

염증유도 RAW264.7 세포와 동물모델에서 구기자와 구기엽의 항염 효능*

배수미¹, 김지은¹, 배은영^{1,2}, 김경아¹, 이선영^{1,2†}

¹충남대학교 식품영양학과, ²충남대학교 천연물소재융합기술센터

Anti-inflammatory effects of fruit and leaf extracts of *Lycium barbarum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells and animal model*

Su-Mi Bae¹, Ji-Eun Kim¹, Eun-Young Bae^{1,2}, Kyung-Ah Kim¹ and Sun Yung Ly^{1,2†}

¹Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Convergence Research Center for Natural Products, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT

Purpose: Medicinal herbs have recently attracted attention as health beneficial foods and source materials for drug development. Recent studies have demonstrated that extracts of *Lycium's* fruits and roots have a range of physiologically active substances. The extract of *Lycium's* leaves has been reported to have excellent anti-oxidant and anti-microbial activity, but its anti-inflammatory efficacy is not known. The chlorophyll present in the leaves can act as an anti-oxidant or pro-oxidant depending on the presence of light. Therefore, this study analyzed the anti-inflammatory effects of *Lycium's* fruit extract (LFE), leaf extract (LLE), and leaf extract with chlorophyll removal (LLE with CR). **Methods:** This study examined the inhibitory effects of LFE, LLE, and LLE with CR on pro-inflammatory mediator production as well as on the expression of iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells and BALB/c mice. **Results:** LFE, LLE, and LLE with CR inhibited the production of pro-inflammatory mediators (NO, TNF- α , IL-6, and IL-1 β) and the expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells in a dose-dependent manner. Furthermore, the administration of LLE and LLE with CR inhibited the serum pro-inflammatory cytokine levels and suppressed DNA damage in BALB/c mice. In particular, LLE with CR exhibited the highest anti-inflammatory activity. **Conclusion:** These results suggest that the fruit and leaves of *Lycium* are potential therapeutic agents against inflammation.

KEY WORDS: *Lycium barbarum*, chlorophyll removal, anti-inflammation

서 론

염증은 외부 자극이나 조직 손상에 대한 생체 조직의 면역반응으로, 다양한 면역세포에 의해 진행되는 복합적인 과정이다. 그러나 과도한 염증반응은 중양 및 만성염증질환의 원인이 되기 때문에 인체에서 염증반응에 대한 적절한 대응은 질병의 예방이나 발생과 깊은 관련성이 있다 [1-2]. 염증반응은 대식세포와 같은 면역 세포가 바이러스나 병원균 등의 외부 물질에 반응하여 식작용 (phagocytosis) 을 하거나 염증매개물질들을 분비하여 이들을 제거하는 과정을 포함한다 [3]. 대식세포의 기능은 선천 및 후천 면

역반응에서 매우 중요하고 lipopolysaccharide (LPS)의 자극에 의해 활성화되어 염증반응에 관여하면서 nitric oxide (NO), prostaglandin E2, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β 등의 염증매개물질을 생성하게 된다 [4-5]. 내독소로 알려진 LPS는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하여, 대식세포에서 세포 내 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 유전자 발현을 유도함으로써 궁극적으로 염증매개물질을 생성한다 [6]. 따라서 염증매개물질을 생성하는 효소의 발현을 저해하거나, 유전자의 발현에 있어 주요 신호전달 역할을

Received: November 26, 2018 / Revised: January 31, 2019 / Accepted: February 12, 2019

* This study was supported by grants from the Basic Science Research Program of the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology, Republic of Korea (NRF-2017R1D1A3B03028628).

