및 기능성 식품 및 의약품의 중요성이 크게 부각되고 있다.

페놀화합물은 식물 기원의 대부분의 한약재에 존재하며 다양한 퇴행성 질환의 예방에 기여할 것으로 간주되고 있다. 최근, catechin과 그 유도체, resveratrol, curcumin과 같은 polyphenol은 항암, 항돌연변이, 항미생물, 항바이러스 작용 등을 포함하는 다양한 생리활성을 가지는 기능성 물질로 각광받고 있다¹⁰⁻¹²⁾.

관동화(款冬花, FARFARE FLOS, FF)는 학명이 Tussilago farfara L.로서 국화과의 관동의 꽃봉오리를 말한다. FF는 특이한

향기가 있고 맛은 맵고 달며 성질은 따듯하며 윤페작용이 있어 진해, 거담, 가래 및 폐결핵, 폐농양에 사용하며 외감성 해수, 천식, 상기도감염증에 사용한다. 약리작용은 호흡기 분비물 증가로 진해작용, 호흡흥분과 광조불안, 혈관수축작용, 소아의 급성기관지염, 기관지천식, 인후통에 효과가 있다고 보고되었다^{13,14)}. FF에 관한 연구로는 간접변이원의 돌연변이원성에 대한 보호효과¹⁵⁾, tyrosinase와 DOPA auto-oxidation 저해효과¹⁶⁾, BV-2 microglial cell에서 iNOS와 COX-2 저해효과¹⁷⁾, 항미생물효과¹⁸⁾ 및 신경보호효과¹⁹⁾ 등이 보고되었다.

따라서, 본 연구에서는 FF의 항산화효과 및 LDL 산화억제효과를 in vitro에서 관찰하고 천연항산화제로서의 개발 가능성을 검토하는 한편, LPS로 자극된 RAW264.7 macrophage cell line을 이용하여 FF의 산화적 스트레스 및 염증 반응 억제효과를 탐색함으로써 동맥경화의 예방 및 치료에의 응용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Sodium carbonate (Na₂CO₃), potassium chloride (KCl), human low-density lipoprotein (LDL), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS), sodium chloride (NaCl), naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, ethanol (E), hexane (H), dichloromethane (DCM), ethylacetate (EA), butanol (B) 및 methanol (M)은 Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), nitro blue tetrazolium (NBT), hydrogen peroxide (H₂O₂), sodium nitroprusside (SNP), copper (II) sulfate (CuSO₄), trichloroacetic acid (TCA), ferrous sulfate (FeSO₄), gallic acid (GA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), potassium persulfate, ascorbic acid (AA), butylated hydroxytoluene (BHT), potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]), hypoxanthine, xanthine oxidase, sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄), sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2-thiobarbituric acid (TBA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), tris base, glucose와 gelatin은 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)와 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였으며, peroxy-nitrite는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. CellTiter96 colorimetric assay kit, M-MuLV reverse transcriptase, dNTP, RNase inhibitor 및 agarose는 Promega (Madison, WI, USA)에서, TRI-reagent는 MRC사(Cincinnati, OH, USA)에서 각각 구입하였다. 그 외 기타 시약들은 제1급 정품을 이용하였다.

2. 시료 및 시료의 제조

본 실험의 시료로 사용한 관동화(款冬花, FARFARE FLOS, FF)는 학명이 *Tussilago farfara* L.로서 생약인 FF는 2007년산 중국산제품(약재번호: 000621)을 (주)옴니허브(경북 영천, 한국)에서 구입한 후 정선수치하여 사용하였다.

1) FF 70% 에탄올 추출물의 제조

시료 100 g에 2 L의 70% 에탄올을 첨가하여 1차 12 hr, 2차 6 hr, 3차 3 hr 동안 실온에서 교반 추출한 뒤 1 mm-pore-size filter (Whatman No. 2)를 통해 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator (EYELA Digital water bath SB-1000, Japan)로 감압 농축한 뒤 동결건조 하여 동결건조분말 시료 39.51 g을 얻었다 (수율: 39.51%).

2) FF 계통분획물의 제조

70% 에탄올로 추출한 FF는 hexan : 70% 에탄올 추출물 : 물 (10:9:1, v/v/v)로 분획하여 hexan 추출물을 얻은 후, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 순으로 계통 분획하여 감압 농축하였다. 이때의 용매 회분별 수율은 hexan 추출물(H) 0.91%, 디클로로메탄 추출물(DCM) 0.32%, 에틸아세테이트 추출물(EA) 2.06%, 부탄올 추출물(B) 10.98%, 물 추출물(A) 20.51%였다.

3. FF의 항산화효과

1) Total phenolics의 측정

FF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 total phenolics 함량은 Folin-Ciocalteus reaction²⁰⁾에 의해 gallic acid를 표준품으로 하여 측정하였다. 40 µL의 FF 추출물 (1 mg/mL)을 200 µL의 Folin-Ciocalteus reagent, 1160 µL의 DW와 혼합하였다. 혼합물은 3 분간 실온에 방치한 후, 600 µL의 20% sodium carbonate 를 첨가하였다. 실온에서 2 h 동안 shaking한 후, microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total phenolics 함량은 gallic acid equivalents (µg of GA eq/mg)로 나타내었다.

2) TEAC 및 DPPH assay에 의한 항산화효과의 측정

FF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 TEAC 값은 Roberta와 Miller 등^{21,22)}의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 10 µL의 FF 추출물 희석용액(1,000 µg/mL) 또는 Trolox standard에 ABTS + 용액 1.0 mL를 첨가하여 1 분 후 UV/Visible spectrophotometer (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 6 분간 monitoring하였고 1 mM Trolox와 비교하여 흡광도의 저해 %를 구한 후 mM trolox equivalents로 나타내었다.

FF의 유리기 소거 효과는 Blois에 의한 방법²³⁾에 따라 측정하였다. 즉, DPPH (α,α'-diphenyl-β-picryl-hydrazyl) 16 mg을 100 mL의 에탄올에 녹인 후 100 mL의 증류수를 혼합하여 여과지로 여과한 후 이 여액 2.5 mL에 일정농도의 FF 추출물 0.5 mL을 혼합한 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 528 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

3) NBT 및 DCFH-DA assay에 의한 산소소거효과의 측정

FF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 superoxide

anion 소거 효과는 Gotoh와 Niki의 방법²⁴⁾에 따라 측정하였다. 시험관에 30 mM의 EDTA (pH 7.4), 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 및 1.42 mM nitro blue tetrazolium (NBT)을 각각 100 µL, 10 µL, 200 µL 첨가하여 강하게 교반하였다. 상온에서 3 분간 반응시킨 혼합물에 0.5 U/mL xanthine oxidase 100 µL를 첨가한 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 최종 부피를 3 mL로 조정하였다. 이를 다시 상온에서 20 분간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FF의 ·OH의 제거능을 측정하기 위하여 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) 측정방법²⁵⁾을 사용하여 측정하였다. 지용성 DCFH-DA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 탈아세틸화 되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 시료를 10, 20 및 30 µg/mL의 농도로 10 µL와 menadione 10 µL를 넣고 potassium phosphate buffer (pH 7.4) 130 µL를 넣은 후 ·OH를 생성시킨 후, 125 µM DCFH-DA에 esterase를 넣어 바꾼 DCFDH를 50 µL 첨가하여 60 분간 생성된 형광의 변화를 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

4) DAF-2 및 DHR 123 assay에 의한 RNS 소거효과의 측정

FF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 NO radical 소거 효과는 DAF-2 assay²⁶⁾를 이용하여 측정하였다. 특이적인 NO의 indicator인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO양에 의존한다. DAF-2가 1 mg이 녹아있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1 : 400배로 희석하였다. NO 제공물질인 SIN-1과 DAF-2를 96 well plate에 첨가하였으며, DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10 분 후 excitation wave length 485 nm 및 emission wave length 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

FF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 peroxynitrite 소거 효과는 Crow의 방법²⁷⁾에 따라 측정하였다. 즉, 96-well microplate에 FF를 농도별로 취하고 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 µM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 µM DHR 123를 함유하는 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하였다. 이에 10 µM ONOO-를 첨가한 후 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) 이용하여 excitation 500 nm, emission 536 nm에서 측정하였다. ONOO- 생성원으로는 시판되는 peroxynitrite를 직접 사용하거나 SIN-1에 의해 생성되는 superoxide anion과 nitric oxide의 반응으로 발생하는 ONOO-의 제거 활성능을 검토하였다.

