

쪽의 항산화 및 항염증 활성에 대한 연구

김수정^{1#}, 장태원¹, 김도완², 박재호^{1*}

1 : 중원대학교 생약자원개발학과, 2 : 중원대학교 식품공학과

Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Persicaria tinctoria*

Soo-Jeung Kim^{1#}, Tae Won Jang¹, Do-Wan Kim², Jae Ho Park^{1*}

1 : Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

2 : Department of Food Science and Technology, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

ABSTRACT

Objectives : *Persicaria tinctoria* belongs to the Polygonaceae family and it has been used as the natural dye traditionally. Also, it is well known that the *Persicaria tinctoria* is used for treating the following symptoms such as fever, inflammation and edema. The purpose of this study is to investigate the effective source of antioxidants and anti-inflammatory agent from various parts of *Persicaria tinctoria*.

Methods : We investigated the antioxidative and anti-inflammatory properties of the *Persicaria tinctoria* extracts. Antioxidant activities were measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activity, Fe²⁺ chelating activity and Reducing power of *Persicaria tinctoria* extracts. And its inhibitory effect against oxidative DNA damage was evaluated in non-cellular system using ϕ X-174 RF I plasmin DNA. The anti-inflammatory effect of *Persicaria tinctoria* was measured by using the inhibitory efficacy for the amount of nitric-oxide (NO) produced in LPS induced RAW264.7 cells.

Results : The extracts from stem part showed better DPPH scavenging activity compared to those of the leaf and root extracts. Their IC₅₀s were measured as 7.17, 144.40 and 165.07 ug/ml, respectively. These results were similar to that of ABTS radical scavenging assay and reducing power. Also, *Persicaria tinctoria* showed the protective effects of DNA damage against oxidative stress and anti-inflammatory effect by suppression of NO production in LPS induced RAW264.7 cells.

Conclusions : These results showed that various parts of *Persicaria tinctoria* can be used as an effective source of antioxidants and anti-inflammatory agents via antioxidative activities and anti-inflammatory effect.

Key words : *Persicaria tinctoria*, DPPH, Fe²⁺ chelating, anti-inflammation

서론

현대 사회의 경제와 사회 성장이 급격하게 이루어지는 동시에 인류의 건강에 대한 우려가 동시에 증가하고 있다. 이와 동시에 우수한 천연물질을 개발하는 연구와 천연생리활성물질의 기능성에 대해 연구가 활발하게 진행되고 있다¹⁾. 특히 환경오염, 장기 지속적인 흡연과 음주, 환경 호르몬 등은 인체

내의 산화적 스트레스를 일으키는 것으로 밝혀지고 있으며, 이러한 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA까지도 비가역적인 변형과 파괴를 유래한다고 알려져 있다²⁾. 체내에서 생성되는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)은 대부분의 전자 운반과정 중 불안전하게 환원되거나 cytokine 등 다양한 작용의 자극에 의해 생성된다. 정상적인 경우에는 체내에 존재하는

*Corresponding author : Jae Ho Park, Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea
· Tel : +82-43-830-8614 · Fax : +82-43-860-8679 · E-mail : parkjh@jwu.ac.kr

#First author : Soo-Jeung Kim, Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea
· Tel : +82-43-830-8614 · E-mail : jtw2111@hanmail.net

· Received : 13 October 2015 · Revised : 6 November 2015 · Accepted : 6 November 2015

항산화 시스템에 의해 활성 산소종이 제거되지만 이 시스템의 작동이 원활하지 못하면 세포는 산화적 손상을 입게 된다. 활성산소는 세균을 죽이는 살균의 생체 방어 작용을 하기도 하지만 일반적으로 생체 내에서 산화를 일으켜 질병을 초래하는 작용을 하며³⁾, 활성산소종에 의한 산화는 곧 노화에 직접적인 영향을 미치고 노화는 성인병 질환에 관여하게 되며 그 결과 여러 질병에 원인이 된다는 보고도 있다⁴⁾. 따라서 이러한 활성 산소종에 의한 산화작용으로부터 생체를 보호할 수 있는 항산화제에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다⁵⁾.

염증반응이란 체내에 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균감염에 대해 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증 매개 물질을 분비함으로써 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다⁶⁾. 현대 사회의 급격한 산업 발달로 인해 생활환경 및 식생활의 변화 그리고 이에 따른 스트레스가 증가하고 있다. 이로 인해 여드름, 아토피, 과민성 피부, 천식등의 만성 염증 질환이 증가하면서 다양한 요인으로 인한 면역 조절 이상으로 유발된 염증이 지속되고 있다. 그러나 지속적으로 또는 과도하게 발생된 만성염증반응은 조직의 손상을 유발하며 이와 관련한 활성 산소종과 염증성 cytokine은 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다⁷⁾. 한편, NO, HNO₂, ONOO⁻와 같은 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 염증반응 시 대식세포, 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역 반응으로 다량 생성되며, 이때 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)도 같이 생성된다⁸⁾. 이러한 ROS와 RNS는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절 하는 염증반응과 깊이 관련되어 있다⁹⁾.