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-42-821-6838, e-mail: sunly@cnu.ac.kr

© 2019 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하는 전사인자들의 활성을 조절하는 물질은 항염증제로써 활용 가능성이 높다. 현대사회에서는 다양한 스테로이드성 및 비스테로이드성 약제가 항염증제로 이용되고 있지만 이로 인해 발생하는 여러 가지 부작용이 사회적 문제로 대두되고 있음에 따라 최근에는 부작용을 줄일 수 있는 천연물 유래 항염증 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

구기자나무는 중국, 일본, 한국, 동남아시아 및 유럽의 아열대 지역에 널리 분포되어 자라는 낙엽송 소목으로, 열매를 구기자, 잎을 구기엽, 뿌리껍질을 지골피라 부르고, 부위별로 각각의 효능을 달리하여 약용으로 이용된다 [7-8]. 구기자나무의 약리작용에 관해서는 Zhang 등 [7]의 산화적 스트레스에 의한 간독성에서 열매 추출물의 세포 보호 효과, Xiao 등 [9]의 사염화탄소 유발 간독성에 대한 열매 추출물의 보호 효과 등이 보고되어 있고, Chen 등 [10]은 에탄올로 위궤양을 유발한 동물에서 뿌리껍질 추출물이 위 보호 효과가 있음을 보고하였다. 그 외에 항산화, 항고지혈증 및 혈당 강하의 특성을 나타내는 것으로 보고되었다 [11]. 그러나 지금까지의 연구는 구기자 및 뿌리껍질의 영양학적 특성 및 추출물에 관한 생리활성 연구가 대부분이었고, 구기엽의 항염 효능에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 구기엽은 폴리페놀을 함유하여 항산화 및 항균 활성이 높다고 [12-13] 알려져 있지만 염록소로 인해 가공식품 및 화장품 소재로의 활용에 상당히 제한적이다. 또한 식물에 존재하는 색소인 클로로필 (chlorophyll)의 산화촉진과 항산화 특성은 감광 여부에 달려 있어서 빛이 없을 때는 클로로필과 그 유도체가 항산화 물질로 작용하지만 빛 아래에서는 광증감제로써 산화촉진제 (pro-oxidant)의 역할을 한다 [14]. 이러한 한계를 극복하기 위해 구아바나 그라비올라 등의 녹엽 추출물에서 클로로필을 제거한 후에 수행한 연구 결과들이 보고되고 있다 [15-16].

본 연구에서는 구기자, 구기엽과 클로로필을 제거한 구기엽 추출물들의 항염증 효과를 확인하고 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 구기자와 구기엽 추출물의 항염증 효과를 비교한 후 효능이 더 높은 추출물의 항염증 효과를 동물모델에서 확인하였다.

연구방법

구기자 및 구기엽 추출물의 제조

본 실험에 사용한 구기자와 구기엽은 중국 북서부의 Ningxia Hui 자치구에서 재배된 영하구기자 (*Lycium barbarum L.*)의 열매와 어린잎으로 구기자는 9~10월에, 구기엽은 3~5월에 수확하여 건조한 것을 Zaokang Goji Berry Inc. (Yinchuan, Ningxia, China)로부터 구입하여 사용

하였다. 건조 구기자 및 구기엽을 각각 100 g씩 계량하여 중량의 8배수가 되도록 100% 주정을 가하여 70°C에서 3 시간 동안 3회 반복 교반 추출하였다. 추출액은 여과지 (Advantec No.3, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 여과한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압 농축하였다. 또한 본 실험에서는 클로로필에 의한 간섭효과를 배제하기 위해 구기엽에 함유된 클로로필을 제거한 시료도 제조하였다. 구기엽에 함유된 클로로필은 구기엽 추출추출물에 100% 클로로포름 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 가하여 클로로필을 침전시키고, charcoal column을 사용하여 1차로 색소를 제거한 후 silica gel column chromatography를 사용하여 최종적으로 클로로필을 제거하였다. 시료는 구기자 추출물 (LFE), 구기엽 추출물 (LLE), 클로로필을 제거한 구기엽 추출물 (LLE with CR)으로 구분하였다. 모든 시료는 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 구기엽 추출물과 클로로필 제거 구기엽 추출물의 수율, 클로로필 함량, 총 폴리페놀 함량은 전보와 같다 [17]. 수율은 각각 20.5%와 16.4%였으며 클로로필 함량은 각각 1194.6 µg/kg과 1.7 µg/kg, 총 폴리페놀 함량은 각각 140.5 mg gallic acid equivalent (GAE)/extract g과 312.9 mg GAE/extract g이었다.