5) Relative Electrophoretic Mobility (REM)의 측정

Human LDL의 REM은 Yoon 등²⁸⁾의 방법에 따라 agarose gel electrophoresis로 분석하였다. 간단히, PBS (pH 7.4)에 녹인 LDL (120 µg/mL)를 일정 농도의 FF 추출물, 10 µM CuSO₄와 혼합하여 37°C에서 12 시간 동안 배양한 후, 3 µg의 LDL을 0.7% agarose gel에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, and 1mM EDTA)에서 85 V로 1 시간 동안 전기영동 하였다. Gel은 건조하여 Coomassie brilliant blue R-250로 염색 하였고, 시료의 저해율(%)은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{migration distance of ox LDL} - \text{migration distance of s LDL}}{\text{migration distance of ox LDL} - \text{migration distance of n LDL}} \times 100$$

ox LDL: oxidized LDL, s LDL: sample LDL, n LDL: native LDL

6) Human LDL 산화 억제효과의 측정

FF 추출물의 human LDL 산화 억제효과는 Yagi의 방법²⁹⁾에 의해 측정하였다. 즉, human LDL 0.5 mL에 10 mM PBS buffer (pH 7.4)를 1.5 mL, 0.1 mM CuSO₄ 40 µL 및 용매 또는 시료 40 µL를 첨가하여 37°C에서 30 분 간 배양하였다. 여기에 20% TCA를 1.5 mL, 0.05 M NaOH에 녹인 0.67% TBA를 1.5 mL 첨가하였다. 반응 혼합액을 90°C, 45 분 간 water bath에서 배양하고 차갑게 냉각한 후 2,000×g에서 5 분 간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 기포를 제거한 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 구한 후 IC₅₀ 값으로 환산하였다.

4. RAW264.7 murine macrophage cell line에서 FF의 산화적 스트레스 및 염증 반응 억제효과

1) 세포 배양

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

2) MTS assay에 의한 세포 생존율 평가

FFEA (FF의 ethyl acetate fraction)의 세포에 대한 독성은 CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여, 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 방법으로 96 well plate에 1×10⁴cell/well의 RAW 264.7 cell을 분주하고 FFEA를 농도별 (10-800 µg/mL)로 처리하거나 LPS와 함께 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. Well 당 20 µL의 MTS solution을 첨가하여, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 4 시간 동안 반응 시킨 후 microplate reader(Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 FFEA가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 함께 배양하여 대조군과 실험군의

흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 나타내었다.

3) DCFH-DA에 의한 intracellular ROS 측정

96 well plate에 2×10⁴cell/well의 RAW 264.7 cell을 분주한 후 배양하여 세포를 well에 부착시키고 FBS를 뺀 DMEM 배지로 갈아주었다. 세포를 24 시간 배양한 후 FFEA 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1 시간 배양한 다음 1 µg/mL의 LPS를 주입하고 24 시간 배양하였다. 배양 마지막 30 분 동안 10 µM DCFH-DA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 배지에 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양한 후 PBS (pH 7.4)로 DCFH-DA를 3회 씻어내어 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광을 측정하고 아무것도 처리하지 않은 대조군에 대한 ROS 생성을 비교하여 나타내었다.

4) NO 생성 평가

NO 생성 정도는 24 well plate에 5×10⁵ cell/well의 RAW 264.7 cell을 배양하여 세포를 well에 부착시킨 후 FBS를 뺀 DMEM 배지로 24 시간 배양하였다. FFEA 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1 시간 배양한 후 1 µg/mL의 LPS를 처리하여 24 시간 배양하였다. 세포 배양액 50 µL에 Griess reagent인 1% sulfanilamide (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 포함된 5% phosphoric acid 50 µL와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 50 µL를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 농도별로 조제하여 사용하였다.

5) RNA 분리 및 RT-PCR

세포로부터의 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하였으며, RNase-free한 조건 하에서 이루어졌다. 1 µg의 total RNA를 random 9 primer와 함께 37°C에서 10 분, 10°C에서 5 분 간 반응 시킨 후, M-MuLV reverse transcriptase (5 unit), dNTP (10 mM), 1 unit RNase inhibitor(1 unit)로 42°C에서 1 시간 반응 시킨 후 99°C에서 5 분 간 heating 하여 반응을 멈추었다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 유전자를 증폭시키기 위하여 0.5µL cDNA, 10 pmol의 5'과 3' primer, 10× buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1.25 unit Taq polymerase를 섞고 distilled water로 전체를 20 µL로 맞추는 다음 PCR system (Gene AMP 9700, Applied Biosystem, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때, PCR cycle은 94°C에서 45 초, 48-61°C에서 45 초, 72°C에서 90 초 동안 30 회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다(Table 1).

5. 통계처리

통계 분석은 SPSS version 18.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) program을 이용하여 각 군의 평균과 표준편

차를 산출하고 군 간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 $p < 0.05$ 에서 유의한 차이가 있는 경우 Tukey test를 이용하여 검정하였다.

Table 1. Primer sequence used for detection of cytokine gene expression

Gene	Oligonucleotide sequence
iNOS	F 5'-AGTCCTCCCAGGACCACAC-3' R 5'-ACGCTGAGTACCTCATTGGC-3'
IL-1 β	F 5'-CAGGATGAGGACATGACACC-3' R 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'
IL-6	F 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3' R 5'-TGCTGGTGACAACCCAGGCC-3'
TNF- α	F 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3' R 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'
GAPDH	F 5'-CCTGTTCCAGAGACGCCGCATCTT-3' R 5'-TGGCAACAATCTCCACTTTGCCA-3'

결과 및 고찰

1. FF의 항산화효과

1) Yield of fraction and total phenolics

FF 추출물 및 계통분획물의 수율은 0.32 g/100 g FF (DCM extract)에서 39.51 g/100 g FF (E extract)의 범위로 나타났고, E 분획물(Ethanol, 39.51) > A 분획물(Aqueous, 20.51) > B 분획물(Butanol, 10.98) > EA 분획물(Ethylacetate, 2.06) > H 분획물(Hexane, 0.91) > DCM 분획물(Dichloromethane, 0.32)의 순으로 높았다. Folin-Ciocalteu reagent method에 의해 측정된 total phenolics 함량은 10.56 μ g GA eq/mg (A 분획물)에서 345.28 μ g GA eq/mg (EA 분획물)의 범위였고, 다음 순서와 같이 높은 것으로 나타났다: EA > B > E > DCM > H > A fraction (Table 2). Folin-Ciocalteu assay는 페놀물질 함량을 비교적 빠르고 간단하게 측정할 수 있는 방법이다. 페놀화합물(페놀 또는 폴리페놀)은 식물에 편재하는 이차적 식물성 대사산물로서 그들은 항산화효과를 비롯한 다양한 생물학적 효능을 지니는 것으로 보고되고 있다³⁰. 일련의 연구들은 몇몇 식물들에 존재하는 총 페놀 함량과 항산화효과 사이에는 유의적인 상관관계가 있음을 보고하였고^{31,32}, 이는 페놀 함량이 높은 식물의 경우 항산화제의 좋은 자원이 될 수 있다는 것을 의미한다. 게다가 다양한 연구들을 통해 페놀성 quercetin과 같은 페놀성 항산화제가 유리기 반응에 대해 치료제로 이용 가능 할 것이라는 것이 입증된 바 있다³³.