일반적으로 천연물에 존재하는 생리활성 물질은 대부분 페놀성 화합물로 항산화 및 항균효과를 가지고 있다. 페놀 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중 하나로서 탄소 수에 따라 페놀산, 탄닌, 플라보노이드 등의 다양한 물질로 나눌 수 있다. 특히, 천연물에 존재하는 폴리페놀계 화합물들은 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대분자들과 결합하는 성질을 가지고 있기 때문에 항산화, 항심혈관질환, 항암, 항 골다공증 및 항당뇨와 같은 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{10,11)}. 자연계의 다양한 식물유래 천연색소물질들도 항산화적 방어기구인 항산화 효소가 존재하며 이들은 항산화 활성 뿐 아니라 생체 건강에 연관된 많은 생리활성들을 나타낸다^{12,13)}.

쪽(Indigo, 학명: *Persicaria tinctoria*)은 마디풀과 여뀌속 식물로 본초에서는靑黛로 청열약(淸熱藥)에 속한다. 성미(性味)는 차고 짜며 간경(肝經)에 작용한다. 효능으로는 청열해독(淸熱解毒)하여 간의 열을 식혀주고 습진이나 구창을 치료하고, 양혈산종(涼血散腫)하여 피의 열을 식혀주며 감모(感冒)·황달·이질·토혈 등의 증상과 각종 염증에 약재로 이용되고 있다¹⁴⁾.

쪽잎에 들어있는 푸른색 색소는 인디고틴(indigotin) 혹은 인디고(indigo)라고 불리는데 인디고틴(indigotin)은 그 자체로서 잎에 존재하는 것이 아니라 글루코스가 결합된 배당체 형태의 전구체(precursor)로 존재한다. 인디칸(indican)이라고 불리는 이 물질은 천연의 쪽잎에 존재하고 무색이며 수용성으로 쪽잎을 물속에서 쪼으면 잎 속의 효소에 의해 발효되어 인독실(indoxyl)과 포도당(glucose)으로 가수분해 된다.

인독실은 노란빛을 띠며 공기 중의 산소에 의해 산화되어 불용성 청색 색소인 인디고틴(indigotin)으로 변한다¹⁵⁾.

식물성 천연색소는 안토시아닌계 색소인 적자색과 흑색계열, 카로티노이드계 색소인 황색계열 그리고 클로로필계 색소인 녹색계열로 크게 나눌 수 있으며, 이들 천연색소는 유해 활성산소를 제거하는 항산화 효과¹⁶⁾가 탁월하고 혈압강하효과 및 항염증 효과¹⁷⁾등의 다양한 생리활성을 지니고 있다. 현재, 쪽 전초에 대한 항산화 활성¹⁶⁾ 및 쪽 뿌리의 항염증 활성¹⁸⁾ 등의 연구는 진행되어있지만 각 부위별 비교 분석은 미비하다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 전통적인 염료 및 한약재로 사용되어지고 있는 쪽의 부위별 항산화 활성 및 항염증 활성을 비교 분석함으로써 향후 고부가가치의 기능성 식품 소재 및 향장소재로서의 개발 가능성을 입증하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 쪽(*Persicaria tinctoria*)은 2011년 8월 경북 안동시 성곡동에서 재배한 것을 채취하여 사용하였다. 쪽의 전초를 채취하여 세절 한 다음, 잎, 줄기, 뿌리로 분리하였다. 각 부위는 동결건조하여 분쇄한 뒤 추출 시료로 사용하였다.

2. 방법

각 부위별 시료 500 g을 80% methanol 1,000 mL을 가하여 후 3일간 침지하였다. 여과 농축한 추출물을 200 mL로 농축한 다음 50 mL 증류수를 첨가하고, 이를 petroleum ether로 분획하여 분리하고 이를 다시 ethyl acetate로 분획한 다음, 유기 용매 층을 sodium sulfate anhydrous로 탈수시킨 다음 농축·건조 하였다. 각 부위별 에틸아세테이트 분획물은 잎 0.83%, 줄기 0.24%, 뿌리 0.17%를 각각 얻었다. 이 분획물을 항산화 및 항염증 활성을 측정하기 위한 시료로 사용하였다.

1) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet 방법¹⁹⁾을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300 μM 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)를 515 nm에서 흡광도 값이 1.00이 되도록 Ethanol을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물 40 μl에 DPPH solution 760 μl를 첨가한 후 20분 간 37°C에서 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

2) ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg 등의 방법

²⁰⁾을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7 mM 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid(2,2'azino-bis)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간동안 ABTS+·을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70이 되게 희석하였다. 각 농도별 추출물 40 μ l에 ABTS solution을 760 μ l씩 각각 첨가한 후 20분간 37°C에서 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조군과 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

3) Fe²⁺ 킬레이팅 활성

Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 Hus 방법²¹⁾을 참고하여 실험하였다. 솔방울의 농도별 추출물 40 μ l에 1mM FeCl₂ 40 μ l와 증류수 700 μ l를 혼합하여 약 30초간 실온에서 반응하였다.