세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 RAW264.7 대식세포주로서 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW264.7 세포의 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Mordialloc, Victoria, Australia)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco)을 사용하였으며, 세포 배양은 37°C, 5% CO₂조건의 배양기 (BB15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 실시하였다.

세포 독성 측정

각 추출물들의 세포독성을 알아보기 위하여 water soluble tetrazolium salts (WST)를 사용하여 cell proliferation을 측정하였다. RAW264.7 세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 96-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 농도별 추출물 (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL)과 1 µg/mL 농도의 LPS (Sigma-Aldrich Co.)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 EZ-Cytox WST assay reagent (Dogenbio Co., Ltd., Seoul, Korea)을 첨가한 후, ELISA reader (Microplate absorbance spectrophotometer, Bio-Rad Labora-

tories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 세포 생존율은 대조군의 세포 생존율 대비 백분율 (%)로 나타내었다.

Nitric oxides (NO) 및 염증성 사이토카인 생성량 측정

RAW264.7 세포를 4×10^5 cells/mL의 농도로 48-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 농도별 추출물 (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$)과 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 일정량의 세포배양액을 취하여 동량의 Griess reagent (Promega, Madison, WI, USA)과 혼합하여 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포로부터 생성된 NO의 함량은 sodium nitrite (NaNO_2)를 사용하여 작성한 표준곡선을 이용하여 산출하였다. 세포배양액 내의 TNF- α 와 IL-6의 생성량은 mouse ELISA kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여, IL-1 β 의 생성량은 mouse ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 각 검량곡선을 바탕으로 염증성 사이토카인들의 생성량을 산출하였다.

Western blot analysis

LFE 및 LLE, LLE with CR 추출물들이 세포질 내에 생성되는 iNOS, COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot을 실시하였다. RAW264.7 세포를 2.5×10^5 cell/mL 농도로 6-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 농도별 추출물 (125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$)과 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 RAW264.7 세포를 cold-PBS (phosphate buffered saline; iNtRON Biotechnology Inc., Gyeonggi-do, Korea)로 세척한 후, protease inhibitor (Roche, Mannheim, Germany)와 phosphatase inhibitor (Roche)가 포함된 lysis buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 가하여 lysis 시킨 후 15,000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 단백질을 추출하였다. Bradford reagent (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 단백질의 농도를 정량하고 lysate에 sample buffer (Elpisbiotech Inc., Daejeon, Korea)를 넣고 95°C에서 10분간 불활성화 시켰다. 단백질을 50 μg 을 10% SDS-PAGE (polyacrylamide gel)로 분리한 뒤, 분리된 단백질은 300 mA에서 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-rad)에 1시간 30분 동안 transfer하고 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2의 발현량을 확인하기 위한 1차 항체로는 anti-rabbit iNOS, COX-2 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)를 사용하였고

1:1,000의 비율로 희석하여 4°C에서 12시간 정치한 후 tris buffered saline Tween-20 (TBS-T)로 3회 세척하였다. 2차 항체로 horseradish peroxidase가 결합된 anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology Inc.)를 1:2,000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS-T로 3회 세척하였다. 이후 Ezwestlumi-plus (ATTO Co., Tokyo, Japan)를 처리한 membrane의 단백질 밴드를 Chemiluminescent Imaging System (LuminoGraph II, ATTO Co.)을 이용하여 가시화하였고, band intensity의 정량화는 CS Analyzer 4 (ATTO Co.)를 이용하였다.

