

사매 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효과

이덕재 · 전인화 · 김현수 · 조일영 · 장선일*

전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

Antioxidative and Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract from *Duchesnea chrysantha*

Deok Jae Lee, In Hwa Jeon, Hyeon Soo Kim, Il Young Cho, Seon Il Jang*

School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

Oxidative stress has been implicated in cutaneous damage in various inflammatory skin diseases, including atopic dermatitis. The present study was undertaken to investigate the antioxidative and anti-inflammatory activities of the extract of *Duchesnea chrysantha* (DCE). DEC was prepared by extracting with 80% ethanol. Total flavonoids and polyphenols were measured by a colorimetric assay. The free radical scavenging activity of the extract was analyzed by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) and Griess reagent assay. An oxidative product of nitric oxide (NO), was measured in the culture medium by the Griess reaction. The level of prostaglandin E₂ (PGE₂) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were measured by Western blot analysis. Total flavonoid and polyphenol contents of DCE were included 24.73±0.45 and 178.77±2.65, respectively. DCE significantly increased electron donating ability (DPPH), nitrite scavenging (NO) and ABTS reducing activity in dose dependant. We investigated the anti-inflammatory effects of DCE on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. DCE significantly suppressed NO and prdstaglandin E₂ (PGE₂) in dose dependant. Furthermore, the levels of iNOS and COX-2 protein expressions were markedly suppressed by the treatment with DCE in a dose dependent manner. These results suggest that DEC may has value as natural product with its high quality functional components, antioxidative and anti-inflammatory activities.

Key words : *Duchesnea chrysantha*, ethanol extract, antioxidant, anti-inflammation

서 론

산화적 스트레스(oxidative stress)는 지질, DNA, 탄수화물과 단백질에 영향을 주는 산화물질[반응산소물질(reactive oxygen species, ROS)]과 항산화 물질간의 불균형을 초래 한다^{1,2)}. 그 결과로 DNA 손상을 비롯하여 세포 내 유리 칼슘과 철 이온 농도의 증가, 생체막의 이온 수송계 손상, 단백질 손상, 지질 과산화를 포함한 세포대사의 심각한 이상 초래, 간경변증, 지방간, 심혈관계 질환, 암, 백내장, 폐기종, 노화색소로 알려진 소모성 적갈색 색소(lipofuscin) 및 도파민, 세크레토닌, acetylcholine 등 신경 전달 물질에 영향을 주어 생체에 치명적 손상을 줄 수

있다²⁻⁶⁾.

산화적 스트레스의 주요 원인물질인 ROS는 DNA에 손상을 주어 여러 가지 대사 및 생화학적 변화를 초래하는 주요원인으로 알려지면서 부착단백질 또는 염증관련 사이토카인의 발현을 향상시켜 염증반응을 더욱 악화시키는 것으로 알려졌다⁶⁾. 또한 인체에서 외부물질에 대한 면역반응과정에서 대량 생산되는 ROS와 반응질소물질(reactive nitrogen species, RNS) 등 산화적 스트레스를 야기하는 물질들은 생체의 항상성 유지에 필요한 항산화 물질들을 고갈시켜 만성적인 염증질환을 더욱 악화 시킨다^{2,6)}. 특히 아토피 피부염을 비롯한 여러 가지 염증성 질환에 있어서 과량의 ROS와 RNS는 피부손상을 가속 시킨다^{4,6)}. 그러므로 알레르기성 염증질환을 비롯한 각종 인체질환을 치료 또는 개선하기 위해서는 생체의 항산화 기능을 증가시킬 수 있는 물질의 공급이 필요하다⁷⁾.

* 교신저자 : 장선일, 전주시 완산구 효자동 3가, 전주대학교 대체의학대학

· E-mail : sonjjang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124

· 접수 : 2012/01/06 · 수정 : 2012/02/01 · 채택 : 2012/02/13

활성산소를 제거하는 물질을 항산화제라 하는데, 대부분의 식물에서 이러한 항산화 효과를 나타내는 물질이 분리·동정되고 있다. 따라서 최근 연구는 식용 또는 약용식물로부터 항산화 효과가 우수한 종을 발굴하여 각종 인체질환을 개선 또는 치료하기 위한 방향으로 연구되고 있다^{7,9)}.