이 혼합물에 5mM ferrozine 40 μ l을 첨가하여 Fe²⁺-ferrozine complex를 유도하고 10분 뒤 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fe²⁺ 킬레이팅의 활성(%)은 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 킬레이팅 활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

4) 환원력

환원력은 Oyaizu의 방법²²⁾을 참고하여 측정하였다. 각 농도별 추출액 100 μ l에 0.2 M Potassium Phosphate buffer (pH 6.6) 250 μ l과 1% Potassium Hexacyanoferrate(III) 250 μ l을 혼합한 후, 50°C에서 20분간 반응시킨 후 찬물로 냉각한 후, trichloroacetic acid(TCA) 250 μ l를 첨가하였다. 위 반응액을 2000 g에서 5분간 원심 분리하여 상등액 400 μ l에 증류수 400 μ l와 0.10% ferric chloride 16 μ l를 첨가하여 혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값이 높을수록 환원력이 강한 것으로 평가된다.

5) 항염증 효과

실험에 사용된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였으며, 10 % fetal bovine serum (FBS)과 1 % antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하여 5 % CO₂, 37 °C incubator에서 배양하였다.

RAW 264.7 세포를 48 well plate에 2 × 10⁵ cells/well 이 되도록 분주한 후 12 h 배양하고, 각출물 150 μ g/mL의 농도가 되도록 500 μ l/well를 동시 처리 또는 LPS 단독 처리하여 20 h 배양한 후, 세포 배양액을 얻어 배양액 중에 함유된 NO의 양을 Griess Reagent System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다.

6) 총 페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법²³⁾을 참고하여 측정하였다. 건조시료 1 g에 1% Acetic acid/diethyl ether 100 ml를 혼합하여 5분간 추출 후 상등액을 제거하였다. 잔여물과 70% Acetone을 혼합하여 50 ml를 만든 후 2시간 동안 교반 추출하였다. 상등액을 filter paper로 걸러낸 후, 70% Acetone으로 50ml 정용하였다. 추출물 50 μ l와 증류수 950 μ l, Folin 500 μ l를 혼합한 후, 20% Sodium carbonate 2.5 ml 넣고 40분간 실온에서 반응시켰다. 반응물을 흔들지 않고 맑은 액체를 UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 Tannic acid으로 정량 직선방정식을 사용하였다.

7) 비타민C 함량 분석

비타민C 함량은 Jagot and Dani²⁴⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 건조시료 0.50 g에 증류수 10 ml 넣은 후, 4500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 추출하였다. 추출물을 filter paper(No.2)로 걸러낸 후, 200 μ l와 trichloroacetic acid(TCA) 800 μ l를 넣고 3000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상등액 500 μ l와 증류수 1.50 ml, Folin 200 μ l를 넣고 혼합한 후 10분간 상온에서 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 Ascorbic acid로 정량 직선방정식을 사용하였다.

8) 총 플라보노이드 화합물 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 100 μ l를 80% EtOH 990 μ l에 희석한 후 100 μ l를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 μ M potassium acetate를 함유하는 80% EtOH 4.3 ml에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 이용하여 검량선을 작성한 다음 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

9) ϕ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성

ϕ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성은 Jung 방법²⁵⁾을 참고하여 측정하였다.

- Ferric Chloride(FeCl₂)을 통한 산화적 스트레스

각 농도별 추출액 40 μ l와 1mM FeCl₂ 60 μ l와 증류수 700 μ l를 넣은 후, 37°C에서 15분 반응하였다. 반응액 20 μ l와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 μ l를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X Loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

- Ferrous sulfate(FeSO₄)을 통한 산화적 스트레스

각 농도별 추출액 40 μ l와 1.5mM FeSO₄와 1.5mM hydrogen peroxide(H₂O₂)를 1:1로 혼합한 용액 760 μ l를 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응하였다. 반응액 20 μ l와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 μ l를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X Loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

10) 통계학적 분석

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan 다중검정법 (duncan's multiple range test)를 이용하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 항산화 활성

1) DPPH radical 소거활성

쪽 부위별 추출물의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과(Table 1), 각 부위별 추출물의 농도 의존적으로 소거활성이 높았다. 모든 처리 농도에서 뿌리와 잎에 비해 줄기의 활성이 높은 것으로 나타났다. 특히 처리농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 줄기(94.03%)는 대조구인 L-ascorbic acid (95.28%)와 유사한 활성을 나타내었다. 잎과 뿌리의 처리 농도에 따른 활성은 매우 유사하게 나타났다. 각 처리 농도별 DPPH radical 소거활성을 근거로 각 부위별 추출물의 IC_{50} (Inhibitor concentration 50%)값을 구한 결과(Table 1), 줄기는 7.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 L-ascorbic acid(5.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 비교하여 매우 높은 활성을 나타내었다. 그러나 잎과 뿌리는 각각 144.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 165.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 다소 낮은 DPPH radical 소거활성을 나타내었다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity (%) and IC_{50} Value of *Persicaria tinctoria*.