동물실험

RAW264.7 세포에서 LFE 및 LLE, LLE with CR 추출물들의 실험결과를 바탕으로 LFE 추출물보다 LLE, LLE with CR 추출물의 항염증 효과가 우수하였으므로 구기엽 추출물만을 이용하여 LPS로 염증을 유발한 동물모델에서 추출물들의 항염증 효과를 확인하고자 하였다. 실험의 protocol은 BALB/c mouse에 내독소 LPS를 주입한 후 실험동물의 혈장에서 TNF- α , IFN- γ , IL-6의 생성이 증가하였다고 보고한 Ko 등 [18]와 Cho 등 [19]의 연구에 기초하였다. 본 실험에서는 8주령의 BALB/c계 수컷 mouse 12마리를 (주)중앙실험동물 (Seoul, Korea)로부터 분양 받아 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 로 자동 조절되는 micro ventilation caging system에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육 기간 동안 일반 고형사료와 물은 제한없이 공급하였고, 동물실험 전과 후에 실험동물의 체중을 측정하였다. 평균 체중 24.70 ± 1.44 g인 실험동물은 군당 3마리씩 정상대조군 (PBS군), LPS 투여군, 실험군 (LLE군, LLE with CR군)으로 분류하여 실험하였다. 정상대조군과 LPS 투여군에는 멸균한 PBS를 각각 100 μL /mouse 투여하였고, LLE군에는 구기엽 추출물, LLE with CR군에는 클로로필을 제거한 구기엽 추출물을 각각 체중 kg당 200 mg의 농도로 PBS에 녹여 100 μL /mouse씩 7일간 경구투여 하였다. 경구투여 후 12시간 절식시킨 실험동물에 정상대조군에는 PBS를, LPS군과 실험군에는 LPS를 체중 kg당 5 mg 농도로 복강주사한 8시간 후에 희생하였다. 실험동물의 하대정맥으로부터 채혈한 혈액의 일부는 전혈 상태로 comet assay에 사용하고 나머지 혈액은 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 동물실험은 충남대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다 (CNU-01030).

혈청 내 염증성 사이토카인 분비량 측정

LPS로 염증반응을 유도한 실험동물의 혈청에서 염증성

사이토카인의 분비량을 확인하였다. 혈청 내의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 분비량은 위의 세포주 실험에서와 동일한 방법을 사용하여 측정하였다.

림프구 DNA fragmentation 분석 (single-cell electrophoresis assay: comet assay)

염증반응으로 산화적 스트레스를 유발시킨 mouse에서 림프구의 DNA 손상을 확인하기 위해 comet assay를 실시하였다. 실험방법은 선행연구인 Tice 등 [20]의 방법을 참고하여 수행하였다. 0.5% normal melting agarose (NMA)가 미리 도포된 comet slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 위에 전혈 5 μ L와 75 μ L 0.75% low melting agarose (LMA)을 혼합한 현탁액을 분주하고 cover glass로 덮어 4°C의 암소에서 10분간 응고시켰다. 이후 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 slide를 담가 4°C의 암소에서 30분간 침지시킴으로써 DNA의 이중나선을 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide는 상온에서 20분간 차가운 electrophoresis buffer (300 mM NaOH; 10 mM Na₂EDTA, pH 13)에 담가 DNA를 unwinding시켰다. 전기영동 chamber에 slide를 넣고 25 V, 300 mA의 전압을 걸어 20분 동안 전기영동을 한 후, Tris buffer (pH 7.5)로 slide를 5분씩 3회 세척하여 중화시킨 다음 95% ethanol에 5분간 침지하여 건조시켰다. DNA 손상정도를 측정하기 위해 20 μ g/mL ethidium bromide로 형광 염색한 후 광학현미경 (light microscope DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였으며, Komet 5.5 image analyzing system (Andor, Nottingham, UK)를 사용하여 분석하였다. DNA 손상정도는 핵으로부터 이동해서 생긴 꼬리 부분에서 떨어져 나간 DNA 비율 (tail DNA), DNA 파편의 길이 (tail length, TL), 그리고 tail DNA와 tail length로부터 산출된 tail moment (TM)으로 나타내었다. 실험동물의 slide당 50개의 DNA를 무작위로 선택하여 관찰하였다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 SPSS program (statistical package for social sciences; ver. 24, IBM Corporation, New York, NY, USA)을 이용하여 분석하였고 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었다. 각 군 간의 평균값에 대한 유의성은 신뢰수준 95% (p < 0.05)에서 one-way ANOVA test를 실시하고 유의한 차이를 검증한 후 사후분석으로 Duncan's multiple range test를 사용하여 검증하였다. 동물실험에서 실험 전후 체중의 차이는 paired t-test로 신뢰수준 95%에서 검증하였다.