뱀딸기(*Duchesnea chrysantha*)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 초본으로, 꽃은 4-5월에 황색으로 피고, 열매는 붉은색으로 식용할 수 있으며, 우리나라 전역에 서식하고 있다. 전초를 생약명으로 사매^{9,10)}라 하는데, 사매는 청혈, 해독, 소염, 지혈, 항종양, 외과창상 등에 사용되어왔다^{10,11)}. 민간에서는 태열, 치통에 사용되며, 임상적으로는 백후, 세균성 이질에 치유 효과를 나타낸다고 보고되었다¹⁰⁾. 최근에 사매에 대한 연구는 위암, 방광암, 신장암, 전립선암 및 백혈병 유래 세포주들에서 항암효과가 있고¹²⁻¹⁵⁾, 아토피 피부염 및 친식모텔동물에서 개선효과가 있는 것으로 보고되었다^{16,17)}. 그러나 사매 에탄올 추출물에 대한 구체적인 항산화 효과와 항염증 효과에 대해서는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구는 사매를 대상으로 80% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드와 폴리페놀 함량을 조사하고 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼, NO (nitric oxide) 유사 라디칼 및 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 제거에 대한 항산화 활성을 비교 분석하였으며, 더불어 항염증 설치류 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포주에서 NO와 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등과 같은 염증성 매개물의 억제를 조사한 결과 매우 흥미로운 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), Lipopolysacchride (LPS), Quercetin, potassium ferricyanide, sodium nitrite, trichloroacetic acid, butylated hydroxy anisole (BHA), dimethyl sulfoxide (DMSO), Folin-Ciocalteu reagent, sodium nitroprusside, sulfanilamide, N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, sodium carbonate, aluminum chloride, phenazine methosulfate, sulphanilamide, sodium chloride, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole (MTT) 및 기타 시약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich 사(MO, USA)로부터 구입하였다. Prostaglandin E₂(PGE₂) assay kit은 R&D Systems (Minneapolis, USA)사로부터 구입하였다. Anti-iNOS, anti-COX-2 antibody는 Santa cruz biotechnology Inc.(California, USA)로부터 구입하였다. RPMI 1640 배지, fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

2) 사매 에탄올 추출

실험에 사용한 사매(*D. chrysantha*)는 전라남도 담양군에서

채취한 후 우석대학교 한의과대학 방제학교실의 김홍준 교수에게 의뢰하여 동정하였고, 표본(2011-021)은 전주대학교 대체의학 대학 건강관리 연구실에 보관하고 있다. 말려진 시료는 200 g를 분말로 제조하여 80% 에탄올 2 L를 주입하고 밀봉하여 7일간 방치한 후 용액을 취하여 3,000 rpm으로 원심침전 시키고 상층액만 취하여 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하였다. 여과된 시료는 회전진공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축한 후 회수한 후 동결건조기(Eyela FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 건조하여 48.9 g를 회수한 후 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis법¹⁸⁾에 따라 메탄올 1 mg/mL의 농도로 용해한 각 용매별 추출액, Folin-Ciocalteu 시약 및 10% NaCO₃용액을 각각 1 ml씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 방치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)를 0-100 μg/mL의 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드는 Moreno등¹⁹⁾의 방법에 따라 1 mg/mL 농도의 시료액에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 방치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하여 0-100 μg/mL 농도범위에서 얻은 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

3) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois의 방법²⁰⁾으로 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 15, 30, 60, 125, 250 및 500 μg/mL이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 μL를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 μL를 넣어 총량이 200 μL가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%)

$$= \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

4) 아질산염 소거 활성 측정

Gray와 Dugan의 방법²¹⁾에 따라 일정 농도의 시료 1 mL에 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL를 가한 뒤 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer를 이용하여 각각 pH 1.2, 3.0 및 6.0으로 보정한 다음 총 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37℃에서 1시간 반응시킨 다음 각 반응액 1 mL를 취하여 2% acetic acid 3 mL과 30% acetic

acid 용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1:1) 0.4 mL를 가하고 잘 혼합하여 실온에서 15분간 방치한 후 ELISA reader (Molecular Devies, USA)로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

아질산염 소거 활성(%)

$$= \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

5) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등²²⁾의 방법에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 혼합한 다음 실온·암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성한 다음 ABTS 용액을 실험직전에 732 nm에서 흡광도가 0.70±0.03 (평균±표준편차)이 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 추출물(1 mg/mL) 50µL에 준비된 ABTS 용액 950 µL를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성(%)

$$= \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

6) MTT 분석

설치류 RAW 264.7 대식세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS), penicillin G (100 IU/mL)와 streptomycin (100 µg/ml)이 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하여 습기가 충분하고 37°C가 유지되는 CO₂ 배양기(5% CO₂와 95% 공기)에서 배양하였다. RAW 264.7 대식세포(1×10⁵/mL)는 여러 농도의 추출물을 2시간 동안 처리한 후 LPS (1 µg/mL)를 주입하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다.

7) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(Griess reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 µL의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 시료를 각각 100 µL씩을 첨가한 후 그 혼합물을 37°C에서 10분간 반응시켰다. 각각의 반응물의 흡광도는 spectrophotometer (MD, U.S.A.)을 사용하여 540 nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준곡선으로부터 계산하였다.

8) PGE₂의 측정

RAW 264.7 대식세포(1×10⁵/mL)를 여러 가지 농도(25-200 µ

g/mL)의 추출물을 2시간동안 전 처리한 후 LPS (1 µg/mL)로 자극 한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 24시간 후에 상층액을 얻어 PGE₂를 측정하였다. PGE₂의 측정방법은 R&D사 (Minneapolis, U.S.A.)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였다.

9) iNOS와 COX-2의 Western blot

추출물이 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법²³⁾에 따라 정량하고 50 µg을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 triton-tris buffered saline (TTBS)로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 tris buffered saline (TBS)로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1:1,000) 또는 anti-COX-2 (1:500)를 주입하여 3 시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 goat anti-rabbit IgG (1:2,000)을 첨가하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 enhanced chemiluminescence (ECL)방법으로 발색시켰다.

10) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준편차로 표시하였고, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 사매 추출물의 총 플라보노이드와 폴리페놀의 함량

본 연구는 사매 80% 에탄올 추출물의 항산화 활성에 중요한 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 조사하였다. 그 결과 총 폴리페놀은 에탄올 추출물 1 g당 48.5±0.7 mg으로 총 플라보노이드의 함량(7.8±0.3 mg/g) 보다 약 6.2배 높았다. 이와 같이 사매의 높은 함량의 총 폴리페놀은 항산화 활성 및 항염 효과를 나타내 줄 가능성이 매우 높았다.

2. 사매 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

사매 80% 에탄올 추출물의 항산화 활성 중 DPPH 라디칼 소거 활성을 알아보기 위해서 합성 항산화제로 잘 알려진 butylated hydroxytoluene (BHT)와 비교하여 조사하였다. 먼저 사매 추출물과 BHT 농도를 각각 31.25-1,000 µg/mL까지 농도를 적정한 후 DPPH 라디칼 소거 활성을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 저 농도에서는 80% 에탄올 추출물이 BHT보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 높았고, 250 µg/mL 농도에서는 사매 추출물이 56.7±3.5%로 나타나 BHT(58.9±4.1%)의 활성과 유사하였으나, 500-1,000 µg/mL의 고농도에서는 BHT가 사매 추출물보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 높았다.

3. 사매 추출물의 NO 유사 라디칼 소거 활성

다음은 사매 80% 에탄올 추출물의 NO 유사 라디칼 소거 활성을

알아보기 위해 vitamin C (L-ascorbic acid)와 비교하여 조사하였다. 사매 추출물과 vitamin C의 농도를 각각 31.25-1,000 µg/mL 까지 농도를 적정한 후 NO 유사 라디칼 소거 활성을 조사한 결과 Fig. 2과 같이 전 농도에서 사매 80% 에탄올 추출물의 NO 유사 활성이 vitamin C보다 유의하게 높았으며, 농도에 의존적으로 그 활성이 증가되었다. 특히 사매 에탄올 추출물 500 µg/mL 농도(35.6±2.2%)에서는 vitamin C(24.4±2.3%)보다 현저한 NO 유사 라디칼 소거 활성을 보였다. 이와 같이 사매 에탄올 추출물은 NO 유사 라디칼 소거 활성이 매우 우수하였다.

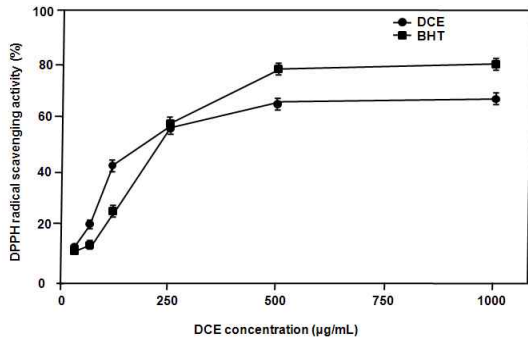


Fig. 1. Effect of *D. chrysantha* extract on DPPH radical scavenging activity. The extract of whole body from *D. chrysantha* (DCE) was prepared by 80% ethanol. DPPH radical scavenging activity of each extract (31.25-1,000 µg/mL) was measured at 30 min as described in the section of Materials and Methods. To determine whether MLE had antioxidant activity, we performed DPPH radical scavenging activity assay using as the known antioxidative substance (butylated hydroxytoluene, BHT) as reference compound. Values are shown as mean ± S.D. of 3 replicates.