Sample	Extracts ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					$\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$
	200	40	8	1,6	0,32	
Leaf	65,06±0,2	31,17±0,1	9,84±0,1	2,25±0,0	1,61±0,0 [*]	144,40
Stem	94,03±0,1	89,95±0,0	47,75±0,1	16,55±0,1	9,75±0,0	7,19
Root	62,61±0,1	31,45±0,1	9,68±0,1	1,99±0,0	1,33±0,0	165,07
L-Ascorbic acid	95,28±0,1	92,74±0,1	63,45±0,1	24,28±0,1	3,54±0,0	5,50

Each value is expressed as mean \pm SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

2) ABTS radical 소거활성

쪽 부위별 추출물의 ABTS radical 소거활성을 측정한 결과(Table 2), 각 부위별 추출물의 농도 의존적으로 소거활성이 높았다. 특히 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 고농도에서는 모든 추출물의 처리농도가 90% 이상의 높은 활성을 나타내었다. 처리 농도 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 줄기 추출물의 소거 활성이 94,85%로 가장 높았고, 뿌리(86,67%), 잎(68,77%)순으로 소거 활성이 높았다. 각 추출물의 IC_{50} 값을 계산한 결과, 줄기 추출물이 3,43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 대조구인 L-ascorbic acid (3,43 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 비해 다소 높은 활성을 나타내었다. 뿌리와 잎의 IC_{50} 값은 각각 3,81 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5,61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 쪽 부위별 추출물은 전반적으로 높은 ABTS radical 소거활성을 나타내었다.

Table 2. ABTS radical scavenging activity (%) and IC_{50} Value of *Persicaria tinctoria*.

Sample	Extracts ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					$\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$
	200	40	8	1,6	0,32	
Leaf	93,84±0,1	91,89±0,1	68,77±0,2	19,31±0,2	4,11±0,0 [*]	5,61
Stem	95,43±0,1	95,12±0,1	94,83±0,2	27,86±0,1	3,13±0,0	3,43
Root	94,92±0,1	92,36±0,0	86,67±0,3	25,41±0,0	6,92±0,0	3,81
L-Ascorbic acid	99,35±0,0	91,24±0,0	76,87±0,1	29,89±0,0	12,33±0,0	3,54

Each value is expressed as mean \pm SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

3) Fe^{2+} 킬레이팅 활성

쪽 부위별 Fe^{2+} 킬레이팅 활성을 측정한 결과(Table 3), 각 부위별 추출물의 농도 의존적으로 소거활성이 높았다. 그러나 대조구인 L-ascorbic acid는 동일한 농도에서 DPPH와 ABTS radical 소거활성에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었다. 줄기와 뿌리의 활성은 각 처리 농도별로 잎에 비해 높은 활성을 나타내었다. 처리 농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 각 추출물의 Fe^{2+} 킬레이팅 활성은 줄기가 96,27%로 가장 높았고, 뿌리가 91,14%, 잎이 64,43% 순으로 높았다. 각 추출물의 Fe^{2+} 킬레이팅 활성에 대한 IC_{50} 값은 줄기와 뿌리가 각각 7,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 7,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 매우 높은 활성을 나타내었다. 그러나 잎은 160,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 줄기와 뿌리에 비해 매우 낮은 킬레이팅 활성을 나타내었다.

Table 3. Fe^{2+} Chelating activity (%) and IC_{50} Value of *Persicaria tinctoria*.

Sample	Extracts ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					$\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$
	200	40	8	1,6	0,32	
Leaf	64,43±0,1	29,67±0,1	9,34±0,0	2,51±0,0	1,54±0,0 [*]	160,50
Stem	96,27±0,0	88,93±0,0	45,95±0,0	19,42±0,1	8,82±0,0	7,06
Root	91,14±0,0	84,39±0,1	47,12±0,0	23,56±0,0	11,06±0,0	7,20
L-Ascorbic acid	48,52±0,3	22,41±0,2	13,23±0,1	7,87±0,3	2,39±0,0	1125,46

Each value is expressed as mean \pm SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

4) 환원력

쪽 부위별 추출물의 환원력을 측정한 결과(Fig. 1), 각 부위별 추출물은 대조구인 L-ascorbic acid와 비교하여 매우 높은 환원력을 나타내었다. 특히 뿌리는 L-ascorbic acid에 비해 높은 환원력을 나타내고 있으나, 쪽의 부위별 추출물 모두 대조구인 L-ascorbic acid와 유의성을 나타내지 않았다.

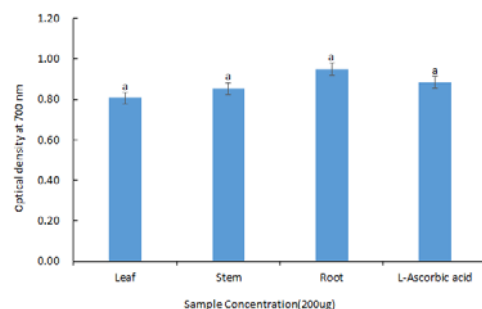


Fig. 1. Reducing Power of *Persicaria tinctoria*.

