

조팝나무 뿌리 열수 추출물이 RAW264.7 세포에서 미치는 항산화 및 항염증 활성

심미옥^{1†}, 이현주^{1†}, 장지훈^{1†}, 이효은², 정호경¹, 김태묵¹, 노종현¹, 정자균¹, 정다은¹, 조현우^{1*}

¹한약진흥재단, ²한국뇌연구원

Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai in RAW 264.7 Cells

Mi-Ok Sim^{1†}, Hyun Joo Lee^{1†}, Ji Hun Jang^{1†}, Hyo Eun Lee², Ho-Kyung Jung¹, Tae-Muk Kim¹,
Jong hyun No¹, Jakyun Jung¹, Da Eun Jung¹ and Hyun-Woo Cho^{1*}

¹National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung-gun 59338, Korea

²Korea Brain Research Institute, Daegu 41068, Korea

Abstract - *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai (SSN) has been used for the anti-inflammation in traditional folk medicine. To compare water and methanol extracts of SSN, we analyzed major components using LC IT TOF MS. The major components of hot water extract were identified as caffeic acid and p-coumaric acid, but methanol extract was not well established. However, methanol extract was detected with less polarity compounds compared to hot water extract. Next, we investigated the inhibitory effects of SSN water extract on the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response or H₂O₂-induced oxidative stress in Raw 264.7 macrophage cells. SSN strongly suppressed the production of nitric oxide in LPS-induced inflammatory response without cytotoxicity. The SSN possessed free radical scavenging activities such as DPPH (IC₅₀=320.2 μg/ml), ABTS (IC₅₀=124.0 μg/ml), and superoxide anion radical (IC₅₀=122.6 μg/ml). The total phenol and flavonoid content of SSN was 56.7 mg/g, and 15.1 mg/g, respectively. Furthermore, SSN decreased the H₂O₂-induced cytotoxicity by enhancing the cell viability, and SSN significantly reduced the intracellular reactive oxygen species (ROS) level. Therefore, SSN may be recommended as an effective strategy to prevent and/or treat various inflammation and ROS-induced diseases.

Key words - Anti-inflammatory, Anti-oxidant, Oxidative stress, *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai

서 언

한국인의 사망원인은 대표적으로 암, 심뇌혈관질환, 당뇨병 등과 같은 만성질환으로 이들의 병리기전은 산화적 스트레스와 염증반응이 특히 관련성이 매우 높다(Kim *et al.*, 2008; Li and Wang, 2011, Kim *et al.*, 2017). 산화는 생명이 살아가는데 에너지를 생성하기 위한 꼭 필요한 과정이며, 이러한 산화 과정은 활성산소(reactive oxygen species; ROS)를 생성한다(Aiyegoro and Okoh, 2010). 하지만 지나친 스트레스, 환경오염, 비만과

같은 이유로 ROS를 제거하는 항산화 활성이 감소하게 되면 체내 과도한 ROS가 형성되고, 이는 산화적 스트레스를 유발하게 된다(Valko *et al.*, 2006). 산화적 스트레스의 증가는 세포막, DNA, 장기 및 조직 손상, 면역력 저하를 일으키며, 심지어 염증성 매개 물질을 형성하여 염증반응을 유도하고 결과적으로는 심혈관질환, 암, 치매, 당뇨병, 천식 및 노화를 촉진시킨다(Park and Kim, 2016; Jenner, 2007; Dhalla *et al.*, 2000).

체내 항산화 시스템은 산화적 스트레스로부터 유발되는 많은 질환을 억제하여 인체를 보호하지만, 산화적 스트레스를 완전히 방어하지 못하므로 이를 보완할 수 있는 항산화제에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다(Ferreira *et al.*, 2009; Carocho and Ferreira, 2013). 일반적으로 항산화제는 효소 계

*교신저자: jjhktm@naver.com

Tel. +82-61-860-2814

† These authors contributed equally to this work.

열의 항산화제와 천연 항산화제, 합성 항산화제가 널리 알려져 있으며, 그중 천연 항산화제는 합성 항산화제보다 안정성이 뛰어나 새로운 천연 항산화제 발굴에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kwon *et al.*, 2008).

