

참마와 명아주의 항산화 및 항염증 효과

김 신 애 · 최 수 철 · 윤 영 한* · 고 창 인** · 하 영 순*** · 이 인 아†

군산대학교 자연과학대학 화학과

*서해대학교 뷰티케어과

**군산대학교 공과대학 정보통신학과

***(주)씨엔에스

(2017년 11월 6일 접수, 2017년 12월 21일 수정, 2017년 12월 22일 채택)

Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Dioscorea japonica* and *Chenopodium album*

Shin Ae Kim, Soo Cheol Choi, Young Han Youn*, Chang In Ko**, Young Soon Ha***, and In-Ah Lee†

Department of Chemistry, College of Natural science, Kunsan Natural University, Jellabuk-do 54150, Korea

*Department of Beauty Care, Sohae College, Jellabuk-do 54116, Korea

**Department of Information Telecommunication Engineering, college of Engineering,

Kunsan Natural University, Jellabuk-do 54150, Korea

***C & S Co., Ltd., Jellabuk-do 54076, Korea

(Received November 6, 2017; Revised December 21, 2017; Accepted December 22, 2017)

요약: 본 연구에서는 참마와 명아주의 항산화 및 항염증 효능을 평가하기 위해 참마와 명아주 에탄올 추출물을 이용하여 free radical 소거활성, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 실험을 수행하였다. 참마와 명아주 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(EC₅₀)에서 각각 2.386, 0.524 mg/mL로 측정되었다. 또한 참마와 명아주 추출물의 혼합 시료의 free radical 소거활성은 참마 추출물: 명아주 추출물 비율이 2:1일 때 가장 뛰어난 것으로 나타났다. IL-6와 TNF- α 의 ELISA 실험을 통해 항염증 효능을 평가한 결과, 마우스 비장세포에서 IL-6의 경우 1 mg/mL 농도에서 참마 추출물은 대조군과 대비하여 27.17% IL-6 생성을 감소시켰으며, 명아주 추출물은 72.30%의 감소를 나타내었다. TNF- α 의 경우 참마 추출물은 61.97%, 명아주 추출물은 77.85%로 유의성 있는 TNF- α 생성 감소 효능을 나타내었다. 이 결과들을 통하여 참마와 명아주 추출물은 항산화, 항염증 효능을 가지고 있으며, 이를 활용하여 항염증에 효과가 있는 천연물 제제에 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

Abstract: In this study, free radical scavenging activity and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments were carried out using *Dioscorea japonica* (*D. japonica*) and *Chenopodium album* (*C. album*) extracts to evaluate their anti-oxidative and anti-inflammatory effects. In the free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity, EC₅₀ of *D. japonica* and *C. album* were measured as 2.386 and 0.524 mg/mL, respectively. The free radical scavenging activity of the mixed sample of *D. japonica* and *C. album* was the highest when the *D. japonica* and *C. album* ratio was 2 : 1. The IL-6 and TNF- α ELISA assay showed that IL-6 in mouse spleen cells treated 1 mg/mL of samples, *D. japonica* and *C. album* decreased the production of IL-6 concentration by 27.17%, 72.30%. In the case of TNF- α , *D. japonica* and *C. album* decreased 61.97% and 77.85% of TNF- α production, respectively. Through these results, we confirmed that *D. japonica* and *C. album* have antioxidant and anti - inflammatory effects and could be applied to natural medicine cosmetic having anti - inflammatory effects.

† 주 저자 (e-mail: leeinah@kunsan.ac.kr)
call: 063)469-4574

Keywords: *Dioscorea japonica*, *Chenopodium album*, DPPH radical scavenging activity, antioxidant, anti-inflammatory

1. 서 론

최근 스트레스와 서구화된 식습관으로 인한 비만 등으로 인해 현대인들의 염증관련 질환에 대한 발병률이 증가하고 있다. 화학적으로 합성된 항염증 제제의 장기간 복용으로 인한 위, 신장 등의 기능장애와 같은 부작용들이 보고되면서 부작용이 적은 천연자원으로부터 항염증 제제를 개발하려는 노력이 계속되고 있다. 항산화능을 가진 천연물 제제들은 페놀산과 플라보노이드 등을 함유하고 있고, 이를 많이 가지고 있는 약물이나 약재는 뛰어난 항염증 효과를 가진다는 결과들을 바탕으로 항산화능이 뛰어난 천연물들의 항염증 활성을 확인하는 연구들이 활발히 수행되고 있다[1].

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이란 1O_2 , H_2O_2 와 같은 비라디칼 종과 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 와 같은 산소중심의 라디칼들과, ROS와 생체성분의 반응에서 생성되는 $ROO\cdot$, $RO\cdot$ 그리고 $ROOH$ 등을 포함한다. 활성산소는 고 에너지 복사선, 광 증감반응 등의 다양한 과정을 거쳐서 세포와 조직에서 생성되며, 과잉 생성 시 돌연변이, 염증, 세포사멸, 피부노화 등이 나타난다[2].

그람 음성균의 외막성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 항체 생산과 국소 염증 등 다양한 반응을 일으킨다. 대식세포는 LPS 감염초기에 반응하여 숙주 방어 역할을 수행하는데, 고농도의 LPS 자극은 대식세포가 interleukin (IL), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 그리고 nitric oxide (NO)와 같은 염증성 매개물질을 분비하도록 한다[3].