2. 항염증 효과

LPS처리에 의해 염증 유발을 유도한 RAW 264.7 세포에 쪽 부위별 추출물의 농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 항염증 효과를 확인한 결과(Fig. 2), 모든 추출물의 Positive 대조구에 비해 NO의 생성이 현저하게 줄어들었다. 쪽 부위별 추출물의 항염증 효과는 줄기 > 잎 > 뿌리 순으로 높았다.

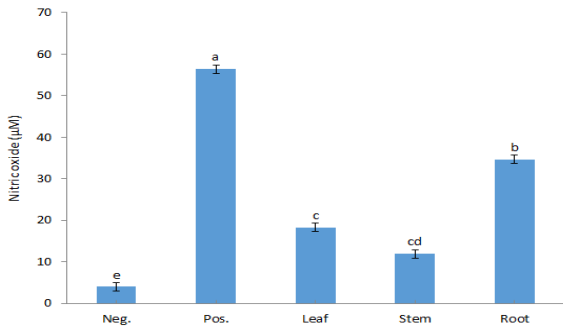


Fig. 2. Scavenging activities of Nitric oxide by *Persicaria tinctoria*.

3. 유효성분 분석

1) 총페놀성 화합물 함량

쪽 부위별 총페놀성 화합물을 분석한 결과(Fig. 3), 줄기에 34.44 mg/g으로 가장 높았고, 뿌리 32.02 mg/g, 잎 20.96 mg/g 순으로 높았다. 페놀화합물의 다양한 항산화력은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제, 활성산소의 소거제, 사슬전단 항산화제(chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과에서도 쪽 부위별 총 페놀성 화합물의 함량은 앞서 서술된 항산화 활성과 유사한 패턴을 나타내고 있어 쪽의 높은 항산화 활성은 내재된 페놀성 화합물에 의한 것으로 사료된다.

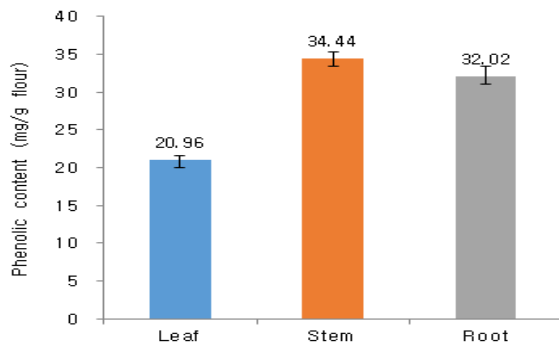


Fig. 3. Total phenolic compound content of *Persicaria tinctoria*.

2) 총 플라보노이드 함량

쪽 부위별 총 플라보노이드 함량 분석한 결과(Fig. 4), 잎에서 195.47 mg/g으로 가장 높았고, 줄기 165.37 mg/g, 뿌리에서 27.23 mg/g 순으로 높았다.

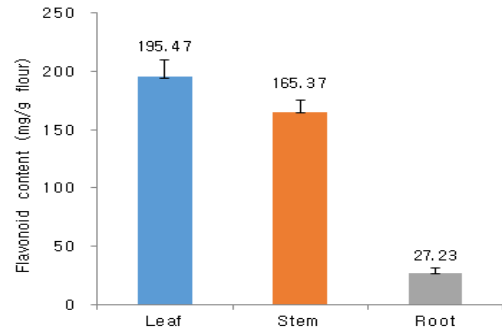


Fig. 4. Vitamin C content of *Persicaria tinctoria*.

5. ϕX -174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성

쪽 부위별 추출물은 FeCl_2 (ferric chloride)의 산화적 스트레스와 FeSO_4 (ferrous sulfate)와 H_2O_2 의 fenton 반응을 이용한 산화적 스트레스를 이용하여 DNA 손상 억제 활성을 평가하였으며, ϕX -174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 이용한 비 세포적 시스템으로 평가하였다.

쪽 부위별 추출물은 대조구와 비교해서 모든 부위 및 추출 방법에서 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 효과적으로 억제하는 활성을 보였다(Fig. 6, 7).

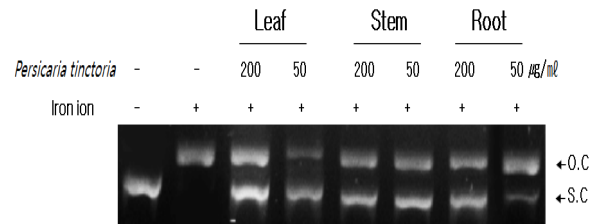


Fig. 6. Inhibition effect of *Persicaria tinctoria* against oxidative DNA damage by Fe^{2+} ion. Iron ion generated from FeCl_2 , O.C : Open-Circular, S.C : Super-Coiled.

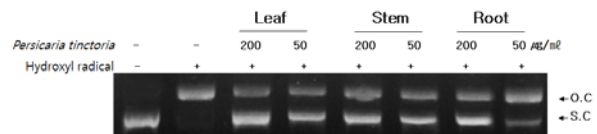


Fig. 7. Inhibition effect of *Persicaria tinctoria* against oxidative DNA damage by hydroxyl radical. Hydroxyl radical was generated from fenton reaction between H_2O_2 and FeSO_4 . O.C : Open-Circular, S.C : Super-Coiled.