본 연구에서는 다양한 극성을 지닌 용매를 이용해 FF를 추출하였고, 각 용매별로 비극성 항산화 분획물부터 중간정도 및 높은 극성을 가진 항산화 분획물까지를 분리하였다. 추출과정 동안 몇몇 파라미터들이 총 페놀 함량에 영향을 미치기도 하는데 추출 온도, 용매 타입 및 용매 농도 같은 것들이 이에 포함된다. 본 연구에서 총 페놀함량 결과를 통해 FF는 산화적 스트레스로부터 보호작용을 갖는 예방의학적 페놀물질의 근원으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

2) TEAC 및 DPPH assay에 의한 항산화 효과

Table 3은 TEAC assay에 의해 측정된 FF의 항산화 활성을

보여준다. 추출물은 일반적으로 0.014~0.315 mmol Trolox equivalents 범위의 항산화 활성을 나타내었고, 각각 분획물에 따라 항산화 활성의 차이가 22.5배 이상 큰 것으로 나타났다. FF의 EA 분획물 (0.315 mM Trolox equivalent)은 가장 큰 항산화 활성을 나타내었으며 B 분획물 (0.037 mM Trolox equivalent), H 분획물 (0.032 mM Trolox equivalent), E 분획물 (0.030 mM Trolox equivalent), DCM 분획물 (0.020 mM Trolox equivalent) 및 A 분획물 (0.014 mM Trolox equivalent)의 순으로 항산화 활성이 감소되었다. 대조군으로 이용된 AA는 항산화 활성이 0.327 mM Trolox equivalent로 FF와 유사하게 나타났다. FF 추출물의 경우 페놀 화합물의 함량이 가장 높았던 EA층에서 탁월한 항산화 효과를 가지는 것으로 나타나, FF에 함유된 페놀 화합물에 의해 TEAC값이 증가된 것으로 사료되었다. TEAC법은 Miller 등²²이 1993년에 개발한 방법으로서 혈장이나 혈청의 항산화 효과뿐만 아니라 항산화 효과 측정에 현재 가장 광범위하게 사용되고 있는데, 유리형 blue-green ABTS radical cation (ABTS \cdot^+)를 라디칼로 사용하는 방법으로써, 개개의 화학성분 및 복잡한 추출물의 항산화 활성을 신속하게 측정할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 또한, 이 방법은 734 nm의 긴 최대 흡광도 파장을 가져 때때로 식물성 추출물에서 나타나는 색깔에 의한 간섭을 최소화할 수 있기 때문에 식물의 항산화효과를 평가하기 위해 유용한 것으로 보고되고 있다.

이 방법은 in vivo에서의 총항산화능 측정뿐만 아니라 in vitro에서도 항산화능을 측정하기 위해 이 방법이 널리 이용되고 있는데, Rice-Evans 등³⁴은 flavonoids와 phenolic acid의 구조-활성간의 관계를 TEAC법을 통해 규명한 바 있다. 또한 Fogliano 등³⁵은 TEAC법을 이용해 포도주의 항산화 활성을 모니터링 했는데, 포도주 속의 phenol 함량이 직접적으로 항산화 활성과 관련 있음을 보고하였다.

DPPH를 이용하여 FF의 유리기 소거효과를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 일반적으로 DPPH 소거효과는 IC₅₀값으로 나타내는데, 이는 시험용액에서 50%의 DPPH를 소거하는데 필요한 항산화제의 농도로 표현된다. 따라서 결과는 DPPH 라디칼을 50% 저해하는 FF 추출물의 농도로 나타내었으며 낮은 IC₅₀값을 나타낼수록 DPPH radical을 소거하는 효과는 크다³⁶. TEAC 값과 마찬가지로 EA 분획물의 유리기 소거효과는 IC₅₀값이 75.51 \pm 5.65 μ g/mL으로써 월등히 우수한 소거효과를 나타내었고, 다음과 같은 순서로 항산화 활성이 감소되었다; B 분획물 (IC₅₀=491.55 \pm 13.48 μ g/mL) > E 분획물 (IC₅₀=1,535.37 \pm 13.23 μ g/mL) > DCM 분획물 (IC₅₀=1,890.64 \pm 17.04 μ g/mL) > H 분획물 (IC₅₀=4,883.60 \pm 26.37 μ g/mL) > A 분획물 (IC₅₀=5,311.25 \pm 34.69 μ g/mL). 한편, 대조군으로 사용된 AA 및 BHT는 각각 IC₅₀값이 69.08 \pm 3.37 μ g/mL, 140.04 \pm 8.29 μ g/mL로 나타났다. Nam 등³⁷은 한약재 열수 추출물의 항산화효과를 평가한 결과, DPPH 자유라디칼에 대한 전자 공여능이 가장 큰 한약재는 필발(Piper longum L.)이었으며, 목과, 창출, 지모, 조각자, 시호, 오약, 황금, 목통, 초두구, 대복피, 육계, 백자, 토복령, 백모, 소자, 삼릉, 산사, 빈랑, 백두구, 오가피, 화피, 합환피, 당귀, 청피, 금은화의 25 종

의 한약재들이 80% 이상의 DPPH 자유 라디칼에 대한 전자 공여능을 가지고 있다고 보고하였다. 세포가 성장하고 자라면서 발생하는 free radical에 의해 세포가 산화되어 손상되는데 폐놀성 화합물은 환원성이 강해서 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 항산화 능력이 있다고 알려져 있다³⁸⁾. DPPH는 자체가 안정한 free radical을 지니고 있는 화합물로 항산화물질에 의해 환원되어 항산화 능력을 확인하는데 널리 사용되는 물질이다. 위와 같은 결과로 FF에서도 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력이 있음이 확인되었으며 이는 FF의 폐놀성 화합물에 의한 작용으로 판단된다.

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나, 그 중에서 Blois 등에 의해 소개된 DPPH법은 α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl 라디칼의 소거 특성을 이용한 것으로 비교적 간단하면서도 광범위하게 항산화 활성을 측정하기 위해 이용되는 방법이다. DPPH법은 실제 항산화 활성과 연관성이 높은 방법으로 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질의 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐 아니라 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로도 이용되고 있다. DPPH 라디칼은 비교적 안정한 화합물로 에탄올 용액에서는 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성을 갖는 물질이 DPPH의 라디칼을 소거시켜 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 쉽게 검정할 수 있고, 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높은 방법이다. 전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용되고 있다³⁹⁾. Okawa 등⁴⁰⁾은 약용식물로부터 얻은 phytochemical의 DPPH 라디칼 소거 활성을 비교하여 구조 중 hydroxyl group의 수와 위치의 중요성을 보고한 바 있다(Table 3).

Table 2. Extraction yields and contents of total phenolics in the extracts of FF

Sample ¹⁾	Yield (%) ²⁾	Total phenolics ($\mu\text{g GA eq/mg}$) ³⁾
E	39.51	51.13 \pm 1.24
H	0.91	14.27 \pm 0.53
DCM	0.32	28.40 \pm 1.38
EA	2.06	345.28 \pm 4.97
B	10.98	73.92 \pm 2.17
A	20.51	10.56 \pm 0.46

1) E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. 2) Extraction yield is expressed as the percentage dry weight of FF. 3) Values are mean \pm SD (n=3). a-Values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test.

3) ROS (superoxide anion 및 hydroxyl radical) 소거효과

FF의 superoxide anion 활성을 측정한 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 EA fraction의 IC50값이 458.41 \pm 8.97 $\mu\text{g/mL}$ 으로써 가장 높게 나타났고 다음과 같은 순서로 감소되었다; B 분획물 (IC50=1,247.56 \pm 36.68 $\mu\text{g/mL}$) > E 분획물 (IC50=3,478.44 \pm 102.35 $\mu\text{g/mL}$) > A 분획물 (IC50=4,034.96 \pm 110.23 $\mu\text{g/mL}$). 한편, H 및 DCM 분획물에서는 superoxide anion 소거효과가 관찰되지 않

았고 대조군으로 쓰인 AA와 BHT의 경우도 superoxide anion 소거효과가 없는 것으로 나타났다.

Superoxide anion은 비교적 약한 산화제이고 제한된 화학적 반응성을 나타냄에도 불구하고, 수많은 효소계에 의해 singlet oxygen, hydroxyl radical과 같은 더 위험한 활성산소종을 생성시켜 지질의 과산화를 초래한다⁴¹⁾. FF 추출물의 superoxide anion 소거 효과를 측정하기 위해 NBT 환원법을 이용하였다. 이 방법에서 xanthine oxidase에 hypoxanthine을 첨가하면 superoxide anion이 생성되게 되고 이는 노란색의 NBT를 환원시켜 청색의 diformazan으로 변화시킴으로써 560 nm에서 흡광도가 증가되게 된다. 이때, superoxide anion 소거 활성을 갖는 물질을 첨가하면, NBT의 환원을 감소시켜 diformazan의 생성 역시 감소하게 된다²⁴⁾.