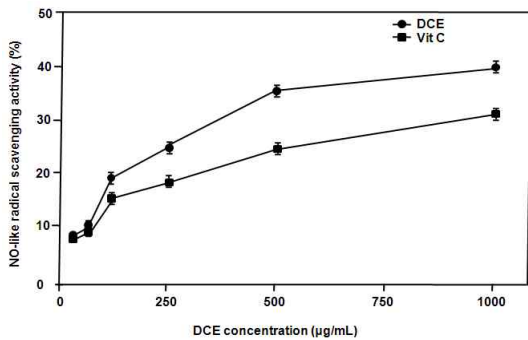


Fig. 2. Effect of *D. chrysantha* extract on NO-like radical scavenging activity. The extract of whole body from *D. chrysantha* (DCE) was prepared by 80% ethanol. NO-like radical scavenging activity of each extract (31.25-1,000 µg/mL) was measured by Griss reagent as described in the section of Materials and Methods. To determine whether MLE had antioxidant activity, we performed DPPH radical scavenging activity assay using as the known antioxidative substance (vitamin C, Vit C) as reference compound. Values are shown as mean ± S.D. of 3 replicates.

4. ABTS 라디칼 소거 활성

마지막으로 사매 80% 에탄올 추출물의 황산화 활성 중 ABTS 라디칼 소거 활성을 알아보기 위해서 vitamin C와 비교하여 조사하였다. 먼저 사매 추출물과 vitamin C 농도를 각각 31.25-1,000 µg/mL까지 농도를 적정한 후 ABTS 라디칼 소거 활성을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 사매 80% 에탄올 추출물은 전 농도에서 ABTS 라디칼 소거 활성이 vitamin C의 활성 보다 낮

았지만 농도 의존적으로 증가하였다. 사매 추출물 500 µg/mL와 1,000 µg/mL 농도에서는 각각 51.2±2.8%와 69.8±4.3 µg/mL으로 나타나 비교적 황산화 활성이 우수한 것으로 조사되었다.

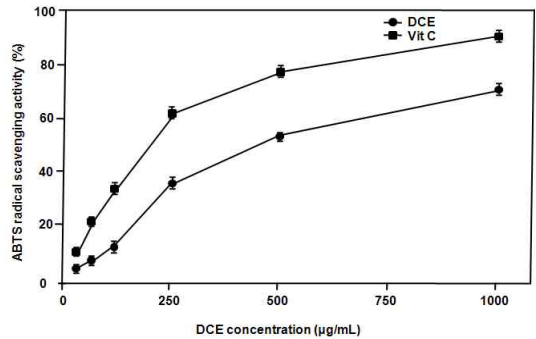


Fig. 3. Effect of *D. chrysantha* extract on ABTS radical scavenging activity. The extract of whole body from *D. chrysantha* (DCE) was prepared by 80% ethanol. ABTS radical scavenging activity of each extract (31.25-1,000 µg/mL) was measured by ABTS assay method as described in the section of Materials and Methods. To determine whether MLE had antioxidant activity, we performed DPPH radical scavenging activity assay using as the known antioxidative substance (vitamin C, Vit C) as reference compound. Values are shown as mean ± S.D. of 3 replicates.

5. 세포 생존율에 미치는 사매 추출물의 효과

한편 사매 80% 에탄올 추출물이 LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 (1×10⁵/mL)를 RPMI 1640(1% P/S, 10% FBS) 배지를 사용하여 세포 부유액을 만든 다음 여러 가지 농도의 사매 에탄올 추출물을 주입하고 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때, LPS만 자극하였을 경우 82.2±3.5%로 감소되었으나, 사매 에탄올 추출물 처리군은 농도에 의존적으로 세포생존율이 증가되었다(p<0.05와 p<0.01). 따라서 본 연구에 사용된 사매 에탄올 추출물은 어느 농도에서도 세포독성이 없었고, 오히려 LPS 자극에 대한 세포 보호 효과가 있었다.

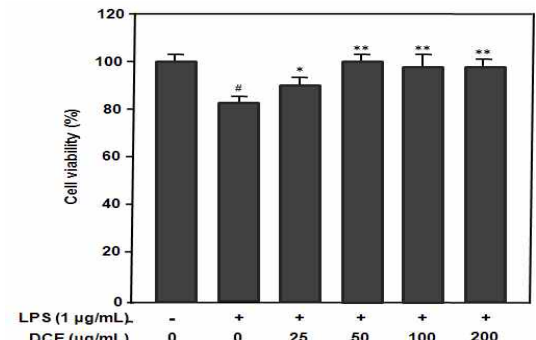


Fig. 4. Effect of *D. chrysantha* extract on cell viability in LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Cells were pretreated with or without DCE at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 µg/mL) for 24 h. Cell viability were measured by MTT assay as described in the section of Materials and Methods. Values are means ± S.D. of three independent experiments. #p<0.01 versus the non-treated control group. *p<0.05 and **p<0.01 versus control group treated with LPS alone.

6. NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 사매 추출물의 효과

사매 80% 에탄올 추출물이 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포(1×10^5 /mL)를 접종하고 4시간 후에 사매 에탄올 추출물을 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)로 자극한 후 24시간 배양하고 배양액에 축적된 아질산염을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5A와 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 LPS로 자극하였을 경우 $17.8 \pm 1.7 \mu\text{M}$ 로 증가되었으나($p < 0.001$), 사매 에탄올 처리군은 농도에 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다. 특히 100-200 $\mu\text{g/mL}$ 사매 에탄올 추출물 처리군에서는 그 효과가 뚜렷하였다($p < 0.01$). NO 생성에 있어 사매 에탄올 추출물의 억제 효과에 대한 기전을 알아보기 위하여 배양세포의 iNOS 발현을 조사하였다. 그 결과 NO 생성에 대한 사매 에탄올 추출물의 억제 현상과 같이 iNOS 발현이 농도에 의존적으로 억제하였다 (Fig. 5B). 이러한 결과는 사매 에탄올 추출물이 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

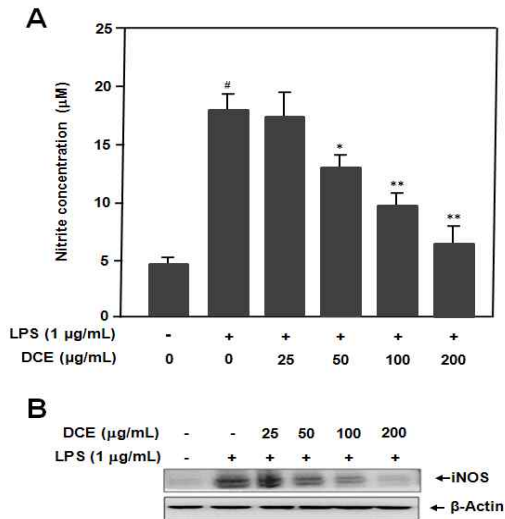


Fig. 5. Effect of *D. chrysanthemum* extract on LPS-induced NO production and iNOS expression in RAW 264.7. Cells were pretreated with or without DCE at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 18 h (iNOS) or 24 h (NO). (A) NO produced by cells was measured by the method of Griess. (B) Western blot analysis on iNOS expression was carried out as described in the section of Materials and Methods. Values are means \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control group treated with LPS alone.

7. PGE₂ 생성과 COX-2 발현에 미치는 DCE의 영향

사매 80% 에탄올 추출물이 PGE₂ 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포(1×10^5 /mL)를 접종하고 4시간 후에 DCE를 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)로 자극한 후 24시간 배양하고 배양액에 축적된 PGE₂를 측정하였다. 그 결과 Fig. 6A와 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 LPS로 자극하였을 경우 $3,450 \pm 312 \text{ pg/mL}$ 로 증가되었으나, 사매 에탄올 추출물 처리군에서는 농도에 의존적으로 PGE₂ 생성율이 감소되었다. 특히

50-200 $\mu\text{g/mL}$ 사매 에탄올 추출물 처리군에서는 그 효과가 우수하였다($p < 0.01$). 이와 같이 PGE₂ 생성에 있어 사매 에탄올 추출물의 억제 효과에 대한 기전을 알아보기 위하여 배양세포의 COX-2 발현을 조사하였다. 그 결과 PGE₂ 생성에 대한 사매 에탄올 추출물의 억제 현상과 같이 COX-2 발현이 농도에 의존적으로 억제하였다 (Fig. 6B). 이러한 결과는 사매 에탄올 추출물이 COX-2의 발현을 억제함으로써 PGE₂ 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