고찰

쪽은 천연색소로 의류의 염색에 많이 사용될 뿐만 아니라 한약재로도 사용이 되고 있는데, 효능으로는 청열해독(淸熱解毒)하여 습진과 각종 염증에 약재로 이용되고 있다¹⁴⁾. 이러한 쪽의 효능은 염증 질환과 직접적인 연관성과 함께 체내 유해한 물질들에 대한 긍정적인 작용을 할 것이라고 예측할 수 있다.

최근 사회, 경제 및 생활수준이 향상됨에 따라 천연 유래

물질 및 제품에 대한 선호도가 높아지고 천연물 유래의 활성 물질 탐색에 관련된 연구가 집중되고 있으며, 식물체를 대상으로 식용 및 약용자원으로의 활용가능성과 생리활성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다²⁶⁻²⁸.

본 연구에서 쪽의 에틸아세테이트 분획물의 부위별 항산화 효과, 산화적 DNA 손상억제 활성 그리고 항염증 효과를 연구하였다. 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH, ABTS radical 소거활성, Fe²⁺ 킬레이팅 활성 및 환원력을 평가하였다.

DPPH radical 소거 활성은 수소 공여체를 측정 할 수 있는 방법으로 페놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스 코르빈산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색 되는 원리를 이용한 방법으로 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되며 비교적 간단하고 짧은 시간 내에 항산화 활성을 측정할 수 있어 널리 사용되고 있다²⁹. 줄기는 잎과 뿌리에 비해 높은 소거활성을 나타냈으며 대조군인 L-ascorbic acid와 비슷한 소거활성을 보였다. 특히 200 μ g/mL 농도에서 94.03%로 뛰어난 활성을 보였다.

ABTS 라디칼 소거능은 라디칼을 생성하는 ABTS 존재 시 hydrogen peroxide와 metmyoglobin의 활성을 토대로 보다 빠른 항산화 반응을 일으켜 myoglobin radical을 감소시키는 기전이라고 할 수 있다. 모든 부위의 활성이 L-ascorbic acid와 비슷한 활성을 나타냈으며, 특히 줄기는 다른 시료들에 비해 더 높은 효과를 보였으며, 8 μ g/mL 농도에서 94.83%의 효과를 보여 낮은 농도에서도 높은 효과를 보였다.

Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 생체 내의 철(iron, Fe)이온의 과잉으로 야기될 수 있는 hydrogen peroxide와의 fenton reaction에 의한 단백질 발현에 대한 직접적인 손상과 DNA 산화적 스트레스, 세포의 노화와 손상을 야기하는 강력한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 중 hydroxyl radical의 억제를 위한 Fe²⁺ 킬레이팅 반응을 이용한 것이다^{30,31}. 줄기와 뿌리의 활성이 높았으며, 줄기의 킬레이팅 능력이 아주 우수했다.

환원력은 일반적으로 전자나 수소, 산소 등의 전자의 이동이나 공여가 가능한 물질들이 산화를 통해 활성산소를 발생하는 것에 대한 억제능력을 뜻한다. 환원력을 평가한 결과 잎, 줄기, 뿌리 모두 대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 활성을 나타냈다.

페놀류 화합물은 킬레이팅을 통해 금속이온들을 비활성화시키고 추가적으로 superoxide-driven fenton reaction과 같은 활성산소종의 기원으로 중요하게 인식되고 있는 반응들을 억제한다^{32,33}. 페놀화합물의 다양한 항산화력은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이팅제, 환원제, 활성산소의 소거제, 사슬전단 항산화제(chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다. 쪽의 부위별 페놀류 화합물 함량을 비교 분석한 결과 줄기가 가장 높은 함량을 함유하고 있었으며 뿌리, 잎 순으로 함량이 높았다. 총 페놀성 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가진 2차 대사산물로서 항산화 활성과 항암 및 항균 작용을 하는 생리활성물질로 알려져 있으며³⁴, 보고 된 대부분의 천연 항산화제 등의 생리활성 물질은 식물 유래로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있다³⁵.

또한 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로, 플라보노이드의 C6-C3-C6를 기본골격으로 하며 노란색 내지는 담

황색을 나타내는 페놀계 화합물의 총칭으로 자연계에 널리 분포하고 있으며 폴리페놀과 같이 채소류와 식물의 잎, 꽃, 과실, 줄기 및 뿌리 등 거의 모든 부위에 함유되어 있을 뿐 아니라 곡물, 과실류 등에도 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다³⁶. 플라보노이드는 앞서 서술된 총 페놀 화합물의 일종이지만 각 부위별 총페놀성 화합물의 함량 패턴과는 상이한 패턴을 나타내고 있다. 특히 쪽은 지하부에 비해 지상부의 플라보노이드 함량이 월등히 높은 것으로 나타났다. 플라보노이드는 활성산소종을 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있으며 폴리페놀과 마찬가지로 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다³⁷⁻⁴⁰.

