

작약 메탄올 추출물 및 분획물의 Nitric Oxide 생성 억제 효과와 피부질환 원인균에 대한 항균활성

임도연¹ · 이경인^{2,3*}

¹광주여자대학교 미용과학과, ²동신대학교 생물자원산업화지원센터,
³조선대학교 바이오신약개발학과

Nitric Oxide Production Inhibitory Effect and Antibacterial Activity of the Extract and Fractions from Paeoniae Radix

Do Youn Im¹ and Kyoung In Lee^{2,3*}

¹Dept. of Beauty Science, Kwangju Women's University, Gwangju 506-713, Korea
²Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju, Jeonnam, 520-811, Korea
³Dept. of Bio New Drug Development, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea

Abstract – In this study, we investigated antibacterial activity and nitric oxide production inhibitory effect of the methanol extract and its fractions from Paeoniae Radix. In antibacterial activity by the disc diffusion assay against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*, the ethyl acetate fraction showed stronger antibacterial activity than other fractions and the extract. Moreover, the ethyl acetate fraction showed strong nitric oxide (NO) production inhibitory effect in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cell. However, in NO scavenging ability, the chloroform fraction was higher than the other fractions and the extract. In the lactate dehydrogenase (LDH) assay against RAW 264.7 cell, the extract and fractions were exhibited normal LDH release level as nontoxic result without the ethyl acetate fraction of 100 µg/ml. As a result, the ethyl acetate fraction and chloroform fraction of the methanol extract from Paeoniae Radix could be applicable to functional materials for antibacterial and anti-inflammatory related fields, respectively.

Key words – Paeoniae radix, Antibacterial, Anti-inflammatory, Nitric oxide, Cytotoxicity

병원성 미생물에 대처하기 위해 penicillin이 개발된 1940년 이후 수많은 감염성 질환의 완치가 가능해졌다. 그러나 2000년대 초부터 항생제 내성 균주에 의한 감염이 전 세계적으로 문제가 되면서 새로운 항생제 개발에 많은 노력이 이루어져 왔다. 그러나 세균의 내성 발현 속도에 비해 아직까지 효과적인 항생제의 개발 속도는 느린 편이며 개발된 이후에도 짧은 시간 안에 약제 내성이 보고되고 있다.^{1,2)} 따라서 효과적인 항생제의 개발 못지않게 기존의 항생제의 적절한 활용과 내성을 최소화시키는 노력이 필요한 상황이다. 기존의 국내 항생제 개발은 주로 합성에 의한 방법이 활용되고 있는데 합성 약물의 경우 그 직접적인 효력은 우수한 경우가 많지만 부작용이나 독성 등으로 인한 문제가 발생이 되기도 한다. 천연물의 경우 이러한 문제에서 일정부분

자유로울 수 있기 때문에 천연물에서 항균활성을 가지는 물질을 찾으려는 시도가 계속되고 있다.³⁻⁵⁾

한편, nitric oxide (NO)는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역기능 등이 있지만, 과량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다.⁶⁾ 또한 superoxide 음이온(O₂⁻)과 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite(ONOO⁻)를 생성하게 되는데 peroxynitrite는 단백질 및 지질의 과산화를 유도하고 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있고 반응 속도는 H₂O₂의 수천 배에 이르며 신경세포에서 짧은 시간 동안 급속한 손상을 유발하는 것으로 보고되고 있다.^{7,8)} 또한 생체 내에서 일어나는 염증 반응의 조절은 매우 복잡한 것으로 알려져 있는데 염증 과정 중에는 염증유도 cytokine류와 함께 많은 양

*교신저자(E-mail): kilee@bic.re.kr
(Tel): 82-61-336-3104

의 NO가 생성되는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 따라서 작약의 추출물을 대상으로 한 Hwang 등의 연구를 포함한 항염증 관련 연구에서 NO의 생성 억제나 소거 효과를 확인하고 있다.¹⁰⁻¹³⁾