참마(*Dioscorea japonica* Thunb)는 마과(Dioscoreaceae)에 속하는 덩굴성 다년생 초본으로 굵고 긴 덩이뿌리를 가지고 있다[4]. 원산지가 중국이며 우리나라에서는 전국각지에 자생하고 덩굴 속이나 풀밭에서 발견되며, 주로 전라도 산간지방에서 널리 재배되고 있다. 참마는 근경에 함유되어 있는 약리 성분으로 amylase, batasin, mucin, mucilage, allantoin 등이 함유되어 있으며 자양강장, 폐결핵 및 당뇨병치료에 사용되어 왔다[5,6]. 참마의 사포닌 성분은 동맥경화증과 고혈압 그리고 혈중 콜레스테롤 함량을 감소시킨다고 알려져 있으며[7] 그중 steroidal saponin인 dioscin과 diosgenin은 항산화, 항균, 항진균[8], 혈당 하강 작용[9,10], 소화 촉진 작용,

자양 효과가 있는 것으로 알려져 있다[11-13]. 이 외에도 참마의 ethyl acetate 분획물은 인체 폐암세포주의 성장을 억제한다는 것이 연구되었으며[14], Balb/c 마우스에 참마를 투여하여 위의 기능과 지방 대사를 확인한 실험을 통해 작은 창자에서 cholesterol이 개선되었으며, LDL (low density lipoprotein cholesterol) 수치와 지방흡수가 감소되었다는 연구 결과가 발표된 바 있다[15].

명아주(*Chenopodium album* var. *centrorubrum*; *C. album*)는 중국남부에 원산지를 두고 있으며 전 세계적으로 약 1,500종이, 우리나라에서는 15종이 분포된 것으로 알려져 있다[16]. 명아주는 전국각지의 교란지, 염생지, 건조한 서식처 등에서 흔히 볼 수 있는 1년생 초본이다[17]. 예로부터 우리나라에서는 명아주를 약재로 활용하였는데 고혈압, 뇌출혈, 중풍 방지에 효과가 있어 그 엽경을 말려 약재로 사용했으며, 건조를 태운 가루를 치통, 인후통 등의 통증완화에 사용하였을 뿐 아니라 위무력증이나 천식, 벌레물린 데까지 다양하게 사용하였다[18]. 명아주는 식이성 섬유, 마그네슘, 비타민K 등 영양 성분이 풍부하다는 것이 알려졌으며[19], 그 외에 β -카로틴, 칼슘, 철분, 시토스테롤, leucine, betain 등의 아미노산 그리고 비타민 A, B1, B2, C 등을 함유한다는 것이 보고되어 있다[20-22]. 명아주는 그 항산화 및 항염증, 항진균, 항바이러스, 항암 효과가 있음이 밝혀졌으며[23-26], 또한 항당뇨 작용 등이 연구된 바 있다[27].

따라서 본 연구에서는 참마와 명아주의 생리적 기능성 연구의 일환으로 참마와 명아주의 70% 에탄올 추출물을 사용하여 그 항산화능 및 LPS로 염증이 유도된 마우스 비장세포와 대장세포 및 뇌세포에 참마와 명아주 에탄올 추출물을 처리하여 참마와 명아주의 항염증 효능에 대하여 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 준비

참마와 명아주는 전라북도 남원시에서 채취한 시료를 사용하였다. 참마와 명아주의 이물질을 제거하여 건조시킨 시료 각 1 kg을 70% 에탄올을 가하여 상온에

서 48 h 추출하였다. 그 후에 Whatman filter paper (110 mm)로 총 3번 여과한 용액을 감압농축 하여 얻은 시료를 다시 동결 건조 시켜 가루 형태로 얻었다. 분말 가루는 각각 130 g, 162 g으로 수율은 참마 추출물, 명아주 추출물 각각 13%, 16.2%였다. 이렇게 얻어진 시료들은 4 °C의 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다.

2.2. 시약

Fetal bovine serum, RPMI 1640 media, antibiotics 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, Tris-HCl, LPS 등은 Fisher Scientific (Hampton, VA, USA)사에서 구입하였다. 항산화 실험에는 ethanol과 L-ascorbic acid (vitamin C) 등을(Samchun Chemical, gyeonggi, Korea), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 SIGMA (St.Louis, USA) 제품을 사용하였고, ELISA 실험의 mouse IL-6 ELISA kit와 TNF- α kit는 영인프론티어(Seoul, KOREA) 제품을 사용하였으며, 흡광도를 측정하기 위한 Micro plate reader는 Fisher Scientific (Hampton, VA, USA)사의 제품을 사용했다.

2.3. 실험동물

실험에 사용된 마우스는 Orient animal breeding center (Seoul, Korea)에서 공급받았으며 온도 20-22 °C와 습도 40-50%의 환경에서 사육하였다. 멸균된 깔짚과 사료를 제공하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취 시키면서 1주 동안 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 실험 전 12 h 절식시킨 후 마우스를 경추탈골하여 뇌, 간, 비장, 림프절, 췌장 및 대장조직을 적출 하였다. 뇌와 비장 및 대장 조직 일부는 적출 즉시 Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640; HyClone Laboratories)으로 세척하여 0.45 μ m cell strainer (Life Technologies; Hampton, VA, USA)를 사용하여 세포 부유액을 얻었다. 분리된 세포는 사이토카인 측정에 이용하였다.

2.4. DPPH Radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 확인

참마 추출물과 명아주 추출물의 항산화능 분석을 위하여 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거법을 이용한 전자 공여능(Electron donating ability, EDA) 측정을 수행하였다. 참마 추출물과 명아주 추출

물 시료를 에탄올에 녹여 농도별(0.1-10 mg/mL)로, 참마 추출물 : 명아주 추출물 비율을 1 : 1-10으로, 명아주 추출물 : 참마 추출물 비율을 1 : 1-10으로 만들어 농도별(0.1-10 mg/mL)로 준비한 후 96-well plate에 70% 에탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 100 μ L와 각 시료 100 μ L를 분주한 혼합액을 실온에서 20 min 간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군과 비교한 라디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었으며 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. 전자 공여능의 백분율 공식은 다음과 같다[28].

$$\text{Electron donating ability (EDA) (\%)} = \{1 - (A - B)/C\} \times 100$$

A: sample absorbance 520 nm

B: color control absorbance 520 nm (without DPPH)

C: negative control absorbance 520 nm (without sample)

2.5. 총 폴리페놀 함량 측정

추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 Folin-Ciocalteu's 발색법을 사용하여 함량을 확인하였다[29]. 각각의 추출물 시료 200 μ L에 0.2 N Folin-Ciocalteu's reagent 1 mL를 넣고 충분히 혼합한 후, 4 min 간 방치한 뒤 75 g/L Na₂CO₃ 용액을 800 μ L를 넣고, 2 h 동안 방치한 다음 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선 작성에는 0-500 mg/L gallic acid를 사용하였고, 총 폴리페놀 함량은 Gallic acid equivalent (mg GAE)/g양으로 환산하였다.