조팝나무(*Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai)의 경우 예부터 중국에서 어린잎이나 과실, 뿌리를 이뇨제, 해독제, 염증 치료제 및 진통제로서의 사용이 보고되어 있으며, 우리나라에서는 학질, 기침, 해열 등의 치료제로 이용되었다(Rye *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2012). 최근 참조팝나무 추출물의 항산화 활성 및 항염증 효능에 대한 문헌이 보고되었으며(Choi *et al.*, 2016), So *et al.* (1999)은 조팝나무 메탄올 추출물의 항산화 및 항염증의 생리활성에 대해 보고하였다. 하지만 아직 열수추출물에 대한 연구는 이루어지지 않아 본 연구에서는 조팝나무 뿌리 열수 추출물의 항산화 및 항염증 효과를 탐색함으로써 향후 염증반응 증가 및 항산화 시스템과 관련이 있는 질환의 치료 및 예방을 할 수 있는 건강보조식품 및 기능성 화장품의 소재로의 활용 가능성에 대해 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S), phosphate-buffered saline (PBS)는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)는 CellTiter 96[®] Aqueous one solution cell proliferation assay와 Griess reagent system은 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. HPLC 분석에 사용한 물과 acetonitrile은 HPLC grade로 J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)에서 구입하였고, *p*-coumaric acid, caffeic acid 및 나머지 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

추출물의 제조법

본 연구에 사용한 조팝나무의 뿌리는 장미과(Rosaceae)에 속하는 *Spiraea prunifolia* f. *simpliciflora* Nakai로서 충북 충주 시에서 채취하였으며, 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수님의 식물학적 동정을 거쳤으며, 실험에 사용한 시료의 확정표본(표본번호 TKM2092-W)은 한약진흥재단 한약자원본부에 보관하고 있다.

조팝나무의 뿌리는 수세 후 50℃로 열풍건조기를 이용하여 일주일간 건조한 뒤 분쇄기를 이용하여 분쇄하고, 증류수 또는 메탄올을 칭량한 시료 무게의 10배를 넣고 환류 냉각으로 3시간, 3회 반복하여 추출하였다(증류수: 100℃, 메탄올: 70℃). 열수 추출물은 Whatman 여과지를 이용하여 여과하고, 여과액을 동결 건조하여 시료를 실험 목적에 맞춰서 PBS에 녹여 실험 직전까지 -70℃에 보관하였다가 사용하였다.

조팝나무 뿌리 추출물의 LC IT TOF MS 분석

환류 추출한 조팝나무 뿌리를 syringe filter (0.2 μm, Adventec, Japan)를 이용하여 필터 한 후 실험에 이용하였다. 성분 분석을 위해 LC-20AD pump, CTO-20A column oven, DGU-20A3 degasser, SPD-20A UV detector, SIL-20AC autoinjector로 구성된 UFLC XR (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용하였고, ESI interface를 통해 hybrid IT TOF mass spectrometer (Shimadzu LCMS-IT-TOF, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석 용매는 0.1% formic acid를 포함한 정제수(용매 A)와 acetonitrile(용매 B)를 사용하였고, column은 BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1×150 mm)를 사용하였으며, 분석 시 column 온도는 40℃로 설정하였다. 이동상 조건은 A:B=95:5 (0 min)에서 A:B=50:50 (30 min), 0.21 ml/min 유속으로 320 nm에서 분석하였다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하여 Folin과 Denis (1912)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 농도별 시료에 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 각각 160 μl를 첨가한 뒤 혼합하여 3분간 상온에서 반응시킨 뒤 10% Na₂CO₃ 용액을 160 μl를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 그 뒤 10,000 rpm, 10분 동안 원심분리하였으며 상등액을 이용하여 750 nm 파장에서 microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준물질의 검량선 작성을 위해 gallic acid를 사용하였다.

플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 96 well plate에 농도별 시료 10 μl에 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 각각 4 μl씩, methanol 82 μl를 첨가한 뒤 40분간 암소 반응 한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며(Infinite 200 pro), 표준물질의 검량선 작성을 위해 rutin을 이용하였다(Moreno *et al.*, 2000).

DPPH 라디칼 소거활성능 측정

시료의 전자 공여능은 Blois (1958) 방법에 근거하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 자유 유리기 소거법에 따라 측정하였다. 시료 100 μl 에 0.2 mM DPPH 용액 100 μl 를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader (Infinite 200 pro)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거활성능 측정

7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 물에 녹여 ABTS 라디칼을 형성시키기 위해 1:1 비율로 섞은 뒤 암실에 12 시간 동안 보관하였다. ABTS 용액은 용액의 흡광도가 0.7-0.8 이 되도록 희석한 뒤 실험에 사용하였다. 여러 농도의 시료 50 μl 와 ABTS 용액 100 μl 를 첨가하여 20분 후에 734 nm에서 microplate reader (Infinite 200 pro)를 사용하여 흡광도를 측정하였다(Pellegrini *et al.*, 1999).