다양한 처방이나 의약품의 원료로 사용되는 작약(Paeoniae Radix)은 약용 식물인 작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)의 뿌리 부위로 주로 염증, 진통 및 진경 등의 목적으로 오랫동안 생약재로 사용되어 왔다. 작약에 대한 생리활성 연구는 항염증, 항알러지, 진통 작용, 항균 활성 및 미백 효과 등에 대해서 이루어졌으며, 주요 성분으로 알려진 paeoniflorin은 면역 관련활성, 항염증 및 항알러지 활성 등 다양한 활성을 가진 것으로 보고되고 있다.¹⁴⁻¹⁸⁾

본 연구에서는 작약 메탄올 추출물과 그 용매별 분획물의 NO 생성 억제 및 소거 활성과 피부 질환과 관련성이 높은 병원성 세균에 대한 항균 활성, 그리고 *in vitro* 조건의 독성 연구에서 세포독성 측정 방법으로 자주 이용되고 있는 lactate dehydrogenase (LDH) assay를 이용한 세포독성 등을 조사하여 관련 분야에 활용될 수 있는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 - 본 실험에 사용한 작약은 2011년 6월 전라남도 화순의 생약농업협동조합에서 구입한 것으로 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

추출 및 분획 - 작약 시료 500 g을 blender를 사용하여 마쇄한 후 메탄올 10 l를 추출 용매로 하여 상온에서 48시간씩 3회 반복하여 추출을 실시하였다. 추출액은 여과와 농축 및 동결건조를 실시하여 추출물 106 g (수율 21.20%)을 얻었으며, 이 중 60 g을 증류수 1 l에 분산시킨 후 동량의 chloroform, ethylacetate, butanol을 사용하여 순차적으로 3회 반복하여 용매분획을 실시하였다. 분획된 시료는 여과와 농축 및 동결건조 후 추출물과 함께 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였는데, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 aqueous 분획의 수율은 각각 5.68%, 8.08%, 18.23% 및 68.01%이었다.

사용 균주 및 세포주 - 항균활성 실험에 사용된 미생물 균주인 *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 1917), *Staphylococcus aureus* (KCTC 3881), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 2004)와 세포독성 실험에 사용된 동물세포주인 RAW 264.7은 한국생명공학연구원 생명자원센터 (BRC)에서 분양 받은 것을 사용하였다. Raw 264.7 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 혼합한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 항균 실험에 사용된 미생물 균주들은 nutrient agar 및 broth 배지에서 37°C로 배양하였다.

Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정 - 시료의 항균활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였다. 항균시험용 평판배지는 계대 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 100 µl씩 도말하여 준비하였고, 시료를 disc당 0.25-0.5-1.0 mg이 되도록 paper disc(직경 6 mm)에 천천히 흡수시킨 뒤 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 후 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

Nitric oxide 소거능 측정 - Nitric oxide 소거능은 Marocci 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다.¹⁹⁾ 10 mM sodium nitroferricyanide (III) dihydrate 50 µl와 증류수에 일정농도로 용해시킨 시료액 30 µl를 혼합한 후 25°C에서 150분 동안 반응시켰다. 1% sulfanilamide (in 30% acetic acid) 60 µl를 혼합하고 5분 후 다시 0.1% N-(naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (in 60% acetic acid) 60 µl를 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료액 대신 증류수를 사용한 대조군의 결과를 기준으로 소거능을 계산하였다.

Nitrite Oxide 생성 억제 활성 측정 - Raw 264.7 세포를 96well plate에 1×10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 농도별 시료액과 lipopolysaccharide (LPS)를 혼합하여 24시간 동안 배양하였다. 이때 LPS는 최종 농도가 2 µg/ml가 되도록 하였다. 세포 배양액을 각 well에서 50 µl씩 회수하여 새로운 96well plate에 옮기고 50 µl의 1% sulfanilamide (in 5% H₃PO₄)를 첨가한 다음 10분간 혼합한 후, 다시 50 µl의 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride (in H₂O)를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켜 micro-plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료액 대신 PBS를 가하여 측정하였으며, 표준물질로 sodium nitrite를 농도별로 조제하여 동일한 방법으로 측정된 흡광도를 바탕으로 작성한 검량선을 이용하여 NO 생성량을 산출하였다.²⁰⁾