2.6. 전 염증성 사이토카인(IL-6, TNF- α) 측정

LPS로 유도한 primary culture cells에서 염증 발생 시, 참마 추출물과 명아주 추출물이 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용해 염증성 사이토카인의 농도를 비교하였다. 마우스의 뇌, 비장, 대장 조직에서 추출한 세포를 24-well plate에 1×10^6 cell/well씩 plating하여 5% CO₂ incubator에서 2 h 배양한 후, LPS (1 μ g/mL)로 세포를 자극하고 동시에 참마와 명아주 추출물을 각각 농도별(500, 1,000, 2,000 μ g/mL)로 처리한 후 24 h 추가 배양하여 얻은 세

포 상등액을 이용하여 염증성 사이토카인 농도를 ELISA로 확인하였다. ELISA kit는 영인프런티어 (Seoul, Korea)에서 mouse ELISA kit for IL-6, TNF- α 를 구입하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 실험과정을 설명하면, 항체가 코팅된 96-well plate를 washing buffer로 세척하고 1 h 동안 실온에서 빛을 차단시킨다. 그 후 standards와, 각 군의 대장 점막 조직을 3번 원심분리한 상등액을 100 μ L 취한 후 96-well plate에 loading하여 capture antibody인 IL-6항체와 2 h 반응시킨다. 다시 plate를 세척하고, 그 뒤 biotin이 결합된 detection antibody와 결합시킨 후 streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) complex와 함께 배양한다. Substrate solution에 있는 tetra methyl benzidine (TMB)는 HRP와 반응하여 450 nm에서 흡광도를 가지게 되고, stop solution (2 N H₂SO₄)으로 반응을 중지시킨다. Resulting solution을 microplate reader로 흡광도를 측정하여 standard curve를 이용해 IL-6와 TNF- α 의 농도를 측정하였다.

2.7. 세포독성

참마 추출물과 명아주 추출물의 세포독성을 검토하기 위하여 한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양받은 대식세포 RAW 264.7 cell line을 사용하였다. 세포는 10% FBS와 1% P/S (50 units/mL penicillin, 25 mg/mL streptomycin)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에서 2일에 한 번씩 배지를 교환하면서 5% CO₂ incubator에서 75 cm² culture flask에 배양하였다. 이후 70-75% 정도 증식된 세포를 회수한 다음 24-well plate에 1 \times 10⁶ cell/well씩 plating하여 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양한 후, 추출물은 0.2-1 mg/mL의 농도 범위로 처리하고, 혼합 시료는 500 μ g/mL의 농도로 처리한 다음 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하여 crystal violet staining법으로 세포의 생존율을 측정하였다. 실험 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 media를 각 well에서 제거하고, 1 \times PBS 1 mL로 3회 세척 후, 10% formalin 용액을 각 well에 200 μ L씩 첨가하여 10 min 간 고정하였다. 고정을 마치면 20% methanol을 이용해 제조한 1% crystal violet 200 μ L를 각 well에 분주한 다음 상온에서 10 min 간 염색하고, 염색이 끝나면 각 well에서 염색 용액을 제거하고 증류수로 6번 세척한다. 33% glacial acetic acid 용액을 각 well에 250

μ L씩 가하여 20배 희석한 용액을 96-well plate로 옮겨 염색이 된 세포의 흡광도를 595 nm에서 측정하여 세포 생존율을 산출하였다[30].

$$\text{Viability (\%)} = (\text{Test well} / \text{대조군 well}) \times 100$$

2.8. Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

배양액 내의 nitrite 농도를 측정하기 위해 Griess 반응을 이용하였다[31]. RAW 264.7 세포를 24-well plate에 1.0 \times 10⁶ cells/well만큼 접종하고 5% CO₂ incubator에서 20 h 배양하였다. 그 후 참마 추출물과 명아주 추출물 각각을 0.1, 0.25, 0.50, 1 mg/mL 처리하고 1 μ g/mL의 LPS로 자극하여 24 h 추가 배양하였다. 이를 4 $^{\circ}$ C, 2,000 rpm에서 10 min간 원심분리 하여 상등액을 얻어 BCA protein assay (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 단백질을 정량하였다. RAW 264.7 세포를 LPS로 24 h 자극하여 배양액 중에 분비된 NO의 농도는 NO 정량키트(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 microplate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

2.9. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, 실험 결과는 각 항목에 따라 평균치 \pm 표준편차(standard deviation, S.D.)를 구하고 student *t*-test를 통해 신뢰수준 $p < 0.05$ 일 때 통계적 유의차가 있다고 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

참마 추출물과 명아주 추출물에 대하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 전자 공여능(EDA) 결과를 Figure 1에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능은 안정한 라디칼인 보라색의 DPPH가 항산화 물질에 의해 환원되면서 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 측정하며 그 측정 방법이 비교적 간단하여 여러 시료로부터 항산화 활성을 탐색할 때 유용하다[32]. 참마 추출물은 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL에서 각각 18.01, 47.68, 66.04, 79.87, 84.76, 88.26, 89.05, 89.64%의 소거활성을 보였다. 명아주 추출물은 10.25, 14.02, 22.24, 41.92, 62.71, 71.96, 75.07, 77.73%의 소거활성을 보였다. 이와

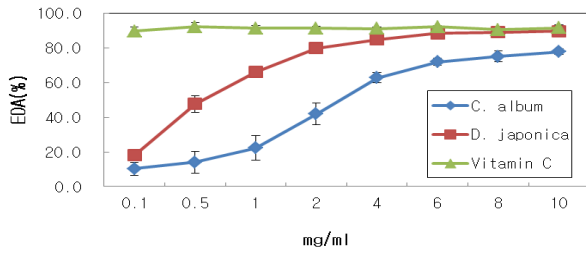


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of *D. japonica* and *C. album* extracts. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments.