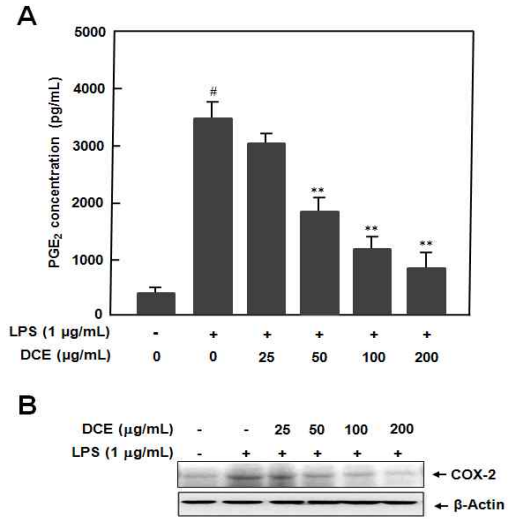


Fig. 6. Effect of *D. chrysanthemum* extract on LPS-induced PGE₂ production and COX-2 expression in RAW 264.7. Cells were pretreated with or without DCE at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 18 h (COX-2) or 24 h (PGE₂). (A) PGE₂ produced by cells was measured by ELISA assay and (B) Western blot analysis on COX-2 expression was carried out as described in the section of Materials and Methods. Values are means \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control group treated with LPS alone.

고찰

산화적 스트레스는 생체에서 산화촉진제(prooxidant)와 항산화제(antioxidant)의 불균형을 유발하여 각종 질환을 일으키는 것으로 알려졌다^{1,2)}. 특히 인체에 있어서 염증질환과 노화 또는 심혈관계 만성질환을 앓고 있는 환자의 경우 대량의 활성 산소가 생산되어 세포나 조직에 치명적 손상을 주게 된다³⁻⁷⁾. 그러므로 만성 및 염증성 질환을 예방하거나 치료하기 위해서는 생체에 존재하는 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소의 활성유지는 물론 비타민 C와 E, 셀레니늄을 비롯한 폴리페놀과 플라보노이드와 같은 외부 천연물질을 적당하게 섭취하는 것이 매우 중요하다. 최근에 O₂⁻, H₂O₂, ONOO⁻ 및 NO 등과 같은 활성 산소를 효과적으로 제거할 수 있는 천연물 유래 항산화 물질 발굴에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{1,7,8,25)}.

본 연구는 아토피 등 알레르기성 염증질환에서 나타나는 활성 산소를 제거하기 위한 효과적인 천연물을 발굴하고자 사매를 대상으로 80% 에탄올로 추출하고 그 추출물의 항산화 활성을 조사하였다. 본 연구결과 사매 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량

은 총 플라보노이드 함량에 비해 약 6.2배 높았다. 또한 사매 에탄올 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해서 DPPH, NO 유사 그리고 ABTS 라디칼에 대한 소거 활성을 조사한 결과 항산화 활성이 우수한 결과를 얻었다. 특히 NO 유사 라디칼 소거 활성의 경우 vitamin C보다 그 활성이 우수하였다.

일반적으로 녹차를 비롯한 녹황색 채소의 경우 폴리페놀과 플라보노이드 계열의 화합물이 많이 함유되어 있어 인체의 만성 질환을 예방하거나 개선하는데 활용되고 있다^{7,10,26}. 특히 폴리페놀 계열의 화합물은 현재 8,000여개가 동정되어 있는데, 우리는 일상적으로 이 계열의 화합물을 음식으로부터 섭취하고 있다^{24,26}. 그런데, 육식위주의 서구화된 식생활을 하는 현대인은 인체에서 필요한 항산화제 섭취가 부족한 경우가 많은데, 특히 산화적 스트레스에 노출되어 있는 만성적 인체질환자는 그 섭취량이 절대적으로 부족한 경우가 많다²⁴. 그러므로 산화적 스트레스와 관련된 만성질환자들은 식품뿐만 아니라 약용식물로부터 항산화 및 항염증 활성이 좋은 소재를 섭취해야 할 필요성이 있다^{24,26}. 이와 같이 사매는 총 폴리페놀의 함량이 매우 높고 총 플라보노이드 함량도 높기 때문에 산화적 스트레스에 노출된 만성 염증질환자들의 치료 도는 개선에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

사매의 수용성 및 에탄올 추출물 내에 존재하는 성분으로는 linoleic acid, β -sitosterol, triacontanol, lupeol, friendlin, β -amyrin, quercitrin 및 ellagic acid glycoside인 ducheside A 및 B가 보고되어 있다^{9,10}. 최근에 뱀딸기의 hexane과 ether 추출물이 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus niger*에 대한 항균 효과를 보이며, 수용성과 Aceton 분획은 *S. aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*에 대한 현저한 항균성을 보인다는 보고와 수용성 분획이 *Sarcoma 180* 세포에 대해 항암 효과를 가진다는 보고가 있다^{10,11}.