Lactate dehydrogenase (LDH) assay에 의한 세포독성 측정 - 세포 사멸시 세포막의 손상으로 인해 발생하는 LDH의 양을 측정하는 LDH cytotoxicity detection kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 사용하여 세포 독성을 확인하였다. 배양된 RAW 264.7 세포주를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양하여 부착 및 안정화시킨 후, 농도별로 희석한 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 상등액 100 µl와 LDH reagent 100 µl를 혼합하여 30분간 암조건에서 반응 시킨 다음 stop solution으로 1N HCl 50 µl를 가한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 LDH 방출량을 비교하였다.

통계분석 - 모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차(mean ± SD)로 표시하였고, 각 실험군

간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행하였으며, 유의성은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

결과 및 고찰

항균 활성 - 본 연구의 항균활성 실험에 사용된 미생물 균주는 그람양성 세균인 *Staphylococcus epidermidis*와 *Staphylococcus aureus*, 그리고 그람음성 세균인 *Pseudomonas aeruginosa*로 일반적으로 인간의 피부나 대기 등 환경 중에 존재하는 것을 알려져 있는 병원성 세균이다. 이들은 주로 염증을 통한 농의 형성과 발진 등의 형태로 감염 증상을 나타내고 각 세균별로 식중독이나 여드름, 중이염 등 다양한 형태의 난치성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 작약 methanol 추출물과 용매별 분획물의 항균활성의 결과를 Table I에 나타냈다. 모든 실험 균주에 대해 작약 methanol 추출물의 ethyl acetate 분획이 가장 강한 항균활성을 가지는 것으로 확인되었다. 다만, *P. aeruginosa*에 대해서는 실험이 실시된 농도 중 1 mg/disc에서만 항균력을 가지는 것으로 나타났다으며, *S. epidermidis*에 대한 항균력이 가장 높은 수준

으로 확인되었다. 분획물 중 다음으로 chloroform 분획이 높은 항균 활성으로 보였으나 녹농균인 *P. aeruginosa*에 대해서는 측정 농도에서 항균력을 나타내지 못했다. 이와 같은 항균 활성은 흰민들레 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 분획물의 항균 활성보다는 다소 낮은 것으로 판단할 수 있었으나 복분자 부위별 시료의 methanol 추출물을 대상으로 한 항균활성이나 산벚나무 수피 추출물 및 분획물의 항균활성과 비교해서는 유사하거나 더 높은 수준인 것으로 항균효과를 가지는 소재로서 작약의 이용 가능성을 확인하였다.^{4,5,21)} 한편, 기존 연구에서 보고한 작약의 항균활성으로 식품 변패와 관련된 미생물과 어병 원인 세균 등에 대한 것이 있었으며, 특히 대장균 등의 식품 변패 원인균에 대한 항균 활성에서 ethyl acetate 분획이 가장 강한 항균력을 나타냈다는 보고는 본 연구의 결과와도 동일한 것이었다.²²⁻²⁵⁾ 활성이 확인된 분획에 대해서는 추가적인 분리·정제 과정을 통하여 구체적인 항균 물질 분리의 규명이 필요할 것으로 판단되었다.

Nitric oxide 생성 억제 활성 및 소거능 - Nitric oxide (NO)는 free radical인 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)의 일종으로 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 citrulline으로 산화될 때 발생하는 반응성이 매우 높은