대비로, 양성 대조군으로 사용한 그 항산화능이 알려진 vitamin C는 농도 비의존적으로 89.60-92.20% 사이의 소거활성을 보였다. 참마 추출물과 명아주 추출물은 ascorbic acid 보다는 낮은 소거활성을 보이나 참마 추출물은 2 mg/mL의 농도에서, 명아주 추출물은 6 mg/mL의 농도에서 70% 이상의 소거활성을 보였다. 전체적인 농도로 보았을 때 명아주 추출물 보다 참마 추출물의 소거활성이 더 뛰어난 것으로 나타났다.

참마 추출물과 명아주 추출물의 비율과 농도를 달리 하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Figure 2와 같다. Figure 2a에서, 참마 추출물과 명아주 추출물 혼합 시료에서 명아주 추출물의 비율을 높일수록 그 소거활성이 증가하였으며, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 10의 혼합시료의 농도가 10 mg/mL일 때 81.42%의 가장 높은 소거활성을 보였다. 참마 추출물 비율 증가 시, 명아주 추출물 비율이 증가한 혼합 시료와 비교하여 참마 추출물 : 명아주 추출물 비율이 10 : 1인 혼합시료의 소거활성은 83.97%로 보다 높은 소거활성을 보였다. 이는 Figure 1의 참마 추출물과 명아주 추출물의 DPPH 결과에서 참마 추출물이 명아주 추출물의 라디칼 소거활성보다 높게 나타났음을 뒷받침하는 결과이다.

3.2. 총 폴리페놀 함량 비교

참마 추출물과 명아주 추출물의 총 폴리페놀 함량 (mg GAE)을 분석한 결과는 Figure 3과 같다. 참마 추출물과 명아주 추출물의 페놀 함량은 각각 35.15 mg/100 g, 17.47 mg/100 g으로 확인되었다.

3.3. 세포독성 평가

Crystal violet staining 방법을 이용하여 참마와 명아

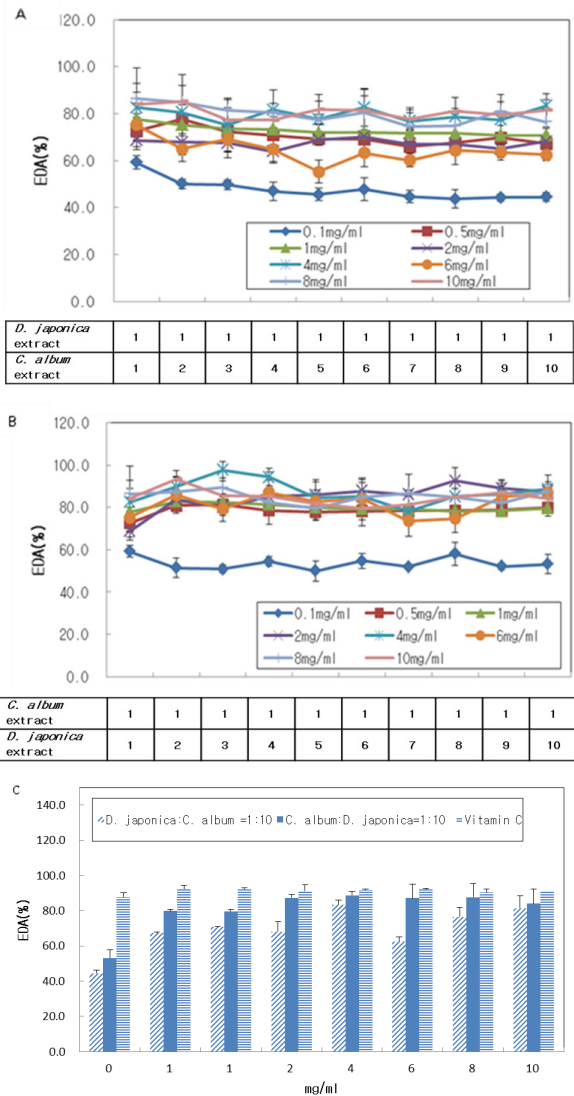


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of mixed sample that (A) that *D. japonica* and *C. album* extracts ratio 1 : 1-1 : 10, (B) *C. album* and *D. japonica* extracts ratio 1 : 1-1 : 10. (C) *D. japonica* : *C. album* = 1 : 10, *C. album* : *D. japonica* = 1 : 10 and vitamin C. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments.

주 추출물이 RAW 264.7 cell에서 얼마나 세포 독성을 나타내는지 확인한 결과는 Figure 4와 같다. 참마 추출물의 경우, 참마 추출물을 농도별로 처리 시 시료를 첨가하지 않고 RPMI를 동일 농도로 처리한 대조군과 비교했을 때 세포 생존율은 증가하였으며 1 mg/mL의 농도까지 세포 독성을 나타내지 않았다(Figure 4A). 그러나 명아주 추출물은 0.4 mg/mL 이상에서 정상 세포와

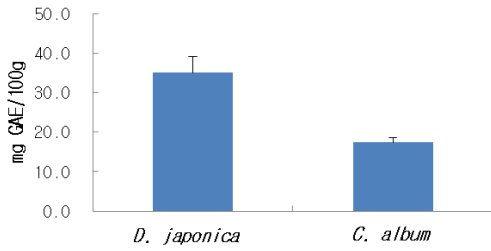


Figure 3. Contents of total polyphenol of *D. japonica* and *C. album* extracts. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments.