한편, FF의 hydroxyl radical 소거 효과를 측정한 결과, Table 4에 보여지는 바와 같이 EA 분획물의 IC50값이 109.75 \pm 9.43 $\mu\text{g/mL}$ 으로써 가장 높게 나타났고 B 분획물 (IC50=201.77 \pm 14.24 $\mu\text{g/mL}$), E 분획물 (IC50=932.27 \pm 14.14 $\mu\text{g/mL}$), DCM 분획물 (IC50=1,218.11 \pm 21.25 $\mu\text{g/mL}$), A 분획물 (IC50=2,175.01 \pm 24.58 $\mu\text{g/mL}$) 순으로 항산화 활성이 감소되었다. 한편, H 분획물에서는 hydroxyl radical 소거효과가 관찰되지 않았다. 대조군으로 쓰인 AA의 경우 IC50값이 100.57 \pm 2.34 $\mu\text{g/mL}$ 로 hydroxyl radical 소거활성이 EA fraction과 유사하였다. 따라서, FF는 강력한 항산화제로 알려져 있는 AA만큼 hydroxyl radical을 효과적으로 소거하여 microsome의 지질과산화를 억제시킬 것으로 사료되었다. Dye의 산화로부터 생성되는 형광을 측정함으로써 microsome과 ester DCFH-DA와의 상호반응성을 측정하는 DCFH-DA assay는 microsome의 산소 라디칼 생성을 자극하는 ferritin의 활성을 평가하기 위한 빠르고, 보다 더 민감한 시스템이다²⁵⁾. 포유류 동물은 산소를 이용하여 에너지 대사를 하여 생존 한다. 그러나 생체 내로 들어온 산소는 여러 가지 물리적, 화학적, 생물학적 스트레스를 받으면 ROS로 변하여 생체에 유해한 작용을 나타내는데 이 ROS는 생체 세포내의 정상 대사의 부산물로서 끊임없이 생성된다⁴²⁾. 생체 세포막내에서는 강력하고 다양한 free radical을 생산하는데 세포막 지질 성분인 arachidonic acid가 cyclooxygenase에 의하여 prostaglandins을 산출하게 되고 lipoygenase에 의하여 leukotrienes이 생산되는 과정에서 hydroxyl radicals과 같은 중간대사물질이 생성되게 된다. Arachidonic acid 연속반응이 free radical을 생산할 뿐만 아니라 arachidonic acid 그 자체가 다른 원인에 의해서도 강력한 free radical을 생산하게 된다⁴³⁾. 가장 반응성이 강하고 독성이 강한 hydroxyl radical은 반응과정 중 중금속 이온을 필요로 하는 두 가지 화학반응 즉, Haber-Weiss 반응과 Fenton reduction에 의해서 강력한 free radical 이 생성되는데 이중 정상 생리적인 조건 하에서는 Fenton reduction에 의하여 hydroxyl radical이 많이 생성되는 것으로 알려져 있다. 이 molecule은 구리, 철과 같은 금속이온 존재 시 superoxide anion과 hydrogen peroxide에 의해 생성되며, 지질, 폴리펩타이드, 단백질 및 DNA와 반응하는데 특히 thiamin과 guanosine과 더욱 더 빠르게 반응한다⁴⁴⁾. 따

라서, 천연물에 존재하는 hydroxyl radical 소거제를 검색하는 것은 여러 다양한 질환을 예방하는 차원에서 중요한 의미가 있다 (Table 4).

Table 3. Antioxidant activities and free radical scavenging activities of the extracts of FF as determined by the ABTS+ and DPPH assay

Sample ¹⁾	TEAC ²⁾ (mM Trolox equivalent)	Free radical scavenging activities ³⁾ (IC50=μg/mL)
E	0.030±0.001c	1,535.37±13.23d
H	0.032±0.002c	4,883.60±26.37b
DCM	0.020±0.001d	1,890.64±17.04c
EA	0.315±0.004b	75.51± 5.65g
B	0.037±0.001c	491.55±13.48e
A	0.014±0.001e	5,311.25±34.69a
AA	0.327±0.003b	69.08±3.37g
BHT	1.217±0.011a	140.04±8.29f

1) E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. 2,3) Values are mean±SD (n=3). a-f values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test.

Table 4. ROS (superoxide anion and hydroxyl radical) scavenging activities of the extracts of FF

Sample ¹⁾	ROS (IC50=μg/mL)	
	Superoxide anion ²⁾	Hydroxyl radical ³⁾
E	3,478.44±102.35b	932.27±14.14c
H	NA ⁴⁾	NA
DCM	NA	1,218.11±21.45b
EA	458.41± 8.97d	109.75± 9.43e
B	1,247.56± 36.68c	201.77±14.24d
A	4,034.96±110.23a	2,175.01±24.58a
AA	NA	100.57± 2.34e
BHT	NA	22.10± 0.78f

1) E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. 2,3) Values are mean±SD (n=3). a-f values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test.

4)NA is not active.

4) RNS (NO radical 및 peroxynitrite) 소거효과

FF 추출물의 nitric oxide 소거 활성을 측정 한 결과는 Table 5와 같다. EA 분획물의 IC50값이 48.22±3.27 μg/mL으로써 가장 높게 나타났고 다음과 같은 순서로 감소되었다; B 분획물 (IC50=78.94±6.28 μg/mL) > E 분획물 (IC50=180.48±12.53 μg/mL) > DCM 분획물 (IC50=21.04±1.42 μg/mL) > A 분획물 (IC50=36.40±1.59 μg/mL) > H 분획물 (IC50=642.87±14.34 μg/mL). 대조군으로 쓰인 AA의 경우 IC50값이 1.94±0.10 μg/mL로 나타난 반면, BHT는 NO 소거 활성이 관찰되지 않아 FF는 AA 보다는 낮았으나 BHT 보다는 높은 효과를 나타내어 NO radical을 효과적으로 소거하는 것으로 나타났다.

Nitric oxide (NO) radical은 무기 저분자 라디칼로서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NOS는 정상적인 상황에서 생리적인 역할을 담당하는 constitutive NOS (cNOS)와 병리적인 상황에서 유도되는 inducible NOS (iNOS)의 두 가지 형태로 크게 분류된다. 그리고 cNOS는 다시 neuronal NOS (nNOS)와 endothelial NOS (eNOS)로 나누어진다. nNOS와 eNOS는 지속적으로 발현되며

Ca²⁺과 calmodulin 의존성으로 적은 양의 NO를 생성한다. nNOS는 주로 신경계에 존재하고 중추신경계에서 신경전달 기능을 담당하는 NO를 생성한다. eNOS는 혈관내피세포에 주로 분포하며 혈관의 수축과 이완에 영향을 미쳐 혈압을 조절하는 기능을 담당하는 NO를 생성한다. 반면에 iNOS는 Ca²⁺과 calmodulin 의존성이 없으며, 혈관내피세포나 근육세포를 포함한 다양한 조직에서 발견되며 대식세포나 신경소교세포에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon-gamma (IFN-g), Alzheimer's amyloid peptide 등의 면역학적인 자극에 의해 iNOS가 유도된다⁴⁵⁾. iNOS는 원충, 세균이나 암세포를 사멸시키기 위한 숙주의 방어기전으로 다량의 NO를 만들어내지만 정상 농도의 수천 배에 달하는 NO는 오히려 자가 면역질환이나 만성 염증의 원인이 되기도 한다⁴⁶⁾. 과량의 NO는 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜⁴⁷⁾ prostaglandin 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시키고⁴⁸⁾ 패혈증 환자에게서 septic shock을 일으키는 것으로 보고되었다⁴⁹⁾.

본 실험에서 DHR 123을 이용하여 FF의 peroxynitrite (ONOO-) 소거 활성을 측정 한 결과 EA 분획물의 IC50값이 4.79±0.09 μg/mL으로써 가장 높게 나타났고 B 분획물 (IC50=13.68±1.29 μg/mL), H 분획물 (IC50=26.82±3.93 μg/mL), E 분획물 (IC50=31.18±2.22 μg/mL), DCM 분획물 (IC50=35.87±1.10 μg/mL) 및 A 분획물 (IC50=77.41±9.19 μg/mL) 순으로 항산화 활성이 감소되었다. 한편, 대조군으로 쓰인 AA 및 BHT의 경우 IC50값이 각각 2.69±0.54, 543.32±28.90 μg/mL로, FF는 AA 보다는 낮았으나 비교적 높은 hydroxyl radical 소거활성을 나타내어 FF가 효과적인 peroxynitrite 소거제로 작용함을 알 수 있었다 (Table 5).