Table I. Antibacterial activities of the extract and fractions from *Paeoniae Radix* by disc diffusion assay (unit : mm)

	mg/disc	Bacterial strains			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Extract	1.00	- ¹⁾	10.37 ± 0.24	-	
	0.50	-	8.69 ± 0.55	-	
	0.25	-	-	-	
Fractions	CHCl ₃	1.00	9.05 ± 0.40 ²⁾	10.70 ± 0.80	-
		0.50	7.92 ± 0.12	7.65 ± 0.14	-
		0.25	-	-	-
	EtOAc	1.00	8.97 ± 0.52	13.56 ± 0.71	9.35 ± 0.32
		0.50	8.48 ± 0.44	11.42 ± 0.29	-
		0.25	7.24 ± 0.15	9.66 ± 0.11	-
	BuOH	1.00	-	9.36 ± 0.47	-
		0.50	-	8.36 ± 0.28	-
		0.25	-	-	-
Aqueous	1.00	-	-	-	
	0.50	-	-	-	
	0.25	-	-	-	
Negative control ³⁾		-	-	-	
Streptomycin ⁴⁾ (0.1 mg/disc)		19.94 ± 0.88	8.10 ± 0.22	30.78 ± 1.23	
Clindamycin ⁵⁾ (0.1 mg/disc)		35.36 ± 0.33	39.55 ± 0.90	-	

¹⁾No inhibition. ²⁾Values are mean ± SD(n=3). ³⁾Negative control : sample diluents. ^{4,5)}Streptomycin and clindamycin were used as a positive control.

것으로 알려져 있다. 정상적인 농도로 존재하는 NO는 심혈관계와 신경계 및 면역계의 전달 물질로서 신경전달물질의 운반하거나 종양을 억제하는 작용, 감염성 병원체에 대한 억제 등 매우 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다. 그러나 과도하게 발현된 NO는 독성 radical로 작용하여 인체에 유해한 영향을 주는 세포손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 보고되고 있다.²⁶⁾ 이와 같은 NO를 임의적으로 다량 생성시키기 위해 사용되는 lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 독소로서 RAW 264.7 cell과 같은 macrophage에 작용하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α)나 interleukin-6 (IL-6) 등과 같은 여러 가지 inflammatory cytokine의 발현과 함께 NO의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 따라서 항염증 활성을 가지는 물질이나 소재에 대한 연구들에서 NO의 생성 억제나 소거 활성에 대한 검토는 필수적으로 수행되어지고 있다.²⁸⁻³⁰⁾

LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 cell에서 작약 methanol 추출물과 분획물의 NO 생성 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. LPS가 미처리된 control에 비해 LPS만 처리된 실험군에서 현저하게 높은 농도로 생성된 NO에 비해 시료가 처리된 실험군에서 농도에 따라 NO 생성을 억제한 결과를 확인할 수 있었다. 특히 chloroform과 ethyl acetate 분획물의 NO 생성 억제 효과가 강한 것으로 나타났으며, butanol이나 aqueous 분획의 경우는 추출물과 유사하거나 농도에 따라서는 낮은 효과를 보였다.

한편, 이미 생성된 NO를 소거할 수 있는 활성의 정도를

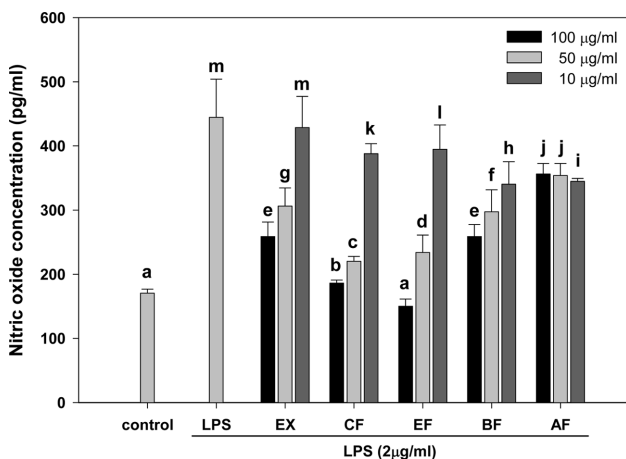


Fig. 1. Nitric oxide production inhibitory activities of the extract and fractions from Paeoniae Radix in LPS stimulated RAW 264.7 cell. Values are mean \pm SD (n=4). EX: methanol extract, CF: chloroform fraction, EF: ethyl acetate fraction, BF: butanol fraction, AF: aqueous fraction. Different superscript letters in the same concentration show significant differences at $p<0.05$ by one-way ANOVA.