인체에 나타나는 거의 모든 질환은 염증을 동반하므로 이를 개선 또는 치료하는 데는 항염증 효과를 나타내는 약물을 일반적으로 사용하고 있다. 그러므로 본 연구는 사매 에탄올 추출물이 염증매개물로 잘 알려진 NO와 PGE₂의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 사매 에탄올 추출물은 LPS로 유도된 설치류 대식세포 유래 RAW 264.7 세포주에서 NO와 PGE₂ 생성에 있어서 우수한 억제 효과를 나타내었다. 이러한 NO와 PGE₂의 생성억제는 각각 iNOS (Fig. 5)와 COX-2 (Fig. 6)의 발현을 억제함으로써 우수한 억제효과가 이루어짐을 확인할 수 있었다. 그러므로 사매 에탄올 추출물에 대한 NO와 PGE₂와 같은 염증매개물에 대한 억제 효과 및 기전은 본 연구에 의해서 처음 규명된 것이다. NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포를 LPS로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하면서 활성화 된다²⁷. 또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 소량의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 활성화된 대식세포로부터 과량의 prostanoid생성은 면역반응에 관여하여

다양한 염증성 질환의 원인이 된다²⁷.

한편 사매 에탄올 추출물은 난백알부민(ovalbumin)으로 유도된 폐염증질환 모델에서 type 2 helper cells (Th2)에서 생성되는 Th2 사이토카인과 면역글로블린 E (IgE)을 억제하는 효과가 있었고¹⁶, 더불어 인간의 호산구 유래 세포주인 EoL-1 세포에서 인터루킨(interleukin)-6 (IL-6)와 IL-8 및 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 등 사이토카인과 케모카인을 억제하는 효과가 있을 뿐만 아니라 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)로 유도된 염증 모델 마우스에서 IgE의 생성과 관련된 IL-5와 IL-13의 생성을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려졌다¹⁷. 인체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필연적으로 염증성 사이토카인이 동반되는데, 대표적인 사이토카인으로는 IL-1 β 와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)이다. 일반적으로 IL-1 β 는 생체에서 매우 낮은 농도로 작용하는데, 낮은 농도에서는 세포 성장이나 체내 항상성 유지에 필요하지만, 염증반응이나 상처 또는 면역학적 자극을 주었을 때는 대량으로 생산되어 인체 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다²⁸. 또한 TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에서 대량 생산되지만, 림포이드계의 세포(lymphoid cells), 비만세포(mast cells), 내피세포(endothelial cells)을 비롯하여 생체에 존재하는 다양한 세포에서도 생산된다²⁹. 특히 LPS 또는 IL-1으로 자극할 경우 대량 생산된다. 따라서 본 연구에서 처음에 밝힌 사매 에탄올 추출물을 대상으로 NO와 PGE₂염 생성 억제에 대한 기전 이외에도 향후 IL-1 β 와 TNF- α 등 염증성 사이토카인의 생성억제 및 그 기전을 규명할 필요성이 있다.

이상의 결과를 종합해볼 때 사매 에탄올 추출물은 항산화 활성의 지표로 알려진 총 폴리페놀은 총 플라보노이드 함량보다 매우 높았으며, DPPH, NO 유사 및 ABTS 라디칼 소거 활성이 우수하였으며, 특히 NO 유사 라디칼 소거 활성이 매우 우수하였다. 더불어 LPS에 의해 유도되는 RAW 264.7 대식세포에서 생산되는 과량의 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개물을 효과적으로 억제한 것은 각각 iNOS와 COX-2 분자발현을 효과적으로 억제하였기 때문인 것을 알 수 있었다. 그러므로 사매 에탄올 추출물은 항산화 및 항염증 활성이 우수하여 인체질환을 개선 또는 치료하는데 활용할 수 있는 좋은 소재라 사료된다.

결 론

산화적 스트레스는 아토피 피부염을 비롯한 피부 염증성 질환 및 각종 인체 질환을 악화시키는 원인으로 알려졌다. 그러므로 본 연구는 사매 에탄올 추출물을 대상으로 항산화 활성 및 항염증에 대한 효능을 조사하였다. 사매 에탄올 추출물은 항산화 활성의 지표로 알려진 총 폴리페놀은 총 플라보노이드 함량보다 매우 높았으며, DPPH, NO 유사 및 ABTS 라디칼 소거 활성이 우수하였다. 특히 NO 유사 라디칼 소거 활성이 매우 우수하였다. 더불어 LPS에 의해 유도되는 RAW 264.7 대식세포에서 생산되는 과량의 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개물을 효과적으로 억제한 것은 각각 iNOS와 COX-2 분자발현을 효과적으로 억제하

였기 때문이었다. 따라서 사매 에탄올 추출물은 항산화 및 항염증 활성이 우수하여 인체질환을 개선 또는 치료하는데 활용할 수 있는 좋은 소재라 사료된다.