비교하여 농도 의존적으로 유의성 있게 세포 생존율이 감소하였다(Figure 4B). 참마 추출물과 명아주 추출물 혼합시료 500 µg/mL를 처리한 실험 결과, 참마 추출물과 명아주 추출물 비율 증가와 무관하게 85-90%의 세포 생존율을 보였으며(Figure 4C), 참마 추출물 비율 증가 시, 명아주 추출물 비율이 증가한 혼합 시료와 비교하여 유의성 있게 증가한 세포 생존율을 확인할 수 있었다(Figure 4D). 이 실험 결과에 따라 0.2-1 mg/mL의 농도를 추후 실험에 사용하였다.

3.4. 항염증 효과 측정

일반적인 cell line과 달리 조직에서 직접 분리된 primary cultured cell은 한정된 수명을 가지고 있으나, 관찰되는 중요한 마커와 기능을 많이 유지한다는 장점을 가져 primary cultured cell을 사용하여 얻은 데이터는 생체 내 환경과 보다 유사한 반응 결과라는 보고가 밝혀진 바 있다[33]. 따라서 우리는 이 실험에서, primary cultured cell을 이용하여 LPS로 유도한 염증 발생 시, 참마 추출물과 명아주 추출물이 전 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ELISA 방법을 이용하였다. 앞서 실험에서 정한 농도 중, 세포 사멸을 나타내지 않는 가장 높은 농도인 1 mg/mL의 추출물을 처리한 후, 전 염증성 사이토카인의 발현량을 확인하였다.

3.4.1. IL-6 생성 억제 효과

IL-6는 감염 및 조직 손상에 반응하여 단핵식세포, T 세포 및 섬유아세포를 포함한 다양한 조혈 모세포 및 비 조혈 세포에 의해 생성되는 급성 기 염증반응 (acute-phase protein inflammation)을 유도하는 면역 시스템의 주요 요소이다[34,35]. LPS로 활성화된 마우스

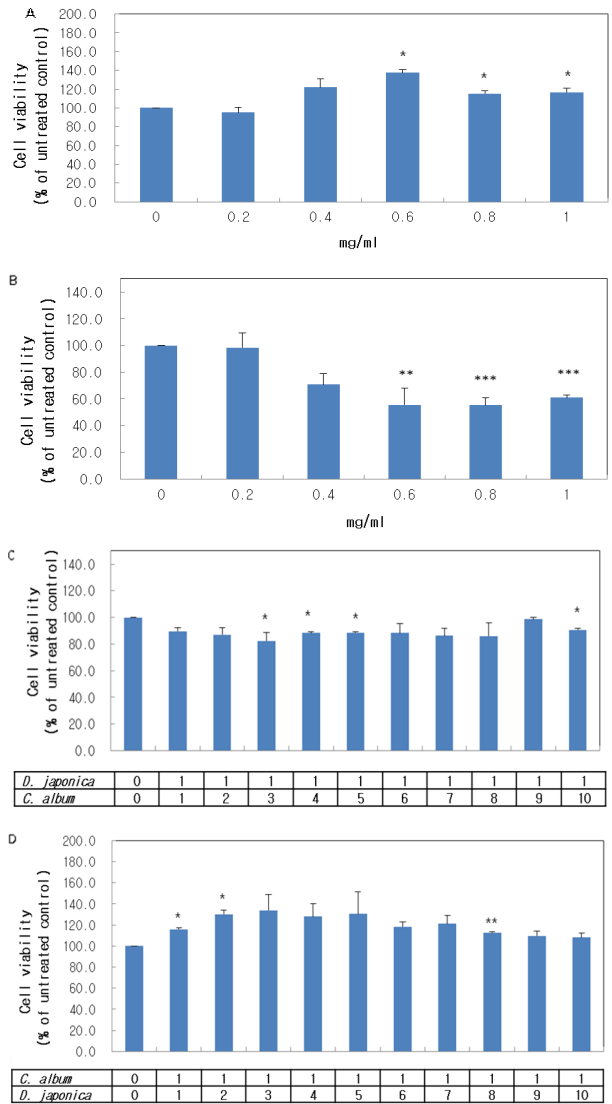


Figure 4. Cell viability of (A) *D. japonica* (B) *C. album* extracts on RAW 264.7 cell. (C) *D. japonica* and *C. album* extracts ratio 1:1-1:10 (D) *C. album* and *D. japonica* extracts ratio 1:1-1:10. Cell viability was determined by crystal violet staining. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments (Significant as compared to control. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

의 뇌와 비장, 대장 세포에서 참마 추출물과 명아주 추출물의 IL-6 생성억제 효과를 확인한 결과, 뇌 세포의 경우 대조군과 비교하여 참마 추출물 1 mg/mL 처리 시 28.18%, 명아주 추출물 1 mg/mL 처리 시 17.78%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합시료 1 mg/mL 36.64%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1 57.23%의