확인하기 위해 실시한 NO 소거능 측정에서 작약 methanol 추출물의 chloroform 분획물이 다른 분획에 비해 높은 소거능을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 2). Aqueous 분획을 제외한 모든 추출물 및 분획물에서 농도의존적인 소거능을 보였으며, 극성이 낮은 용매 분획이 상대적으로 높은 소거능을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에서 작약 methanol 추출물과 분획물이 NO 생성 자체를 억제할 뿐만 아니라 다양한 원인으로 이미 생성된 NO에 대한 소거 효과를 바탕으로 한 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되었다. 최근 작약과 함께 다른 약재의 NO 생성 억제 활성을 추출물 수준에서 비교한 국내의 연구보고에 나타난 작약 추출물의 활성과 본 연구의 결과 중 추출물의 활성이 유사한 수준으로 나타난 것으로 확인되었다.¹¹⁾ 이러한 작약의 NO 생성 억제 활성이 추출물 중 ethyl acetate와 chloroform 분획에서 더 높은 것으로 나타남으로써 관련된 활성의 연구나 소재 개발 등에 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

LDH assay에 의한 세포독성 - 작약 methanol 추출물과 분획물의 세포독성은 세포막이 파괴되면서 방출되는 물질로 알려져 있는 lactate dehydrogenase (LDH) 방출량을 기준으로 독성의 수준을 판단하는 LDH assay를 활용하였다.³¹⁾ Mouse 유래의 macrophage인 RAW 264.7 세포에 대한 LDH assay 결과를 Fig. 3에 나타내었다. NO 생성 억제 활성을 측정하였던 농도 구간을 대상으로 실시한 LDH 방출량 측정에서 시료를 처리하지 않은 대조군의 LDH 방출량과 비교하여 93.42~99.08% 수준으로 나타나 독성을 나타내는 수준은 아닌 것으로 판단되었다. 다만, ethyl acetate 분

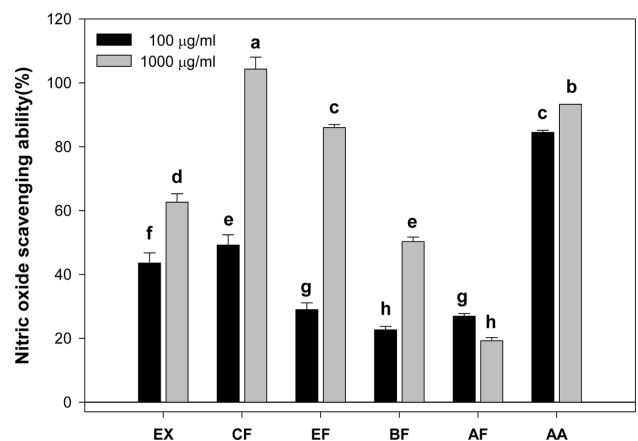


Fig. 2. Nitric oxide scavenging abilities of the extract and fractions from Paeoniae Radix. Values are mean \pm SD (n=3). EX: methanol extract, CF: chloroform fraction, EF: ethyl acetate fraction, BF: butanol fraction, AF: aqueous fraction, AA: ascorbic acid. Ascorbic acid was used as a positive control. Different superscript letters in the same concentration show significant differences at $p<0.05$ by one-way ANOVA.