SOD 유사활성도 측정

SOD 유사 활성도 측정은 SOD assay kit-WST를 이용하여 측정하였다. 각 시료 추출물을 20 μl 와 WST working solution 200 μl 를 섞은 후 다시 Enzyme solution 20 μl 를 넣어 혼합한 후 37°C incubator에서 20분간 반응시키고 microplate reader (Infinite 200 pro)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양

한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 RAW 264.7 세포는 분양받아 사용하였으며, DMEM에 10% FBS, 1% P/S를 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 독성 평가

시료의 세포 독성을 평가하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 96 well plate에 well 당 30,000 cells로 분주하여 24시간 안정시킨 뒤 시료를 농도별로 처리한 후 다시 24시간 배양하였다. Well 당 10 μl 의 MTS 용해액을 첨가한 뒤 37°C에서 3시간 배양한 후 microplate reader (Infinite 200 pro)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

H₂O₂에 의한 세포의 손상으로부터 면역세포보호 효과 측정

세포를 96 well plates에 30,000 cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하여 안정화 시켰다. 시료를 처리하고 30분 후

H₂O₂ 500 μM 를 첨가하고 24시간 더 배양한 후 MTS assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

LPS로 유도된 면역세포에서 Nitric oxide (NO) 농도 측정

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서 조팝나무 뿌리 열수 추출물 시료의 NO 생성 억제력을 측정하기 위해 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 96 well plate에 well 당 30,000 cells로 분주하여 안정화시킨 뒤 시료를 농도별로 전처리하고 LPS를 500 ng/ml 농도로 처리한 뒤 24시간 세포 배양 후 griess reagent system를 이용하여 NO를 측정하였다. 96 well plate에 동량의 세포 배양 상등액과 griess reagent (1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)를 혼합하여 넣고 10분간 반응시킨 뒤 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Jang *et al.*, 2016).

유세포 분석기를 이용한 ROS 측정

활성산소와 반응하여 형광을 발산하는 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCF-DA)를 이용하여 세포 내에서 발생하는 활성산소의 정도를 유세포분석기(Flow Cytometry, BD Biosciences, Billerica, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 3회 반복 측정하여 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D)로 나타내었으며, SPSS (Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원 변량 분석(one way ANOVA)을 실시 한 후 Student's t-test로 분석하여 유의성을 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

추출 용매에 따른 조팝나무의 성분분석

조팝나무 뿌리에서 열수 및 메탄올 추출물의 주요 성분 차이를 비교하기 위하여 LC IT TOF MS를 이용하여 분석하였다. 그 결과 열수 추출물의 주요 피크들(retention time 10.75 min, 12.11 min, 14.79 min)에서 각각 383.13 [M+H]⁺, 181.05 [M+H]⁺, 165.05 [M+H]⁺의 분자량이 검출되었다. 선행연구 결과(Yean *et al.*, 2014)를 토대로 retention time 12.11 min, 14.79 min의 피크들을 각각 caffeic acid와 *p*-coumaric acid로 추정하였으며, retention time 10.75 min는 동정하지 못하였다. 표준품과

retention time 및 분자량을 비교하여 retention time 12.11 min, 14.79 min의 피크들은 caffeic acid와 *p*-coumaric acid 임을 확인하였다. 조팝나무 메탄올 추출물의 chromatogram은 열수 추출물과 다른 양상을 보였으며, 열수 추출물에서 검출되지 않은 저극성 물질들(retention time 15.91~22.88 min)이 다수 검출되었다(Fig. 1).

조팝나무 뿌리 열수추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀은 식물계에서 널리 분포되어있는 화합물로, 식물의 2차 대사로 형성되며 다양한 구조와 분자량을 가지고 있다. 폴리페놀은 OH 기를 가지고 있어 거대 분자들과 쉽게 결합하는 특징을 가지며, 탄닌과 리그닌, 플라보노이드 등으로 분류된다. 플라보노이드는 대표적인 폴리페놀 중 하나로 사람이 먹는 식품에 널리 분포되어 있으며, 항염증, 항암, 항당뇨, 항비만, 항산화 활성과 같은 다양한 생리 활성을 나타낸다(Pandey and Rizvi, 2009). 따라서 조팝나무의 뿌리 열수 추출물에 존재하는 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 각각 gallic acid와 rutin을 기준물질로 하여 측정하였다(Table 1).

폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 56.7 mg/g, 15.7 mg/g으로 나타났다. 최근 Byun *et al.* (2016)의 보고에 따르면 꽃고추의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 34.12 mg/g, 7.5 mg/g으로 나타났으며, 참조팝나무의 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 212 mg/g, 66 mg/g으로 보고되었다(Choi *et al.*, 2016). 본 연구에서 조팝나무가 참조팝나무에 비해 낮은 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 가지는 것으로 확인하였다. 결과적으로 조팝나무가 플라보노이드나 폴리페놀과 같은 생리 활성 물질을 함유하고 있으며 이는 항염증이나 항산화 활성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

조팝나무 뿌리 열수추출물의 자유라디칼 소거능 및 SOD 유사활성도

조팝나무의 뿌리 열수추출물이 가지는 자유라디칼 소거능을 확인하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 assay를 진행하였다. DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로서 짙은 자색을 띠며, 방향족이나 아민류 등에 의해 환원되면서 색이 탈색되는데 이는 여러 종류의 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색하는데 많이 이용되고 있다(Lee *et al.*, 2005). 또한 ABTS는 암소에 potassium

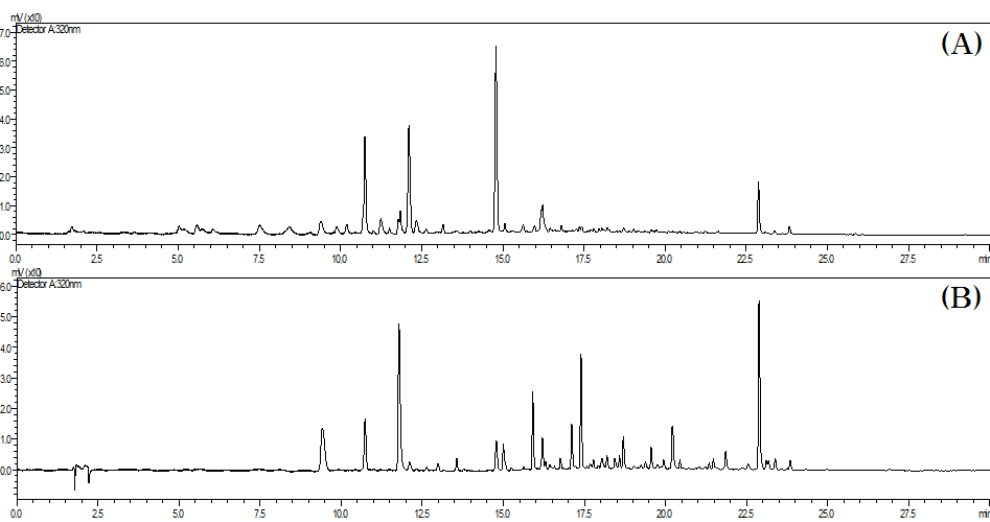


Fig. 1. HPLC chromatogram of SSN (A) Hot water extract, (B) Methanol extract.

Table 1. Polyphenol and flavonoid contents and free radical scavenging activity of SSN²

Polyphenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)	IC ₅₀ of DPPH (μg/ml)	IC ₅₀ of ABTS (μg/ml)	EC ₅₀ of SOD (μg/ml)
56.73 ± 0.21	15.12 ± 1.23	320.23 ± 5.31	124.02 ± 1.28	497.34 ± 2.14

²Each value in the tables is represented as mean ± S.D. (n=9).

persulfate와 함께 방치하면 청록색을 띠는 ABTS^{•+}을 형성하며 이는 다른 천연 추출물의 항산화력에 의해 라디칼이 소거되면서 청록색이 탈색되는 정도로 항산화능을 평가한다(Huang *et al.*, 2012). 본 실험에서 조팝나무의 DPPH와 ABTS 라디칼의 50% 저해율을 보이는 농도는 각각 320.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 124.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다(Table 1).

SOD (superoxide dismutase)는 체내에 존재하는 항산화 효소 중 하나로, 체내 산화적 손상의 원인인 자유라디칼과 반응하여 hydrogen peroxide와 O₂로 전환시키는 효소이다. 또한 체내 활성산소가 과다 생성되면 다른 항산화제보다 SOD가 자유라디칼의 제거에 우수한 효과를 나타내기 때문에 활성산소와 SOD 반응의 특이성은 라디칼의 관련 여부의 증명 지표로 활용된다(Kim *et al.*, 2014). 조팝나무의 뿌리 열수추출물은 SOD 유사 활성을 500, 250, 125, 62.5, 31.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 56.7, 45.5, 34.4, 25.5, 16.7%로 나타내었다(Table 1). 최근 연구에서 목화 다래 추출물이 1.25 mg/ml 농도에서 16.4%의 SOD 유사 활성을 가진다고 보고되었으며(Park and Lee, 2013), 이를 본 실험 결과와 비교했을 때 조팝나무가 목화 다래 추출물에 비해 높은 SOD 유사 활성을 보이는 것으로 확인하였다. 따라서 조팝나무는 DPPH, ABTS 등의 라디칼을 소거하고 SOD 유사 활성을 높여 항산화능을 보였으며 이는 조팝나무가 천연 항산화제로서 이용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