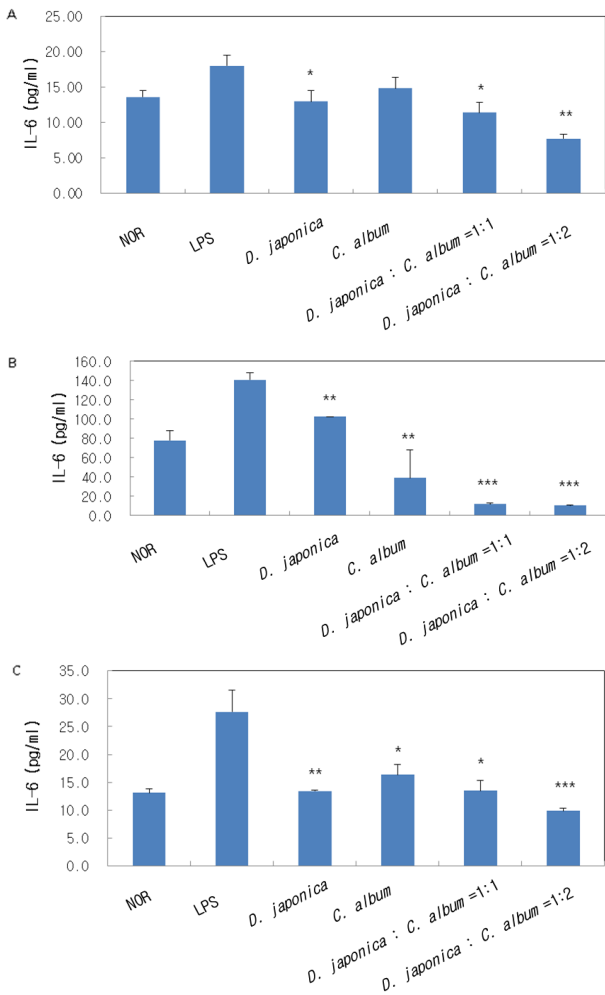


Figure 5. Effects of *D. japonica* and *C. album* on the production of cytokines stimulated by LPS. Production of IL-6 was measured in the medium of (A) brain, (B) spleen, (C) large bowel cells cultured with LPS (1 μ g/mL), respectively. The amount of IL-6 was measured by ELISA as described in materials and methods. Nor : LPS not treated group, LPS : LPS treated group. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

생성 감소를 나타내었다(Figure 5A). 비장 세포의 경우 대조군과 비교하여 참마 추출물 1 mg/mL 처리 시 27.17%, 명아주 추출물 1 mg/mL 처리 시 72.30%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합시료 1 mg/mL 91.56%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1 1 mg/mL 처리 시 92.45%의 생성 감소를 확인하였다(Figure 5B). 또한, 대장 세포의 경우 참마 추출물 1 mg/mL 처리 시 51.41%, 명아주 추출물 1 mg/mL의 경우 40.92%, 참마

추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합시료 1 mg/mL 51.28%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1 1 mg/mL 시료는 64.38%의 IL-6 억제능을 확인할 수 있었다(Figure 5C).

3.4.2. TNF- α 생성 억제 효과

TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되는 염증성 사이토킨으로, 보조 T 세포, 자연살해세포, 그리고 손상된 뉴런 등의 다양한 세포에서도 분비된다[36]. TNF- α 는 세포 자살을 유도하거나, IL-1과 IL-6의 생산을 통해 감염을 유발하며 중앙생성과 바이러스 복제를 억제한다[37]. LPS로 활성화된 마우스의 뇌와 비장, 대장 세포에서 참마 추출물과 명아주 추출물의 TNF- α 생성억제 효과를 확인한 결과, 뇌 세포의 경우 대조군과 비교하여 참마 추출물 1 mg/mL 처리시 6.62%, 명아주 추출물 39.20%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합시료 1 mg/mL 45.04%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1 69.30%의 생성 감소를 나타내었다(Figure 6A). 비장 세포의 경우 대조군과 비교하여 참마 추출물 1 mg/mL 처리시 61.97%, 명아주 추출물 77.86%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합시료 1 mg/mL이 77.29%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1에서 79.82%의 생성 감소를 확인하였다(Figure 6B). 또한, 대장 세포의 경우 참마 추출물 1 mg/mL 처리시 20.44%, 명아주 추출물 40.54%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합시료 1 mg/mL이 33.54%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1에서 47.23%의 TNF- α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 6C).

3.5. Nitric Oxide 생성 억제 효과

NO는 반응성이 강한 이원자 자유 radical로 인체 내 생리적 또는 병적 반응에 중요한 물질로, 적정 수준에서는 면역조절, 혈관확장 등의 역할을 하지만 과량으로 생성되면 염증반응을 촉진하며 면역질환을 포함한 기관지염, 다발성 경화증과 같은 병적 반응을 일으킨다[38]. 참마와 명아주 추출물의 NO 생성 억제 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성량을 Griess 시약을 이용해 측정하였다. LPS 단독 처리군과 비교하였을 때, 참마 추출물 처리시 농도의존적으로 유의성 있는 NO 생성 억제를 나타냈다(Figure 7A). 명아주 추출물 역시 농도의존적

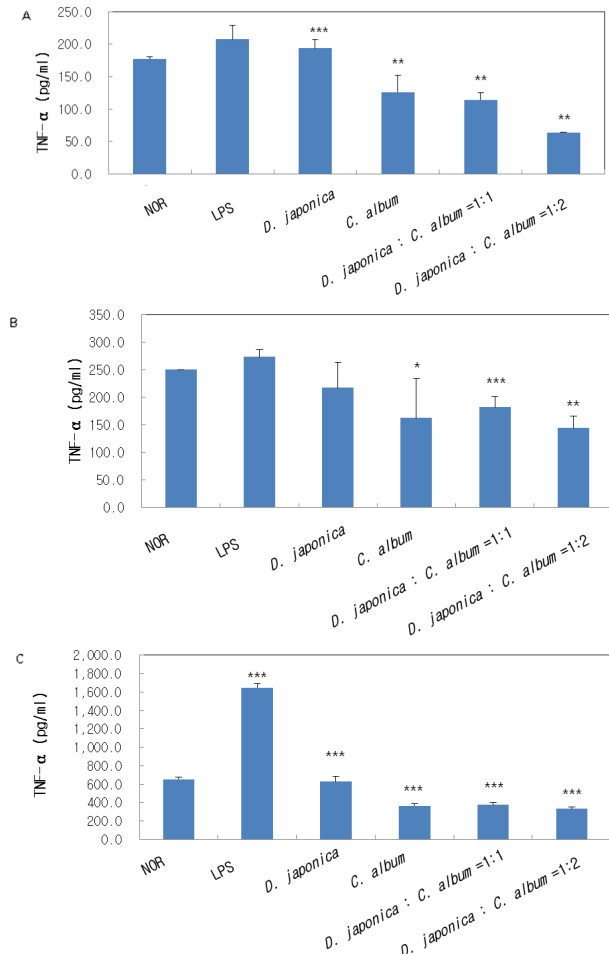


Figure 6. Effects of *D. japonica* and *C. album* on the production of cytokines stimulated by LPS. Production of TNF- α was measured in the medium of (A) brain, (B) spleen, and (C) large bowel cells cultured with LPS (1 μ g/mL), respectively. The amount of TNF- α was measured by ELISA as described in materials and methods. Nor : LPS not treated group, LPS : LPS treated group. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