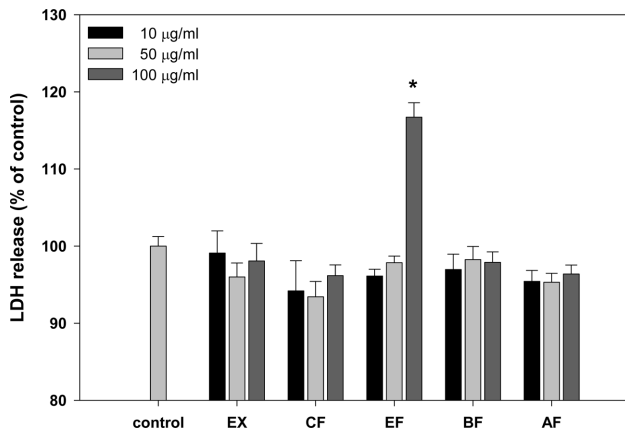


Fig. 3. LDH release of the extract and fractions from *Paeoniae Radix* in RAW 264.7 cell. Values are mean±SD (n=4). EX: methanol extract, CF: chloroform fraction, EF: ethyl acetate fraction, BF: butanol fraction, AF: aqueous fraction. Superscript letter(*) in the figure show significant difference compared with control at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

획물을 100 µg/ml로 처리한 실험군에서 116.71%의 LDH 방출량을 보임으로써 낮은 수준이기는 하지만 세포의 성장이나 분열을 저해할 수 있음이 확인되었다. 이는 약액 methanol 추출물과 분획물을 대상으로 한 선행 연구에서 MTT assay에 의한 세포독성 측정 결과와도 동일한 양상으로 판단되는 것으로 약액의 ethyl acetate 분획물의 활용에 있어서 적절한 농도의 설정이 중요함을 알 수 있었다.¹⁸⁾

결론

약액의 병원성 세균에 대한 항균활성과 항염증 활성과 관련 활성을 확인하기 위해 methanol 추출물과 그 용매별 분획물을 대상으로 disc diffusion assay에 의한 항균활성, NO 생성 억제 및 소거 효과 등을 조사하였다. *S. aureus*, *S. epidermidis* 등 일반적인 환경이나 인체에 상재하는 병원성 세균에 대한 항균활성 측정 결과, 약액 methanol 추출물의 ethyl acetate 분획에서 다른 추출물과 분획물보다 높은 수준의 항균 활성을 확인할 수 있었다. 항염증 활성의 탐색에서 중요하게 다루지는 NO의 생성 억제 효과에서도 ethyl acetate 분획물에서 상대적으로 높은 활성이 확인되었으나 LDH assay 결과에서 실험이 실시된 가장 높은 농도에서 일부 독성의 가능성이 확인되었다. 따라서 추가적으로 실시된 NO 소거능 측정에서 가장 높은 활성을 보였고 세포독성도 없는 것으로 확인되었으며, NO 생성 억제 활성에서 ethyl acetate 분획 다음으로 높은 억제 활성을 나타낸 chloroform 분획이 항염증 활성 소재로서는 더 높은 가능성을 가지는 것으로 판단되었다.

인용문헌

- Lee, M. S. (2009) New antimicrobials on the horizon. *Kor. J. Medicine* **77**: 35-51.
- Song, J. H. (2009) Current status and future strategies of antimicrobial resistance. *Kor. J. Medicine* **77**: 143-151.
- Lee, K. I., Choi, C. H., Kim, S. M. and Pyo, B. S. (2010) Antibacterial activity and Enhancing antibiotic effect of extract and fractions from *Curcuma longa* against MRSA strain. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 38-42.
- Lee K. I., Yang, S. A., Pyo, B. S. and Kim, S. M. (2011) Antibacterial activity against pathogens of acne and tyrosinase inhibitory activity of extract and fractions from bark of *Prunus sargentii*. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 155-160.
- Im, D. Y. and Lee, K. I. (2011) Antioxidative and antibacterial activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **19**: 238-245.
- Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R. and Kim, Y. M. (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 1075-1079.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls, the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**: 4244-4250.
- Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthhouwer, R. E. and Bast, A. (1997) Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 591-593.
- Byun, S. H., Yang, C. H. and Kim, S. C. (2005) Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. *Kor. J. Herbology* **20**: 7-16.
- Lee, K. I., Yang, S. A. and Kim, S. M. (2011) Antioxidative and nitric oxide production inhibitory activities of *Lespedeza bicolor* stem extracts depending on solvents. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **19**: 368-372.
- Hwang, E. Y., Kim, D. H., Kim, H. J., Hwang, J. Y., Park, T. S., Lee, I. S. and Son, J. H. (2011) Antioxidant activities and nitric oxide production of medicine plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Polygonatum odoratum* var. pluroflorum, *Paeonia lactiflora*). *J. Appl. Biol. Chem.* **54**: 171-177.
- Lee, K. I. and Im, D. Y. (2011) Biological activities of the water extract and its fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 195-200.
- Lee, S. J., Lee, I. S. and Mar, M. (2003) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose in murine macrophage cells. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 832-839.
- Yang, H. O., Ko, W. K., Kim, J. Y. and Ko, H. S. (2004) Paeoniflorin: an antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia* **75**: 45-49.