이러한 항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로, 유리기 소거작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다.

종합적으로 항산화 효과는 대조군인 L-ascorbic acid와 비교하여 비슷한 활성을 보였으며 DPPH 및 ABTS 소거활성, Fe²⁺ 킬레이팅 그리고 환원력에서 줄기가 비교적 높은 효과를 보였다.

RAW264.7 세포에 내독소로 LPS를 사용하여 염증을 유발시켜 항염증 효과를 확인하였는데, LPS는 macrophage 및 monocyte와 같은 그람 음성균에서 IL-6, TNF- α , IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다⁴¹. 이를 통해 염증 유발의 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 NO의 억제효과를 확인 하였다. NO는 세포독성, 면역기능, 신경전달 및 혈관이완 등의 다양한 생물학적 과정에 영향을 미쳐 세포 기능 유지에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 생체 내에서 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 활성산소의 일종이다. 하지만 LPS에 의해 발현된 iNOS(inducible NOS)는 염증 반응에 관여하며, 이에 의한 세포독성으로 면역 체계 및 조직 파괴의 이상으로 나타나는 암 발생 및 여러 염증 질환 등에 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다^{42,43}.

쪽의 에틸아세테이트 분획물의 처리로 뿌리에서 가장 높은 NO 억제효과를 보였으며 뿌리 > 잎 > 줄기 순으로 나타났다. 이러한 결과는 염증을 유발하는 NO를 억제하여 잠재적인 염증 억제에 기여한다고 보인다.

산화를 일으키는 여러 원인 중 산화적 스트레스는 강한 반응성을 가진 라디칼을 형성하고 DNA를 비가역적으로 변형시키는데, 세포는 활성산소종을 방어하기 위한 여러 항산화 체계를 유지하고 있지만, 활성산소의 총량이 세포가 평형을 유지하는 항산화 보호 체계를 뛰어넘어 산화 및 환원 균형을 붕괴할 때 세포는 산화적 스트레스에 노출 수밖에 없다. 산화로 인한 변이는 단백질과 지질을 분해되고 재합성하는 것을 근거로 하였을 때 DNA의 손상에 의한 발암은 산화적 스트레스에 의해 매우 큰 영향을 받는다고 할 수 있다.

본 연구에서는 ϕ X-174 RF I plasmid DNA를 이용하여 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 그리고 이러한 손상에 대한 억제활성을 확인하였다. 정상적인 plasmid DNA는 supercoiled(SC) 형태로 존재하나 H₂O₂와 철의 fenton 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼 또는 철 이온 존재 하에서는 산화적 스트레스에 의한 손상을 받아 open-circular(OC)형태로 전

환된다. 모든 쪽의 모든 부위별 추출물에서 DNA 손상 억제 효과를 보였으며, 잎과 줄기의 억제 효과가 더욱 뛰어났다.

따라서 쪽의 에틸아세테이트 분획물은 폐놀성 화합물의 작용으로 활성산소종의 억제를 통해 항산화 활성 및 항염증 활성 그리고 DNA 손상 억제효과를 나타내는 것으로 보이며, 기존에 알려진 본초학에서 서술된 쪽의 효능인 습진이나 구창을 치료하고 염증 질병에 사용된다는 효능과도 연관성이 깊다고 볼 수 있다.

종합적으로 본 연구를 통해 쪽의 에틸아세테이트 분획물은 천연 유래 자원으로서의 기능성 식품 및 기능성 의류, 향장소재로서의 산업적 잠재성이 높으며 고부가가치를 가진다고 생각된다.

결론

쪽의 에틸아세테이트 분획물의 부위별 항산화 효과, 산화적 DNA 손상억제 활성 및 항염증 효과에 대한 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid와 유의성 없는 효과를 보였으며, RAW264.7 세포주에서의 NO의 억제 효과 및 높은 DPPH, ABTS 소거활성 및 Fe²⁺ 킬레이팅과 환원력을 보였다.
2. 각 부위별 항산화 효과는 줄기 > 잎 > 뿌리 순으로 농도 의존적인 높은 효과를 보였고 잎과 뿌리의 차이는 유의성 있지 않았다.
3. 각 부위별 항염증 효과는 줄기 > 잎 > 뿌리 순으로 농도 의존적인 효과를 보였으며 특히 줄기는 높은 NO 생성 저해 효과를 보였다.
4. 각 부위별 폐놀성 화합물은 줄기 > 잎 > 뿌리 순으로 높은 함량을 함유하고 있었으며 이 결과는 위의 항산화 및 항염증 효과와 유사한 패턴을 보인다.

결론적으로 쪽의 부위별 에틸아세테이트 분획물의 항산화 및 항염증효과는 폐놀성 화합물에 기초한 활성으로 우수한 활성으로 향후 기능성 식품이나 향장소재의 원료로서 활용가능성이 충분한 것으로 보인다.