ONOO-는 superoxide anion과 nitric oxide의 제한된 반응에 의해 생성되는 강력한 생물학적 산화제로 알려져 있으며, 유리형 L-tyrosine 또는 단백질 내 tyrosine 잔기의 nitration을 유도하여 정상적 단백질 형태에 영향을 미치게 된다. Peroxynitrite의 생성 비율은 superoxide anion 및 nitric oxide의 농도에 의해 결정되는데 비록 작은 양의 기질 증가에 의해서도 peroxynitrite 생성량은 현저하게 증가되어 강한 세포독성 효과를 나타내게 된다. 또한, peroxynitrite는 자극을 받은 대식세포, 호중구, 내피세포에서 생성되며 동맥경화성 심장질환, 급성 폐렴, 만성 염증 시 in vivo에서도 생성된다. 이는 in vitro와 in vivo에서 강력한 산화제로 작용하며 단백질, 아미노산, DNA 등과 반응하여 세포 및 조직 손상을 야기할 뿐만 아니라 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다⁵⁰⁾. 이와 같이 NO는 NO 자체로서 보다는 peroxynitrite의 형태로 다양한 산화적 손상을 유발한다. NO의 생성단계는 iNOS의 발현 또는 효소 활성을 저해함으로써 조절가능지만 일단 생성된 NO는 peroxynitrite의 형태로 조직 손상을 일으키므로, NO에 의한 다양한 질환을 예방 또는 치료하기 위해서는 peroxynitrite를 소거할 수 있는 물질이 유용하다. In vitro에서 가장 강력한 peroxynitrite 소거제로는 D(-)penicillamine과 ebselen이 있고, 그 외 과일, 와인, 차, 녹황색 채소의 성분으로서 효과적인 항산화제

로 알려져 있는 ascorbic acid, α -tocopherol, flavonoids, polyhydroxyphenol 등이 있다⁵¹⁾(Table 5).

Table 5. RNS (nitric oxide and peroxyntirite) scavenging activities of the extracts of FF

Sample ¹⁾	RNS (IC50= μ g/mL)	
	Nitric oxide radical ²⁾	Peroxyntirite ³⁾
E	180.48 \pm 12.53c	31.18 \pm 2.22cd
H	678.35 \pm 9.86b	26.82 \pm 3.93cd
DCM	642.87 \pm 14.34b	35.87 \pm 1.10cc
EA	48.22 \pm 3.27e	4.79 \pm 0.09cf
B	78.94 \pm 6.28d	13.68 \pm 1.29ce
A	998.55 \pm 11.25a	77.41 \pm 9.19cb
AA	1.94 \pm 0.10f	2.69 \pm 0.54cg
BHT	NA4)	543.32 \pm 28.90ca

1) E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. 2,3) Values are mean \pm SD (n=3). a-g)Values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test.

4)NA is not active.

5) REM Assay

Cu²⁺에 의해 유도되는 LDL 과산화의 REM에 대한 FF의 효과를 측정 한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 native LDL의 REM을 1이라고 가정했을 때, Cu²⁺ 첨가에 의해 REM이 3.8까지 증가하였고, FF 첨가에 의해 현저히 감소되었다. 특히, E, DCM, EA 및 B 분획물에서는 10 μ g/mL 농도에서 각각 71.4%, 50%, 78.5%, 71.4%의 LDL 산화 보호효과를 나타내어 대조군으로 사용된 AA (85.7%) 보다는 다소 낮으나 우수한 억제효과를 보였다. 또한, EA 분획물의 경우 저농도(1 μ g/mL)에서도 LDL 산화에 대해 탁월한 억제효과를 가지는 것으로 나타났다. 본 실험에서 FF의 유리기 소거효과는 LDL 과산화 억제효과에 영향을 미쳐 FF 추출물이 유리기를 안정한 형태의 대사물로 변화시켜 radical chain 반응을 종결시킬 것으로 사료되었다.

LDL은 혈장 단백질 중 밀도가 1.025~1.058에 해당하는 저단백(lipoprotein)으로 외부는 소수성의 triglyceride cholesteryl ester로 둘러싸여 있으며, 중심부는 극성인 인지질(phospholipid)과 유리 콜레스테롤(free cholesterol)로 이루어져 있다. 외부는 apo B-100이라 불리는 특수한 단백질로 구성되어 있는데 이 apo B-100은 LDL에서 monomer protein으로 존재하며 인체 내 혈관에서 콜레스테롤의 조절 및 대사에 직접 관여한다. 또한, apo B-100은 LDL-receptor에 결합할 수 있는 ligand로 작용한다. 정상적인 LDL은 산화적 스트레스에 의해 쉽게 산화되어 LDL-receptor와 결합하지 못한다. LDL 산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 하며, ox-LDL이 정상적인 LDL 보다 대식세포에 의해 쉽게 포획되어 거품세포를 형성함으로써 동맥경화를 유발한다⁵²⁾. In vitro 연구에서 지질과산화를 측정하기 위해 주로 conjugated diene 또는 thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS)와 같은 생성물들이 이용되지만 민감도 및 특이성 면에서 효율이 낮다. 공교롭게도 이러한 분석 방법들은 몇몇 아미노산 구성성분들이 Fenton과 Haber-Weiss 반응에서 생성된 Cu²⁺에 의해 유도되는 ROS에 의해 공격을 받기 쉬움에도 불구하고, apo B-100에 있어서의 산화적 손상을 측정해

내지 못한다⁵³⁾. REM은 apo B-100에 있어서의 산화적 손상을 직접적으로 측정하는 방법으로 결국, REM 분석법에서 LDL 산화를 억제하는 천연 항산화제는 죽상동맥경화 및 관상심장질환의 위험을 감소시킬 수 있을 것이다(Fig. 1).

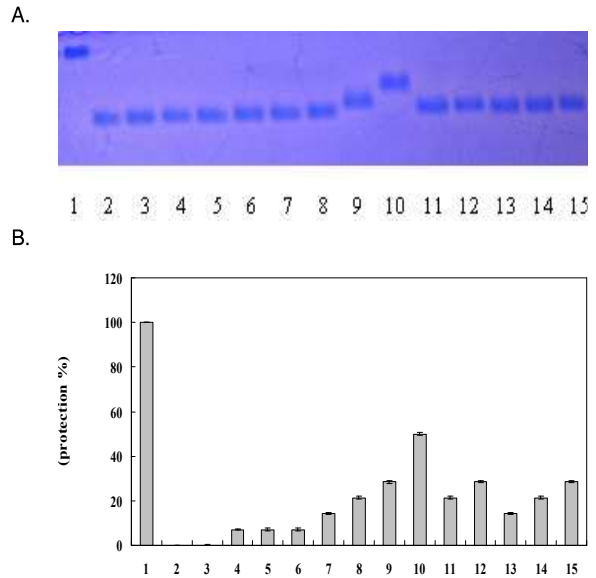


Fig. 1. The relative electrophoretic mobility (REM) of human LDL incubated with Cu²⁺ and with or without extracts of FF. LDL (120 μ g/mL) was oxidized with 10 μ M CuSO₄ at 37 $^{\circ}$ C in the presence of FF extracts for 12 h. (A) Lane 1: native LDL; Lane 2: LDL and Cu²⁺; Lane 3, 4: LDL and Cu²⁺ and 5, 10 μ g of E; Lanes 5, 6: LDL and Cu²⁺ and 5, 10 μ g of H; Lanes 7, 8: LDL and Cu²⁺ and 5, 10 μ g of DCM; Lanes 9, 10: LDL and Cu²⁺ and 5, 10 μ g of EA; Lanes 11, 12: LDL and Cu²⁺ and 5, 10 μ g of B; Lanes 13, 14: LDL and Cu²⁺ and 5, 10 μ g of A; Lanes 15: LDL and Cu²⁺ and 10 μ g of AA. (B) Protection rate (%), Each value represents the mean \pm SD of triplicate measurements.

6) Human LDL 산화 억제효과

CuSO₄ 유도-LDL 산화 억제효과에 대한 FF 추출물의 효과를 검토한 결과 Table 6에 나타난 바와 같이 EA 분획물의 IC50 값이 161.91 \pm 9.14 μ g/mL으로써 가장 높았으며, E 분획물 및 DCM 분획물에서는 IC50값이 각각 332.57 \pm 12.43 μ g/mL, 489.99 \pm 13.51 μ g/mL로 나타났고 H, B, A 분획물에서는 LDL 산화 억제효과가 관찰되지 않았다. 한편, 대조군으로 쓰인 AA의 경우 IC50값이 167.68 \pm 5.62 μ g/mL로 EA 분획물은 대조군 보다 높은 LDL 산화 억제효과를 나타내었다.