15. Yamahara, J., Yamada, T., Kimura, H., Sawada, T. and Fujimura, H. (1982) Biological active principles of crude drugs. II. Anti-allergic principles in "Shoseiryu-To" anti-inflammatory properties of paeoniflorin and its derivatives. *J. Pharmaco-Dynamics* **5**: 921-929.
 16. Wei, W.-S., Wang, Y.-Q. and Wang, S.-Y. (1987) Immunoregulatory effects of total glucosides of paeony root in mice. *Chin. Pharmacol. Bull.* **3**: 148-152.
 17. Park, K. D. and Cho, S. H. (2010) Antimicrobial characteristics of *Paeonia lactiflora* Pall. extract tested against food-potrefactive microorganisms. *Korean J. Food Preserv.* **17**: 706-711.
 18. Im, D. Y. and Lee, K. I. (2011) Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of the extract and fractions from *Paeoniae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 323-328.
 19. Marcocci, L., Maguire, J. J., Droy-Lefaix, M. T. and Packer, L. (1994) The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 748-755.
 20. Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**: 2407-2412.
 21. Lee, K. I., Kim, S. M., Kim, S. M. and Pyo, B. S. (2011) Comparison of fatty acids and antibacterial activity against pathogen of acne in different parts of ripened black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**: 466-469.
 22. Park, K. D. and Cho, S. H. (2010) Antimicrobial characteristics of *Paeonia lactiflora* Pall. extract tested against food-potrefactive microorganisms. *Korean J. Food Preserv.* **17**: 706-711.
 23. Choi, H. Y. (2009) Antimicrobial activity of *Paeonia japonica* extract and its quality characteristic effects in *Sulgidduk*. *Korean J. Food Cookery Sci.* **25**: 435-444.
 24. Hwang, J. S., Chun, H. J. and Han, Y. S. (2000) Isolation and identification of antimicrobial compound from Jakyak (*Paeonia japonica* var. *pilosa* Nakai). *Korean J. Soc. Food Sci.* **16**: 445-452.
 25. Choi, H. S., Kim, Y. C., Lee, J. S., Jo, M. R., Seo, C. H. and Park, S. I. (2004) Antibacterial activities of hot-water and ethyl alcohol extracts of medicinal herbs on fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.* **17**: 39-55.
 26. Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R. and Kim, Y. M. (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 1075-1079.
 27. Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jang, Y., Lee, S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. (2004) Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor(NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 617-620.
 28. Kang, T. B. and Yoon, T. J. (2011) Effect of herbal composition on alcohol degradation and anti-inflammatory activity in mice. *Korean J. Food & Nutr.* **24**: 489-495.
 29. Ko, S. K. and Pyo, M. Y. (2011) Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus* extracts in lipopolysaccharide-induced mouse peritoneal macrophage. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 253-259.
 30. Lee, J. Y., Ko, S. H., Lee, Y. J., Lee, S. Y., Park, H. J., Shin, T. Y. and Jeon, H. (2010) Anti-inflammatory effect of MeOH extract of *Cibotium barometz* in IFN- and LPS-stimulated mouse peritoneal macrophage. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 108-114.
 31. Fotakis, G. and Tmbrell, A. J. (2006) In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* **160**: 171-177.
- (2012. 3. 8 접수; 2012. 4. 18 심사; 2012. 5. 2 게재확정)