References

1. Konyahoglu S, Saglam H, Kivcak B. α -tocophenol, flavonoid, and phenol contents and antioxidant activity of *Ficus carica* leaves. *Phar Biol*. 2005 ; 43 : 683-6.
2. Harold ES, Darrell EA, Evan IF, John AM. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nut Biochem*. 2007 ; 18 : 567-79.
3. Maxwell SJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995 ; 49 : 345-61.
4. Marnett L. Oxiradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000 ; 21 : 361-70.
5. Oh SJ. *Aging of Human Body*. Seoul : Tamkudang. 2005 : 204-5.
6. Willoughby DA. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis*. 1975 ; 34 : 471-8.
7. Chung EK, Seo EH, Park JH, Shim JH, Kim KH and Lee BR. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Kor J Org Agric*. 2011 ; 2 : 245-53.
8. Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand*. 1998 ; 117 : 463-46.
9. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Env Heal B*. 2008 ; 11 : 11-5.
10. Scalbert A1, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005 ; 45(4) : 287-306.
11. Yasuko S, Michael F, Stephen C, Hideo Y. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 2002 ; 177 : 67-80.
12. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phrnic acids. *Free Radical Biol Med*. 1996 ; 20 : 933-56.
13. Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin, Nutr*. 2000 ; 72 : 30-5.
14. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DR, Boo YM. *Herbological Study on herbal medicine*. Seoul : Youngrim. 2008 : 761-6.
15. Stoker KG, Cooke DT, Hill DJ. An improved method for the large scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo. *J Agric Eng Res*. 1998 ; 71 : 315-20.
16. Hwang CR, Tak HM, Kang MJ, Suh HJ, Kwon OO, Shin JH. Antioxidant and Antiobesity Activity of Natural Color Resources. *J Life Sci*. 2014 ; 24(6) : 633-41.
17. Son JH, Choung MG, Choi, HJ, Jang UB, Son GM, Byun MW, Choi C. Physiological Effect of Korean Black Soybean Pigment. *Kor J Food Sci Tech*. 2001 ; 33(6) : 764-8.
18. Park SJ, Lee JR, Jo MI, Park SM. Effects of *Isatidis Radix* and it's Active Component, Tryptanthrin

- on the Production of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-activated Raw264.7 Cells. *J Kor Ori Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2011 ; 24(1) : 64-77.
19. Bondet V, Brand Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm. Wiss. U-Technol*. 1997 ; 30 : 609-15.
 20. Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*. 1999 ; 66 : 511-7.
 21. Hus B, Coupar IM, Ng K. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem*. 2006 ; 98 : 317-28.
 22. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*. 1986 ; 44 : 307-15.
 23. AOAC. Official Methods of Analysis. 14th ed. Washington DC : Association of Official Analytical Chemists. 1995 : 8-35.
 24. Jagot SK, Dani HM. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Analytical Biochem*. 1982 ; 127 : 178-82.
 25. Jung Y, Surh Y. Oxidative DNA damage and cytotoxicity unduced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic Biol Med*. 2001 ; 30 : 1407-17.
 26. Mitscher LA, Park YH, Clark D, Beal JL. Antimicrobial agents from higher plants, antimicrobial isoflavonoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *typica*. *J Nat Prod*. 1980 ; 43 : 259-327.
 27. Jeong SJ, Lee JH, Song NH, Seong SN, Lee SE, Baeg NI. Natural products, organic chemistry: Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Kor Soc App Biol Chem*. 2004 ; 27 : 135-40.
 28. Kim SS, Kim JE, Hyun CG, Lee NH. *Neolitsea aciculata* essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory effects of human monocyte leukemia. *Natural Product Communications*. 2011 ; 6 : 1193-8.
 29. Que F, Mao L, Pan X. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*. 2006 ; 39(5) : 581-7.
 30. Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (*kakinoha-cha*). *Food Chem*. 2005 ; 89 : 569-75.
 31. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 1995 ; 18 : 321-36.
 32. Arora A, Nair G, Strasburg GM. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med*. 1998 ; 24 : 1355-63.
 33. Rice-evans CA, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 1997 ; 2(4) : 152-9.
 34. Ferreres F, Gomes P, Valentano R, Goncalves R, Pio EA, Chagas RM, Andrade PB. Improved loquat cultivars: variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem*. 2009 ; 114 : 1109-27.
 35. Huang MT, Ho ST, Lee CY. Phenolic compounds in food and their effects on health(II). Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society. Washington DC : USA. 1992 : 54-71.
 36. Hetog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. *J Agr Food Chem*. 1993 ; 41: 1242-6.
 37. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010 ; 2(12) : 1231-46.
 38. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002 ; 13 : 572-4.
 39. Williams R, Spencer J, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Rad Biol Med*. 2004 ; 36(7) : 838-49.
 40. Sohn HY, Ryu HY, Jang YJ, Jang HS, Park YM, Kim SY. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Kor J Microbiol Biotechnol*. 2008 ; 36 : 195-200.
 41. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee EK, Jahng YD, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. 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 macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2004 ; 27(5) : 617-20.
 42. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr*. 2007 ; 137 : 1616-20.
 43. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. 1996 ; 316 : 209-15.