혈액 내 LDL 수준의 증가가 동맥경화의 제 1의 위험인자이지만, LDL은 산화되어 foam cell로 전환될 때 혈관 내 플라그 형성을 가속화시키는 것으로 알려져 있다⁵⁴⁾. 따라서, LDL 자체의 상층을 억제하는 것뿐만 아니라 혈중에서 LDL이 산화되는 것을 억제하는 것 또한 동맥경화의 예방에 있어 중요한 요소가 될 수 있다. LDL 산화 억제효과가 있는 항산화물질로는 tocopherol, carotenoids, ascorbic acid, isoflavone과 flavonoid들로 이들의 효과는 이미 in vitro 및 ex vivo에서 관찰된 바 있다^{55,56)}. 한편, Chen 등⁵⁷⁾은 Glycine tomentella 뿌리 에탄올 추출물에서 LDL 산화 억제효과를 측정 한 결과 유의적으로 lag phage를 지연시킴으로써 Glycine tomentella가 생체 내에서 산화적 스트레스에 의

해 유발되는 손상과 그로 인한 질병유발을 예방하는데 좋은 소재가 될 수 있음을 보고하였다.

이상의 결과로 본 실험에 이용한 FF의 강력한 항산화활성이 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적에 의해 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용될 수 있음을 시사한다(Table 6).

Table 6. Inhibitory effect on Cu²⁺-induced LDL oxidation of the extract of FF

Sample ¹⁾	Inhibitory effect on Cu ²⁺ -induced LDL oxidation ²⁾ (IC50=μg/mL)
E	332.57±12.43b
H	NA3)
DCM	489.99±13.51a
EA	161.91± 9.14c
B	NA
A	NA
AA	167.68± 5.62c
BHT	NA

1) E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. 2) Values are mean±SD (n=3). a-cValues with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test. 3) NA is not active.

2. RAW 264.7 murine macrophage cell line에서 FF의 산화적 스트레스 및 염증 반응 억제효과

1) 세포 생존률

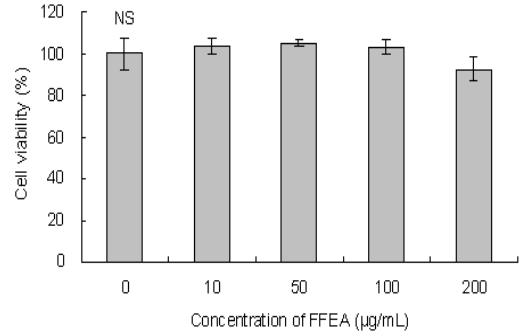
앞선 연구에서 *in vitro*에서 FF의 항산화효과를 살펴본 결과, EA 분획물의 항산화효능이 높게 나타났으므로 이후 세포실험은 EA 분획물을 이용하여 진행하였다. LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에 FF EA 추출물 (FFEA)을 농도별로 처리하였을 때 세포 생존률을 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 DMSO와 LPS를 처리한 positive control군의 세포 생존률과 비교하여 negative control군, FFEA군 모두 세포 생존률에 유의적인 차이가 없었으며, 이는 FFEA가 세포 독성을 야기시키지 않았음을 나타낸다(Fig. 2).

2) FFEA의 intracellular ROS 생성 저해

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 FFEA 추출물이 ROS 생성에 미치는 영향을 DCF-DA assay를 통해 알아보았다. DCF-DA는 세포에 전처리하면 세포 안으로 쉽게 들어가고, H₂O₂와 만나면 형광을 띠는 DCF를 생성하게 되므로 DCF의 형광강도를 측정하면 세포 내의 ROS 생성량을 측정할 수 있다. 또한 LPS는 세포 내의 ROS를 효과적으로 유발시키는 물질로 알려져 있다¹²⁾. 본 실험 결과, FFEA 추출물을 처리한 군에서 농도-의존적으로 control군에 비해 ROS 생성이 유의적으로 억제되었고, 200 μg/mL 농도에서 ROS 생성이 현저히 감소되었으며 이때 IC50값은 109.33 μg/mL로 나타났다(Fig. 3). 따라서 *in vitro* 상에서의 항산화 활성이 세포 내에서도 유효함을 확인할 수 있었다. ROS와 같은 free radical로부터 생체 내 물질을 보호할 수 있는 항산화제 및 항산화 방어계는 활성산소 라디칼의 발생을 미연에 방지하는 시스템과 생성된 라디칼을 포착·제거하는 시스템, 손상된 조직의 회복과 신생 기전에 관여하는 세 가지 시스템으로 분류할 수 있다⁵⁸⁾. 이상의 실험결과로 미루어 보아 플

라보노이드, 폴리페놀을 함유하고 있는 FFEA는 위에 언급한 세 가지 시스템 모두를 통해 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다(Fig. 3).

A.



B.

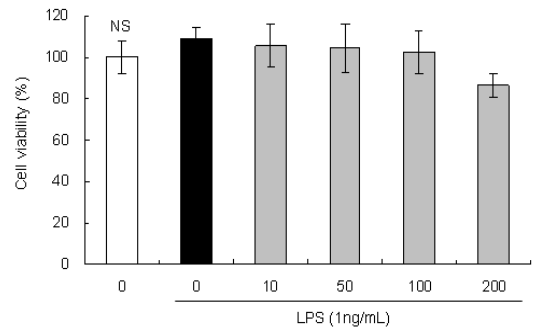


Fig. 2. Effect of ethyl acetate fraction from FFEA on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of FFEA for 1 h before being incubated with or without 1 μg/mL LPS for 24 h. Cell viability was evaluated by MTS assay. Values are mean±S.D. (n=3). NS: not significant.

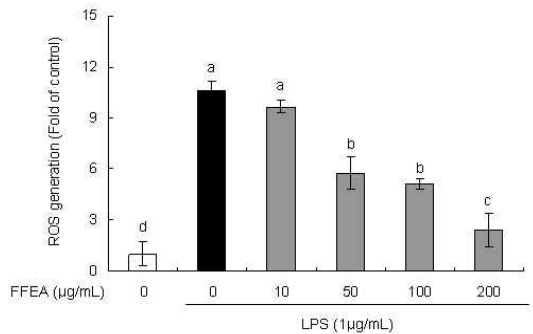


Fig. 3. Effect of ethyl acetate fraction from FFEA on ROS generation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of FFEA for 1 h before being incubated with 1 μg/mL LPS for 24 h. In the last 30 min of treatment, 10 μM DCF-DA was added. Values are mean±S.D. (n=3). Values are expressed as compared with vehicle. a-cBars with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey test.

3) FFEA의 NO 생성 및 iNOS mRNA 발현 저해

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 FFEA가 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS 처리에 의해 활성화된 RAW 264.7 cell에서 생성되어 배양액 중으로 유리된 NO의 농도를 NO₂-의 형태로 Griess 시약을 사용하여 정량하였다. 이는 NO가

매우 불안정하며 NO₂⁻ 형태로 즉시 변환되기 때문이다. 그 결과, LPS를 처리한 군은 LPS를 처리하지 않은 군 보다 NO 생성이 50 배 가량 증가되었으며, 이러한 LPS의 산화적 스트레스 유발에 관해서는 여러 문헌에서 보고된 바 있다⁵⁹⁻⁶¹. 산화적 스트레스 유발 상황에서 FFEA는 NO 생성을 농도의존적으로 억제하였고, 이때 IC50값은 65.71 µg/mL로 나타났다(Fig. 4A).

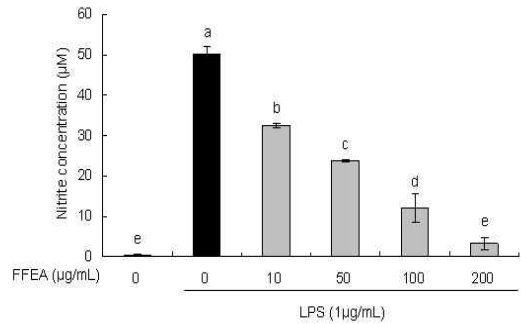
Wang 등⁶²과 Hsieh 등⁶³은 각각 *Polygala japonica*로부터 분리한 triterpenoid saponin과 *Chamaecyparis formosensis* Matasumura 이 LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에서 NO 생성을 저해한다고 보고한 바 있다. 또한, Suh 등⁶⁴의 보고에서는 천연에 존재하는 biflavonoid인 ochnaflavone이 LPS로 유도되는 NO 생성을 ERK1/2와 NF-κB regulation에 의해 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 본 실험에서 FFEA는 NO 생성 억제능이 뛰어난 것으로 나타났으며, 이는 FFEA에 함유된 페놀물질에 의한 것으로 보인다. 따라서 산화적 스트레스 유발 상황에서 FFEA의 NO 생성 억제작용은 FF의 항산화·항염증 효과에 기인한 것으로 사료되며 이같은 작용으로 신체의 만성적 질병상태로의 진행을 막아줄 것으로 기대된다.