H₂O₂로 유도된 RAW264.7 세포에서 조팝나무 뿌리 열수추출물의 산화적 스트레스 보호효과

MTS assay를 이용하여 조팝나무의 뿌리 열수 추출물이 미치는 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 농도별로 추출물을 처리하여 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 2). 조팝나무 추출물을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 모든 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 보였고 통계적으로 유의성 있는 차이가 관찰되지 않아 안전한 농도인 것으로 판단하였다.

ROS는 산화적 스트레스의 주요한 원인 중 하나로 대사과정이나 세포질 내 효소작용에 의해 내부로부터 형성되거나 다양한 외부 요소에 의해 형성된다. 과도한 ROS의 생성은 생체 내 조직에 변형을 일으키고 손상을 주어 여러 대사과정 및 생화학적 변화를 일으키는 원인 물질이다. 각 세포마다 ROS 축적과 손상에 대항하기 위해 항산화 방어 기전을 갖추고 있지만, 산화와 항산화 시스템이 균형을 이루지 못할 때 산화적 스트레스에 노출되게 된다(Aiyegoro and Okoh, 2010).

조팝나무 뿌리의 열수추출물이 가지는 세포 보호능을 확인하기 위해 H₂O₂를 RAW 264.7세포에 처리하여 세포독성을 유발시켰으며 이를 조팝나무 추출물이 완화시키는 것을 확인하였다(Fig. 3). 또한, 조팝나무 뿌리 열수추출물이 RAW 264.7세포에

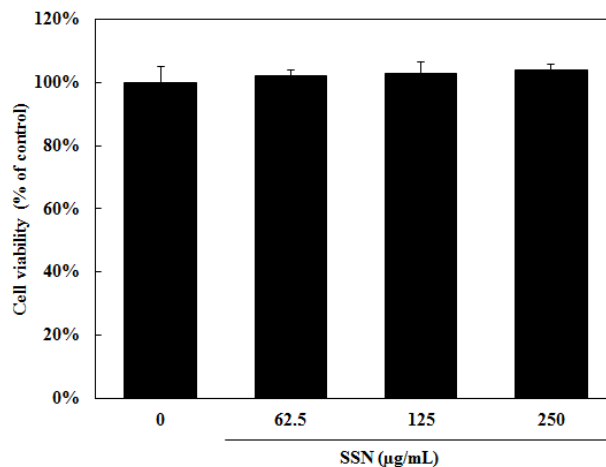


Fig. 2. Effect of SSN on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated for 24 hours in the presence or absence of SSN at indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. Data are presented as the mean \pm S.D. (n=9). Significant differences between SSN treated groups were determined compared to the SSN non-treated group using the Student's t-test ($p < 0.05$).

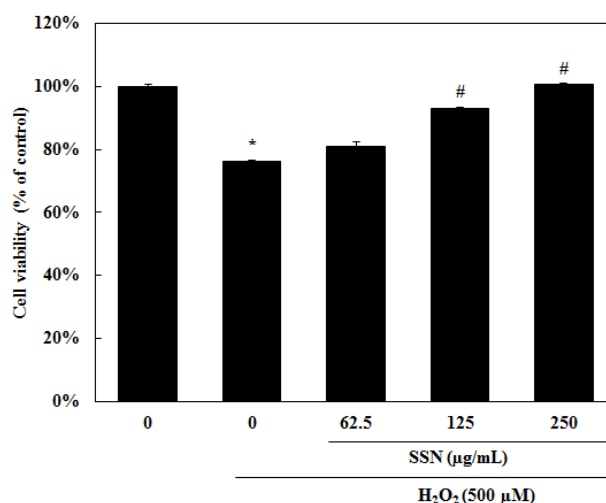


Fig. 3. Cytoprotection of SSN against H₂O₂ in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with indicated concentrations of GNE for 60 min then exposed to H₂O₂ for 24h. Data are presented as the mean \pm S.D. (n=9). * $p < 0.05$ compared with the control group, # $p < 0.05$ compared with the H₂O₂-treated group.

서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스를 ROS 생성을 억제함에 따라 세포보호효과가 있는 것을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 본 연구에서는 조팝나무의 추출물이 자유라디칼을 직접적으로 소거하고, H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스를 완화시킴에 따라 천연물 유래 항산화제로서의 가치를 확인하였다.

LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 조팝나무 뿌리 열수추출물이 NO 생성 억제에 미치는 영향

Nitric oxide synthase (NOS)는 L-arginine을 기질로 하여 NO를 생성한다. 이렇게 형성된 NO는 체내 다양한 생리 기능을

나타내며 대표적인 기능으로는 체내 방어 기능, 혈소판 억제, 면역조절, 신경전달, 혈관확장 등이 있다. 하지만 과도한 NO의 증가는 염증성 질환을 발생시키며, 세포와 조직에 산화적 손상을 일으켜 유전자 변이, 신경 손상 등을 초래하기 때문에 NO 생성의 억제는 염증 관련 질환의 발병을 저해시킬 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있다(Kwak and Choi, 2015; Yi *et al.*, 2017). 본 연구에서는 조팝나무의 뿌리 열수추출물이 미치는 항염증 활성을 측정하기 위하여 먼저 LPS로 전 처리한 RAW264.7 세포에 조팝나무를 농도별로 처리한 후 염증 매개인자인 NO 생성 정도를 정량하였다(Fig. 5). 그 결과 추출물을 처리하였을 때 농도

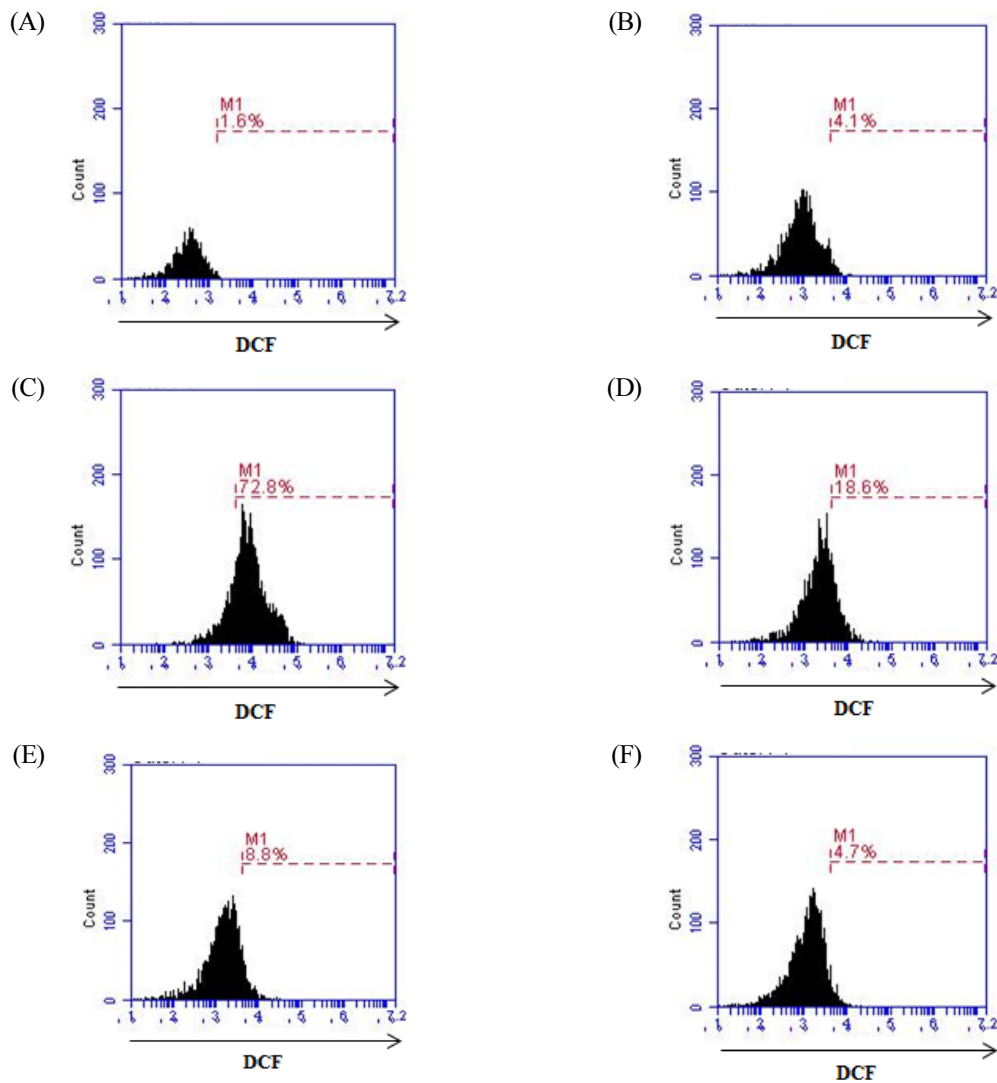


Fig. 4. Effect of SSN on intracellular ROS accumulation in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 were pre-treated with DCFH-DA for 30 min, followed by the indicated concentration of SSN and 1 mM of H₂O₂ treatment for 3h incubation. Levels of intracellular ROS were measured by flow cytometry. (A) Unstaining, (B) Control, (C) only H₂O₂-treated cells, (D) H₂O₂-treated with SSN 62.5 µg/ml, (E) H₂O₂-treated with SSN 125 µg/ml, (F) H₂O₂-treated with SSN 250 µg/ml.

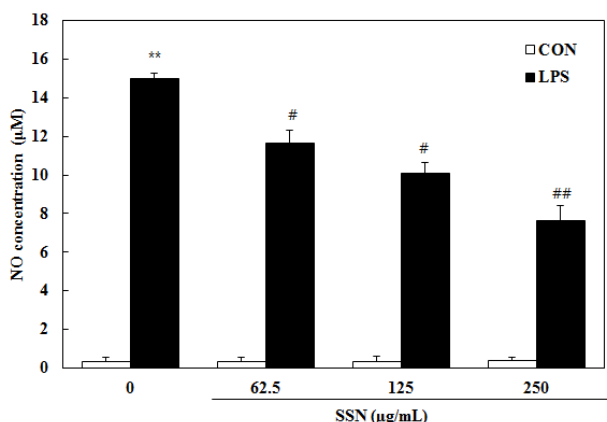


Fig. 5. Effect of SSN on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with SSN for 30 minutes and LPS (500 ng/mL) for 24 hours. Data were presented Means ± SD from triplicate separated experiments. Significant differences between groups were determined by the Student's t-test. ** p < 0.01 compared with the control group. # p < 0.05, ## p < 0.01 compared with the LPS-treated group.

의존적으로 NO의 생성이 억제되었다. 따라서, 본 연구결과에서는 조팝나무의 뿌리 열수추출물이 천연물 유래 항염증 물질로의 이용가능성을 확인하였다.

적 요

본 연구에서는 LC IT TOF MS를 이용하여 조팝나무 뿌리의 열수 추출물과 메탄올 추출물을 분석하였다. 그 결과, 열수 추출물에서 caffeic acid와 p-coumaric acid가 주성분으로 검출되었으나, 메탄올 추출물에서는 열수 추출물에서 검출되지 않은 저극성 물질들이 다수 검출되었다. 조팝나무 메탄올 추출물의 항산화 및 항염증에 대한 연구는 보고된바가 있으나, 열수추출물에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 조팝나무 뿌리 열수 추출물(SSN)의 항산화활성 및 항염증 활성을 탐색하고자 하였다. 