으로 NO 생성 억제 효과를 보였다(Figure 7B). 참마와 명아주 추출물 모두 LPS로 유도된 대식세포에서 증가한 NO의 생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

4. 결 론

본 실험에서는 참마 추출물과 명아주 추출물의 DPPH를 이용한 라디칼 소거활성과 세포독성 및 항염

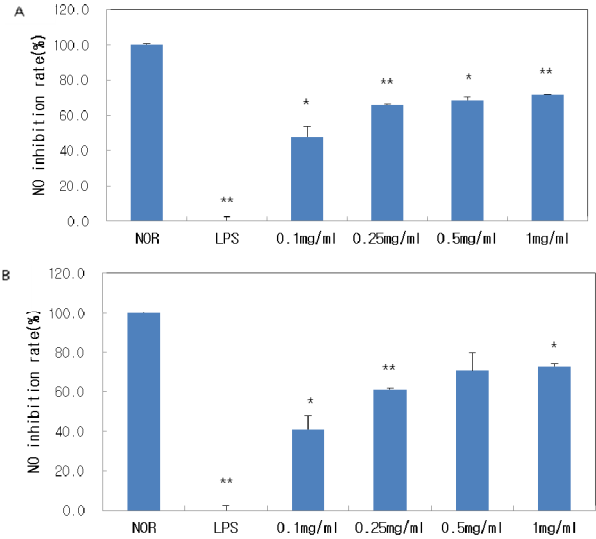


Figure 7. Effect of (A) *D. japonica*, (B) *C. album* extracts ethanol extract on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the treatment of LPS (1 μ g/mL) alone or in combination with samples (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mg/mL) for 24 h, respectively. The culture media of the treated cells were used to measure NO levels. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. (Significant as compared to control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

증 효과를 확인하였으며, 실험 결과를 통하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 참마 추출물과 명아주 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인한 결과, 참마 추출물 10 mg/mL에서 89.64%의 소거활성을 보였으며 명아주 추출물은 77.73%의 소거활성을 보였다. 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 10의 혼합시료의 농도가 10 mg/mL일 때 81.42%, 참마 추출물 : 명아주 추출물 비율이 10 : 1인 혼합시료의 소거활성은 83.97%로 확인 되었으며, 농도 의존적임을 확인할 수 있었다.
2. 참마 추출물과 명아주 추출물의 처리 농도에 따른 대식세포 RAW 264.7 cells의 생존율을 확인한 결과, 참마 추출물 0-1 mg/mL 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 명아주 추출물 의 경우 0.4 mg/mL 농도 이상에서 세포 독성이 있음을 확인하였다.
3. 참마 추출물과 명아주 추출물의 IL-6 생성 억제능을 확인한 결과, 참마 추출물과 명아주 추출물 그리고 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합

- 시료와 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1 혼합 시료 1 mg/mL 처리 시 모든 실험군에서 IL-6 억제능을 확인할 수 있었다. 특히, 비장세포에서 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1 혼합시료의 IL-6 생성 억제능은 모든 실험군 중에서 가장 뛰어났다.
- 참마 추출물과 명아주 추출물의 TNF- α 생성 억제능을 확인한 결과, 참마 추출물과 명아주 추출물 그리고 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 1 : 1 혼합시료와 참마 추출물 : 명아주 추출물 = 2 : 1 혼합시료 1 mg/mL 처리 시 모든 실험군에서 TNF- α 억제능을 확인할 수 있었다. 비장세포의 경우 모든 실험군의 TNF- α 생성 억제능은 65% 이상으로 나타났다.
 - 참마 추출물과 명아주 추출물 모두 LPS로 유도된 대식세포에서 염증반응으로 인한 NO의 생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Acknowledgement

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2016년도 산학연협력 기술개발사업(No. 17B16180501)의 연구 수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

Reference

- M. Namiki, Antioxidants/antimutagens in food, *Crit. Rev. Food Sci.*, **29**(4), 273-300 (1990).
- J. C. Fantone and P. A. Ward. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Am. J. Pathol.*, **107**(3), 395-418 (1982).
- M. L. McDaniel, G. Kwon, J. R. Hill, C. A. Marshall, and J. A. Corbett. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **211**, 24-32 (1996).
- Y. Xue, T. Miyakawa, A. Nakamura, K. Hatano, Y. Sawano, and M. Tanokura, Yam tuber storage protein reduces plant oxidants using the coupled reactions as carbonic anhydrase and dehydroascorbate reductase, *Molecular Plant*, **8**(7), 1115-1118 (2015).
- H. Herlina, Deproteinase effect of hydrocolloid flour made of Gembili Tuber (*Dioscorea esculenta* L.) on chemical and technical functional properties, *Int. J. Adv. Sci., Engineering and Information Technology*, **5**(4), 298-302 (2015).
- Z. Huang, Z. Liang, G. Li, and H. Hong, Response surface methodology to extraction of *Dioscorea* polysaccharides and the effects on rat's bone quality, *Carbohydrate Polymers*, **83**(1), 32-37 (2011).
- M. K. Kim and K. K. Lee, Screening of physiological activities of *Dioscorea japonica* extracts, *Korean Beauty Society*, **19**, 509 (2013).
- K. D. Yoon and J. Kim, Preparative separation of dioscin derivatives from *Dioscorea villosa* by centrifugal partition chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J. Sep. Sci.*, **31**, 2486 (2008).
- M. H. Kim and S. J. Lim, The effect of *Dioscorea japonica* Thunb. subfractions on blood glucose levels and energy metabolite composition in streptozotocin induced diabetic rats, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **33**(2), 115-123 (2000).
- M. H. Kim, Effects of H₂O - fraction of *Dioscorea japonica* Thunb. and selenium on lipid peroxidation in streptozotocin - induced diabetic rats, *Korean J. Food and Cookery Sci.*, **17**(4), 344-352 (2001).
- Z. Ali, T. J. Smillie, and I. A. Khan, Cholestane steroid glycosides from the rhizomes of *Dioscorea villosa* (wild yam). *Carbohydr. Res.*, **370**, 86 (2013).
- S. H. Dong, D. Nikoli, C. Simmler, F. Qiu, R. B. Breemen, D. D. Soejarto, G. F. Pauli, and S. N. Chen, Diarylheptanoids from *Dioscorea villosa* (Wild Yam). *J. Nat. Prod.*, **75**, 2168 (2012).
- J. Cho, H. Choi, J. Lee, M. S. Kim, H. Y. Sohn, and D. G. Lee, The antifungal activity and membrane-disruptive action of dioscin extracted from *Dioscorea nipponica*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 1153 (2013).
- H. S. Chung, A study of cytotoxicity from some Korean edible plants, *Korean J. Food and Cookery Sci.*, **15**(2), 108-113 (1999).
- H. L. Chen, C. H. Wang, C. T. Chang, and T. C.