Macrophage에서 NO의 생성은 NO 합성 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현과 직접적으로 연관되어 있다. 따라서 본 실험에서는 LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에서 FFEA 추출물이 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 FFEA 추출물을 농도별로 처리하여 1 시간 배양한 후, iNOS의 mRNA 발현 변화를 역전사 중합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현정도에 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 control로 사용하였다.

LPS는 Gram 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포 등을 자극하여 NO의 생성을 상승적으로 증가시킨다고 보고되고 있다⁶⁵. 본 실험 결과, LPS를 처리하지 않은 무처리군에서는 iNOS mRNA gene 발현이 거의 나타나지 않았지만, LPS를 처리한 군에서는 산화적 스트레스가 유발되어 920 bp에서 염증반응을 매개하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 iNOS mRNA gene 발현이 상당 수준으로 나타났다. 또한, FFEA 추출물을 처리했을 때, 10, 50, 100, 200 µg/mL에서 농도의존적으로 LPS에 의해 증가된 iNOS mRNA 발현이 저해되었다(Fig. 4B). NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다⁶⁶. Nitric oxide synthase (NOS)는 염증, 혈관확장, 신경전달, 중앙세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-arginine으로부터 NO를 생성하며⁶⁷, 염증 상태에서는 macrophage에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 보고되고 있다⁶⁸. iNOS의 발현은 NFκB 활성화로 유도되며 이는 macrophage에서 LPS나 cytokine에 의해 염증성 매개물질이 과잉 생산되는 중요한 메커니즘이 된다⁶⁹. 몇몇 천연 항산화물질인 페놀 화합물들은 직접적으로 NFκB 의존성 cytokine, iNOS 유전자 발현을 억제하여 염증을 억제하는 것으로 나타났다^{70,71}. 본 실험에서 FFEA 추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서 NO 생성을 저해하는 활성기전을 밝

히기 위해 FFEA 추출물이 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 확인한 결과, FFEA 추출물은 iNOS mRNA 발현을 억제함으로써 NO 생성을 감소시키고, 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다(Fig. 4).

A.



B.

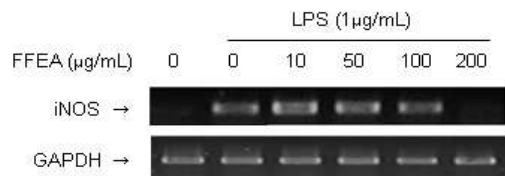


Fig. 4. Effect of FFEA on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) mRNA level in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of FFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite levels. Values are mean±S.D. (n=3). Values are expressed as compared with LPS-induced NO concentration without FFEA. +a-eBars with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey test. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of FFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 6 h and subjected to RT-PCR. PCR using house keeping gene GAPDH mRNA was carried out in parallel to confirm equivalency of cDNA preparation. The data was calculated and compared with vehicle from densitometry quantification of bands.

4) FFEA의 IL-1β, IL-6 및 TNF-α mRNA 발현 저해

FFEA가 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 proinflammatory cytokine의 형성을 억제하는지를 알아보기 위해 RT-PCR을 이용하여 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현을 측정하였다. TNF-α는 활성화된 macrophage, fibroblast 및 다른 여러 세포에서 생성되는데 이는 중앙세포에 영향을 미치는 숙주 방어인자 및 염증 매개 물질로 알려져 있다. IL-6의 생성은 TNF-α나 IL-1β 같은 요인 외에도 LPS에 의해 유도된다. 또한 IL-6는 염증유도 cytokine으로서 내인성 발열인자 (pyrogen)로 작용하며 면역 체계와 조혈 등에 다양한 영향을 미친다. 이들 proinflammatory cytokine은 in vitro 및 in vivo 모두에서 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있다⁷². LPS 처리에 의해 생성된 IL-1β, TNF-α는 FFEA 추출물 10, 50, 100, 200 µg/mL에 의해 농도 의존적으로 감소되었으며, IL-6는 10 µg/mL 농도에서도 관찰되지 않아 이들 cytokine의 형성 억제는 그것의 전사단계를 저해함에 의한 것임을 알 수 있었다(Fig. 5). 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 외부자

극이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 만성퇴행성 질환을 유발하게 된다⁷³⁾. 따라서, FFEA는 염증단계에 증추적 역할을 하고 있는 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α 의 발현을 저해 시킴으로써 pro-inflammatory factor의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있는 가능성이 높은 것으로 사료된다(Fig. 5).

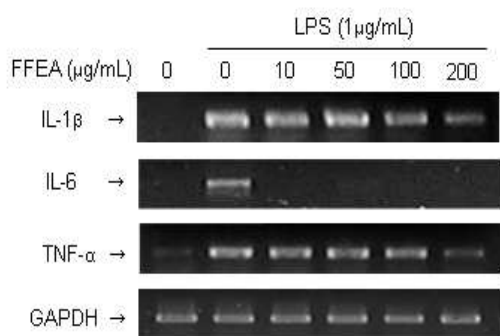


Fig. 5. Effect of ethyl acetate fraction from FFEA on mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were preincubated the different concentrations of FFEA for 1 h before being incubated with LPS (1 μ g/mL) for 6 h. Total RNAs were isolated and mRNA expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and GAPDH was determined by RT-PCR. The results presented are representatives of more than three independent experiments.

결 론

FF를 70% 에탄올로 추출하고 이를 용매 극성별로 계통 분류하여 in vitro 상에서의 항산화효과를 TEAC법에 의한 항산화효과, DPPH를 이용한 유리기 소거효과, ROS (superoxide anion, hydroxyl radical) 소거효과 및 RNS (NO radical, peroxyxynitrite) 소거효과에 의해 알아본 결과, EA 추출물에서 항산화효과가 높게 나타났다. 또한 human LDL에 대한 FF 추출물의 산화 억제효과를 검토한 결과 대조군으로 사용된 AA 보다 우수한 효과를 보여 FF의 우수한 항산화활성이 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적에 의해 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용될 수 있음을 시사하였다. 한편, LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 macrophage cell line에서 FFEA 추출물의 산화적 스트레스 및 염증 반응 억제 효과를 살펴 본 결과, FFEA는 ROS 및 NO 생성을 유의적으로 감소시켰고, iNOS mRNA 발현을 저해하였으며 proinflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현을 효과적으로 감소시켜 산화적 스트레스 매개 염증 반응을 강력하게 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 실험결과로부터 본 실험에 사용된 FF는 산화적 스트레스와 염증에 의해 유발되는 심혈관질환을 항산화·항염증 기작

을 통해 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 2009년 사망원인 통계 결과, 통계청, 2010.
2. Aruoma, O.I., Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 75: 199-212, 1998.
3. Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-247, 2000.
4. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420: 868-874, 2002.
5. Ross, R. Atherosclerosis—An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 340(2):115-126, 1999.
6. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 91: 179-194, 2003.
7. Delledonne, M., Polverari, A., Murgia, I. The functions of nitric oxide mediated signalling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxid. Redox Signal.* 5: 33-41, 2003.
8. Ali, K.A., Abdelhak, M., George, B., Panagiotis, K. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food Chem.* 89: 27-36, 2005.
9. Barene, A.L. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc.* 52: 59-63, 1975.
10. Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res.* 21: 289-299, 1993.
11. Hsieh, T.C., Wu, J.M. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Experimental Cell Res.*, 25: 109-115, 1999.
12. Pal, S., Choudhuri, T., Chattopadhyay, S., Bhattacharya, A., Datta, G.K., Das, T., Sa, G. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 658-665, 2001.
13. 전국한의과대학본초학교수 공편저, 「본초학」. 서울, 영림사, p 194, 2000.
14. 한방약리학 교재편찬위원회 저, 「한방약리학」. 서울, 신일상사, pp 145-148, 2006.
15. Song, G.S., Ahn, B.Y., Lee, K.S., Maeng, I.K., Choi, D.S. Effect of Hot Water Extracts from Medicinal Plants on the Mutagenicity of Indirect Mutagens. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 29(6):1288-1294, 1997.
16. Lee, K.T., Kim, B.J., Kim, J.H., Heo, M.Y., Kim, H.P. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use