먼저 항염증 활성을 탐색하기 위해 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 NO함량을 측정하였다. SSN은 LPS로 유도한 염증반응에서 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 다음으로, 항산화활성을 측정하기 위해 DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 SOD 유사활성을 측정한 결과 SSN은 강한 유리라디칼 저해능을 나타냈으며, 이는 SSN이 폴리페놀(56.7 mg/g)과 플라보노이드(15.1 mg/g)와 같은 생리활성 물질을 함유하고 있어 강

한 항산화능을 가지는 것으로 사료된다. 또한, 대식세포에서 H₂O₂로 유도한 세포독성을 완화시켰으며, 세포내 ROS 생성을 억제함에 따라 천연물 유래 항산화제로서의 가치를 확인하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 SSN이 항산화와 항염증 효과와 관련된 건강보조식품 및 기능성화장품 소재로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 보건복지부 한국 토종자원의 한약재 기반구축사업의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Aiyegoro, O.A. and A.I. Okoh. 2010. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium*. DC. BMC Complement Altern. Med. 10:21-6882-10-21.
- Bae, J.Y., C.H. Lee, M.J. Ahn and J.H. Park. 2012. Pharmacognostical studies on the folk medicine. "JoPabNaMu" Kor. J. Pharmacogn. 43:193-197 (in Korean).
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1200.
- Byun, E.B., W.Y. Park, D.H. Ahn, Y.C. Yoo, C. Park, B.S. Jang, W.J. Park, E.H. Byun and N.Y. Sung. 2016. Comparison study of three varieties of red peppers in terms of total polyphenol, total flavonoid contents, and antioxidant activities. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 45:765-770 (in Korean).
- Carocho, M. and I.C. Ferreira. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem. Toxicol. 51:15-25.
- Choi, E.Y., S.I. Heo, Y.S. Kwon and M.J. Kim. 2016. Antioxidant activity and anti-inflammatory effects of *Spiraea fritschiana* Schneid extract. Korean J. Medicinal. Crop. Sci. 24:31-37 (in Korean).
- Dhalla, N.S., R.M. Temsah and T. Netticadan. 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J. Hypertens. 18:655-673.
- Ferreira, I.C., L. Barros and R.M. Abreu. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. Curr. Med. Chem. 16:1543-1560.
- Folin, O. and W. Denis. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12:

- 239-243.
- Huang, H., T. Chang, L. Chang, H. Wang, K. Yih, W. Hsieh and T. Chang. 2012. Inhibition of melanogenesis versus antioxidant properties of essential oil extracted from leaves of *Vitex negundo* Linn and chemical composition analysis by GC-MS. *Molecules* 17:3902-3916.
- Jang, J.H., H.K. Jung, J.H. Ko, M.O. Sim, K.Y. Woo, T.M. Kim, K.H. Lee, H.W. Jo, J.H. Cho and W.S. Jung. 2016. Anti-inflammatory effect of *Sedum takesimensense* Nakai water extract in RAW 264.7 cells. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 24:228-236 (in Korean).
- Jenner, P. 2007 Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb. Clin. Neuro.* 83:507-520.
- Kim, J.Y., S.Y. Kim, H.M. Kwon, C.H. Kim, S.J. Lee, S.C. Park and K.H. Kim. 2014. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity on chestnut, chestnut shell and leaves of *Castanea crenata* extracts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 22:8-16 (in Korean).
- Kim, S.H., J.H. Choi, H.T. Oh, M.J. Chung, C.B. Cui and S.S. Ham. 2008. Cytoprotective effect of antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40:696-701 (in Korean).
- Kim, S.M., J.H. Park, H.O. Boo, S.G. Song and H.Y. Park. 2017. *In vitro* comparison of biological activities of solvent fraction extracts from *Orostachys japonicus*. *Korean J. Plant Res.* 30:133-143 (in Korean).
- Kwak, C.S. and H.I. Choi. 2015. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract and sequential fractions of flowers of *Prunus persica* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44:1439-1449 (in Korean).
- Kwon, J.W., E.J. Lee, Y.C. Kim, H.S. Lee and T.O. Kwon. 2008. Screening of antioxidant activity from medicinal plant extracts. *Korean J. Pharmacogn.* 39:155-163 (in Korean).
- Li, C. and M.H. Wang. 2011. Antioxidant activity of peach blossom extracts. *J. Korean Soc. Apple. Biol. Chem.* 54:46-53 (in Korean).
- Lee, S.O., H.J. Lee, M.H. Yu, G.H. Im and I.S. Lee. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37:233-240 (in Korean).
- Moreno, M.I., M.I. Isla, A.R. Sampietro and M.A. Vattuone. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71:109-114.
- Pandey, K.B. and S.I. Rizvi. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2:270-278.
- Park, H.J. and K.Y. Lee. 2013. Evaluations on antioxidant effect of methanol extract from immature cotton boll. *Korean J. Plant Res.* 24:426-432 (in Korean).
- Park, Y. and J.H. Kim. 2016. Antioxidant activity, total phenolics, vitamin C and sugar content during fruit ripening of five different jujube cultivars. *Korean J. Plant Res.* 29:539-546 (in Korean).
- Pellegrini, N., R. Re, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylenbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Meth. Enzymol.* 299:379-389.
- Rye, J.H., H. Ahn, J.Y. Kim and Y.K. Kim. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phyther. Res.* 17:485-489.
- So, H.S., R. Park, H.M. Oh, H.O. Pae, J.H. Lee, K.Y. Chai, S.Y. Chung and H.T. Chung. 1999. The methanol extract of *Spiraea prunifolia* var. simpliciflora root inhibits the generation of nitric oxide and superoxide in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* 68:209-217.
- Valko, M., C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1-40.
- Yean, M.H., J.S. Kim, S.S. Kang and Y.S. Kim. 2014. A new megastigmane glucoside and three new flavonoid glycosides from *Spiraea prunifolia* var. simpliciflora. *Helv. Chim. Acta.* 97:1123-1131.
- Yi, M.R., C.H. Kang and H.J. Bu. 2017. Anti-inflammatory and tyrosinase inhibition effects of amaranth (*Amaranthus* spp L.) seed extract. *Korean J. Plant Res.* 30:144-151 (in Korean).

(Received 31 March 2017 ; Revised 11 July 2017 ; Accepted 26 July 2017)