- Wang, Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb. var. *pseudo japonica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice, *Nutrition*, **19**, 646-651 (2003).
16. S. F. Bazan, P. Uotila, and T. Borsch: A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium sensu lato*, and a tribal rearrangement of *Chenopodioideae* (*Chenopodiaceae*), *In: Willdenowia*, **42**(1), 5-24 (2012).
 17. Y. S. Choo and S. D. Song, Ecophysiological characteristics of chenopodiaceous plants - an approach through inorganic and organic solutes. *Korean J. of ecology*, **23**(5), 397-406 (2000).
 18. S. U. Chon, B. G. Heo, Y. S. Park, D. K. Kim, and S. Gorinstein, Total phenolics level, antioxidant activities and cytotoxicity of young sprouts of some traditional Korean salad plants. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **64**(1), 25-31 (2009).
 19. A. V. Gálvez, M. Miranda, J. Vergara, E. Uribe, L. Puente, and E. A. Martínez. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review, *J. Sci. Food. Agric.*, **90**(15), 2541-2547 (2010).
 20. K. D. Sharma, G. Bindal, R. Rathour, and J. C. Rana, Carotene and mineral content of different *Chenopodium* species and the effect of cooking on micronutrient retention, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **63**(3), 290-295 (2012).
 21. A. Adedapo, F. Jimoh, and A. Afolayan, Comparison of the nutritive value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Bidens pilosa* and *Chenopodium album*, *Acta. Pol. Pharm.*, **68**(1), 83-92 (2011).
 22. A. Poonia and A. Upadhyay, *Chenopodium album* Linn: review of nutritive value and biological properties. *J. Food Sci. Technol.*, **52**(7), 3977-3985 (2015).
 23. P. Kim and C. S. Jeong, Anti-gastritis and anti-oxidant effects of *Chenopodium album* Linne fractions and betaine, *Biomole. & Ther.*, **18**(4), 433-441 (2010).
 24. Y. Dai, W.C. Ye, Z. T. Wang, H. Matsuda, M. Kubo, and P.P. But, Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* Linn, *Mice. J. Ethnopharm.*, **81**, 245-250 (2002).
 25. B. K. Khoobchandani, B. S. Ojeswi, and M. S. Man, *Chenopodium album* prevents progression of cell growth and enhances cell toxicity in human breast cancer cell lines, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2**(3), 160-165 (2009).
 26. P. Kim and C. S. Jeong, Effects of *Chenopodium album* Linne on gastritis and gastric cancer cell growth, *Biomole. & Ther.*, **19**(4), 487-492 (2011).
 27. B. L. Graf, A. Poulev, P. Kuhn, M. H. Grace, M. A. Lila, and I. Raskin, Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties, *Food Chem.*, **15**(163), 178-185 (2014).
 28. B. W. Kim, H. J. Park, H. J. Kwon, Y. N. Oh, and S. J. Jin, Anti-oxidative and anti-cancer activities by cell cycle regulation of *Salsola collina* extract. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **42**(1), 73-81 (2014).
 29. H. B. Li, C. C. Wong, K. W. Cheng, and Feng Chen, Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants, *In LWT - Food Science and Technology*, **41**(3), 385-390 (2008).
 30. B. O. Lim, D. H. Kim, S. R. Park, T. Debnath, M. A. Hasnat, and M. Pervin, Evaluation of the antioxidant activity and anti-inflammatory effect of *Hericium erinaceus* water extracts. *Korean J. Med. Crop Sci.*, **21**(2), 112-117 (2013).
 31. S. T. Lee, Y. R. Jeong, M. H. Ha, S. H. Kim, M.W. Byun, and S. K. Jo. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 342-348 (2000).
 32. D. Huang, B. Ou, and R. L. Prior, Reviews: the chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1841-1856 (2005).
 33. C. Pan, C. Kumar, S. Bohl, U. Klingmueller, and M. Mann, Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell

- type-specific functions. *Mol. Cell Proteomics*, **8**(3), 443-450 (2009).
34. C.A. Feghali and T. M. Wright, Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.*, **1**(2), 12-26 (1997).
35. S. V. Rana, S. Sharma, S. K. Sinha, K. K. Parsad, A. Malik, and K. Singh, Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine response in diarrhoea-predominant Irritable bowel syndrome patients, *Tropical Gastroenterology*, **33**(4), 251-256 (2012).
36. M. M. Chaturvedi, R. L. Pushin, and B. B. Aggarwal. Tumor necrosis factor and lymphotoxin: qualitative and quantitative differences in the mediation of early and late cellular response, *J. Biological Chemistry*, **269**(20), 14575-14583 (1994).
37. J. M. Zhang and J. An, Cytokines, Inflammation and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.*, **45**(2), 27-37 (2007).
38. Y. S. Kim, S. J. Lee, J. W. Hwang, E. H. Kim, P. J. Park, and J. H. Jeong, Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 1205-1210 (2012).