참고문헌

- Geronikaki, A.A., Gavalas, A.M. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb Chem High Throughput Screen.* 9: 425-442, 2006.
- Kondo, T., Hirose, M., Kageyama, K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 6: 532-538, 2009.
- Kastle, M., Grune, T. Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system. *Curr Pharm Des.* 17: 4007-4022, 2011.
- Cho, H.R., Uhm, Y.K., Kim, H.J., Ban, J.Y., Chung, J.H., Yim, S.V., Choi, B.K., Lee, M.H. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism is associated with atopic dermatitis susceptibility in a Korean population. *Int J Immunogenet.* 38: 145-150, 2011.
- Wakamatsu, T.H., Dogru, M., Ayako, I., Takano, Y., Matsumoto, Y., Ibrahim, O.M., Okada, N., Satake, Y., Fukagawa, K., Shimazaki, J., Tsubota, K., Fujishima, H. Evaluation of lipid oxidative stress status and inflammation in atopic ocular surface disease. *Mol Vis.* 16: 2465-2475, 2010.
- Kader, K.N., Coyle, C.H. Reactive oxygen and nitrogen species: implications for cardiovascular device engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 83: 138-144, 2007.
- Kumar, S., Kuma, D., Manjusha., Saroha, K., Singh, N., Vashishta, B. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharm.* 58: 215-220, 2008.
- Ross, J.A., Kasum, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann Rev Nutr.* 22: 19-34, 2002.
- Lee, I.R., Lee, E.B., Lee, S.H., Lee, J.Y. Biologically active components of *Duchesnea indica* herba. *Kor J Pharmacogn.* 15: 85-90, 1984.
- Lee, I.R., Kim, Y.H., Jeong, G.J. Studies on the Pharmacological Actions and Biological Active Components of Korean Traditional Medicine -The Components of Antitumor and Antimicrobial Activity from *Duchesnea indica*. *J Pharm Soci.* 31: 230-235, 1987.
- Lee, I.R., Lee, Y.S., Han, Y.N. Studies , on the pharmacological actions and biological active components of Korean traditional medicine (V)-Isolation of an antimicrobial phenolic compound from *Duchesnea indica*. *Yakhak Hoeji.* 32: 308-312, 1988.
- Kim, Y.K., Ryu, B.H., Kim, J.S., Yoon, S.H., Ryu, Y.K. Effects of *Duchesnea indica* on several kinds of cancer cells. *Korean J Orient int Med.* 26: 320-332, 2005.
- Kim, K.C., Kim, J.S., Son, J.K., Kim, I.G. Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells by the *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha* extracts. *Cancer Lett.* 246: 210-217, 2007.
- Lee, I.R., Yang, M.Y. Phenolic compounds from *Duchesnea chrysantha* and their cytotoxic activities in human cancer cell. *Arch Pharm Res.* 17: 476-479, 1994.
- Lee, J.S., Kim, I.S., Ryu, J.S., Kim, J.H., Kim, J.S., Kim, D.H., Yun, C.Y. The inhibitory Effect of *Duchesnea chrysantha* extract on the development of atopic dermatitis-like Lesions by regulating IgE and cytokine production in Nc/Nga mice. *Phytother Res.* 26: 284-290, 2012.
- Yang, E.J., Lee, J.S., Yun, C.Y., Kim, J.H., Kim, J.S., Kim, D.H., Kim, I.S. Inhibitory effects of *Duchesnea chrysantha* extract on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of asthma. *J Ethnopharmacol.* 118: 102-107, 2008
- Peterson, D.M., Emmons, C.L., Hibbs, A.H. Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *J Cereal Sci.* 33: 97-103, 2001.
- Moreno, D.A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., García-Viguera, C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal.* 41: 1508-1522, 2006.
- Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200, 1958.
- Gray, J.I., Dugan, J.R.L. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci.* 40: 981-985, 1975.
- Re, R., 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.
- Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Bengmark, S., Mesa, M.D., Gil, A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp.* 24: 273-281, 2009.
- Panickar, K.S., Anderson, R.A. Effect of polyphenols on oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neuronal

- death and brain edema in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci.* 12: 8181-8207, 2011.
26. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79: 727-747, 2004.
27. Ahmad, N., Chen, L.C., Gordon, M.A., Laskin, J.D., Laskin, D.L. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *J Leukocyte Biol.* 71: 1005-1011, 2002.
28. Dinarello, C.A. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw.* 5: 517-531, 1994.
29. Walsh, L.J., Trinchieri, G., Waldorf, H.A., Whitaker, D., Murphy, G.F. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88: 4220-4224, 1991.