- (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *Int J Cosmet Sci.* 19(6):291-298, 1997.
17. Lim, H.J., Lee, H.S., Ryu, J.H. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by tussilagone from *Farfarae flos* in BV-2 microglial cells. *Arch Pharm Res.* 31(5):645-652, 2008.
 18. Turker, A.U., Usta, C. Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Nat Prod Res.* 22(2):136-146, 2008.
 19. Cho, J., Kim, H.M., Ryu, J.H., Jeong, Y.S., Lee, Y.S., Jin, C. Neuroprotective and antioxidant effects of the ethyl acetate fraction prepared from *Tussilago farfara* L. *Biol Pharm Bull.* 28(3):455-460, 2005.
 20. Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. Phenolic and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effects of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J Agri Food Chem.* 48: 5338-5342, 2000.
 21. Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26: 1231-1237, 1999.
 22. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A.A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 84: 407-412, 1993.
 23. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200, 1958.
 24. Gotoh, N., Niki, E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochem Biophys Acta* 1115: 201-207, 1992.
 25. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol.* 186: 1-85, 1990.
 26. Nagata, N., Momose, K., Ishida, Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem. (Tokyo)* 125: 658-661, 1999.
 27. Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: 145-157, 1997.
 28. Yoon, M.A., Jeong, T.S., Park, D.S., Xu, M.Z., Oh, H.W., Song, K.B., Lee, W.S., Park, H.Y. Antioxidant effect of quinoline alkaloid and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scelopendra subspinipes*. *Biol Pharm Bull.* 29: 735-739, 2006.
 29. Yagi, K.A. Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 15: 212-216, 1976.
 30. Kaikkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agri Food Chem.* 47: 3954-3962, 1999.
 31. Kaur, C., Kapoor, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Tech.* 37: 153-161, 2002.
 32. Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.* 100(4):1409-1418, 2007.
 33. Yao, P., Nussler, A., Liu, L., Hao, L., Song, F., Schirmeier, A., et al. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol.* 47(2):253-261, 2007.
 34. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20: 933-956, 1996.
 35. Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem.* 47: 1035-1040, 1999.
 36. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Tech.* 26: 211-219, 2004.
 37. 남석현, 강미영. 한약재 열수추출물의 항산화효과 검증. *한국농화학회지* 43: 141-147, 2000.
 38. Sanchez, C.S., Gonzalez, A.M.T., Garcia-Parrilla, M.C., Granados, J.J.Q., Serrana, H.L.G., Martinez, M.C.L. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal Chim Acta* 593: 103-107, 2007.
 39. Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Anal Chim Acta* 558: 310-318, 2006.
 40. Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull.* 24(10):1202-1205, 2001.
 41. Halliwell, B., Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 57: 715-725, 1993.
 42. Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. Free radicals, antioxidants, and

- nutrition. *Nutrition*. 18: 872-879, 2002.
43. Frankel, E.N., Huang, S.W., Aeschbach, R. Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *J Am Oil Chem Soc*. 74: 1309-1315, 1997.
 44. Wrona, M., Patel, K., Wardman, P. Reactivity of 2',7'-dichloro dihydro fluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*. 38(2):262-270, 2005.
 45. Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., Darley-Usmar, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochem Biophys Acta* 1411: 385-400, 1999.
 46. Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Muhl, H., Nitsch, D., Pluss, C., Walker, G. Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase-potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell Biol Int*. 20: 51-58, 1996.
 47. Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G., Needleman, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7240-7244, 1993.
 48. McCartney-Francis, N., Allen, J.B., Mizel, D.E., Albina, J.E., Xie, Q.W., Nathan, C.F., Wahl, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 178: 749-754, 1993.
 49. Wolfe, T.A., Dasta, J.F. Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann Pharmacother*. 29: 36-46, 1995.
 50. Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., Szabo, C. Peroxynitrite induced cytotoxicity: metabolism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*. 140-141: 113-124, 2003.
 51. Rubbo, H., O'Donnell, V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology*, 208: 273-288, 2005.
 52. Fredrikson, G., Bjorkbacka, H., Ljungcrantz, I., Soderberg, I., Chyu, K.Y., Shah, P., Nilsson, J. Inhibition of atherosclerosis by apo B peptide vaccines in LDL receptor deficient mice expressing human apo B-100. *Atherosclerosis Supplements*, 9(1):38-39, 2008.
 53. Chen, C.Y., Milbury, P.E., Chung, S.K., and Blumberg, J. Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B-100 oxidation and conformation. *J Nutr Biochem*. 18(12):785-794, 2007.
 54. Witzum, J.L. The role of monocytes and oxidized LDL in atherosclerosis. In: *Atherosclerosis Reviews*. Leaf A. Weber PC. (eds). Ravan Press, New York, USA. 21: 59-69, 1990.
 55. Rotheneder, M., Puhl, H., Waeg, G., Striegl, G., Esterbauer, H. Effect of oral supplementation with D- α -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoprotein and resistance to oxidation. *J Lipid Res*. 32: 1325-1332, 1991.
 56. Meng, Q., Lewis, P., Wahala, K., Adlercreutz, H., Tikkanen. Incorporation of esterified soybean isoflavone with antioxidant activity into low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*. 1438: 369-376, 1996.
 57. Chen, T.Y., Pan, B.S. Ex vivo inhibitory effect on tilapia LDL oxidation and hypolipidemia properties of *Glycine tomentella* root extract. *Comp Biochem Physiol Part A* 148: 189-195, 2007.
 58. Djordjevic, V.B. Free Radicals in Cell Biology. *Int Rev Cytol*, 237: 57-89, 2004.
 59. Liu, Y.H., Lin, S.Y., Lee, C.C., Hou W.C. Antioxidant and nitric oxide production inhibitory activities of galacturonyl hydroxamic acid. *Food Chem*. 109(1):159-166, 2008.
 60. Yoshitake, J., Kato, K., Yoshioka, D., Sueishi, Y., Sawa, T., Akaike, T., Yoshimura, T. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: Involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Nitric Oxide*, 18(3):223-228, 2008.
 61. Shin, E.M., Zhou, H.Y., Guo, L.Y., Kim, J.A., Lee, S.H., Merfort, I., Kang, S.S., Kim, H.S., Kim, S.H., Kim, Y.S. Anti-inflammatory effects of glycyrol isolated from *Glycyrrhiza uralensis* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Int Immunopharm*. 8(11):1524-1532, 2008.
 62. Wang, H., Gao, J., Koua, J., Zhua, D., Yu, B. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine* 15: 321-326, 2008.
 63. Hsieh, Y.H., Kuo, P.M., Chien, S.C., Shyur, L.F., Wang, S.Y. Effects of *Chamaecyparis formosensis* Matasumura extractives on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Phytomedicine* 14(10):675-680, 2007.
 64. Suh, S.J., Chung, T.W., Son, M.J., Kim, S.H., Moon, T.C., Son, K.H., Kim, H.P., Chang, H.W., Kim, C.H. The naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK1/2 via NF- κ B regulation, in RAW264.7 cells. *Arch Biochem Biophys*. 447(2):136-146, 2006.
 65. Vásquez-Vivar, J., Whittsett, J., Ionova, I., Konorev, E., Zielonka, J., Kalyanaraman, B., Shi, Y., Pieper, G.M. Cytokines and lipopolysaccharides induce inducible nitric oxide synthase but not enzyme activity in adult rat cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med*. 45(7):994-1001, 2008.
 66. Simon, L.S. Role of regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med*. 106: 37S-42S, 1999.

67. Wendehenne, D., Dussably, A., Jeannin, E.F., Pugin, A. Nitric oxide: Chemistry and bioactivity in animal and plant cells. *Studies in Natural Products Chem.* 26(7):909-963, 2002.
68. Ziolo, M.T., Kohr, M.J., Wang, H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol.* 45(5):625-632, 2008.
69. Rees, M.D., Kennett, E.C., Whitelock, J.M., Davies, M.J. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic Biol Med.* 44(12):1973-2001, 2008.
70. Kolodziej, H., Burmeister, A., Trun, W., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Foo, L.Y. Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in Leishmania major-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem*, 13(23):6470-6476, 2005.
71. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., Margioris, A.N. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(10):1654-1661, 2006.
72. Ríos, J.L., Recio, M.C. Natural products as modulators of apoptosis and their role in inflammation. *Studies in Natural Products Chem.* 33(13):141-192, 2006.
73. Gorczyński, R.M. Understanding classical conditioning of immune responses. *Neuro Immune Biology* 1: 237-254, 2005.