결 과

세포생존율

추출물들이 RAW264.7 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해서 WST assay를 수행하였다. 모든 추출물을 31.25 ~ 1,000 μ g/mL의 농도로 24시간 동안 세포에 처리한 결과, 대식세포의 생존율은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으므로 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 1).

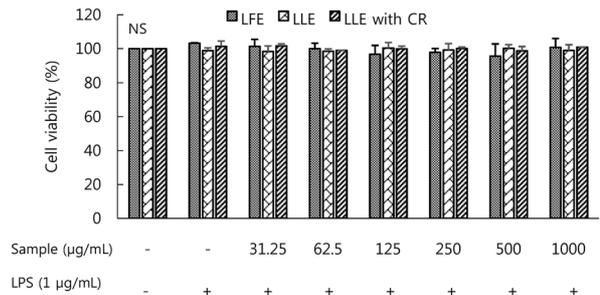


Fig. 1. Effect of Lycium's fruit extracts (LFE) and leaf extracts (LLE), leaf extracts chlorophyll removal (LLE with CR) on cell viability of lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with LFE, LLE, LLE with CR (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/mL), then with or without LPS (1 μ g/mL) for 24 h. The cell proliferation was estimated by the MIT assay with WST system. Each bar represents the mean \pm SD. NS: not significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05).

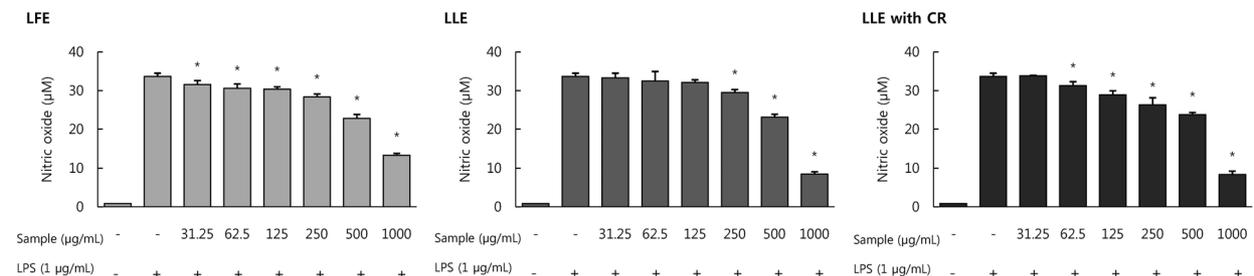


Fig. 2. Effect of Lycium's fruit extracts (LFE) and leaf extracts (LLE), leaf extracts chlorophyll removal (LLE with CR) on the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with LFE, LLE, LLE with CR (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/mL), then with or without LPS (1 μ g/mL) for 24 h. The culture supernatant of the treated cells were used to measure NO level. Levels of nitric oxide were determined by Griess reagent. Each bar represents the mean \pm SD. Significant values are represented by an asterisk (*) (p < 0.05 compared to the group treated with LPS alone).

RAW264.7 세포에서 NO 생성 억제 효과

RAW264.7 세포에서 LFE 및 LLE, LLE with CR 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해서 추출물과 LPS를 동시에 24시간 동안 처리한 세포에서 NO 생성량을 측정하였다 (Fig. 2). NO 생성량은 LPS 처리군에서 33.68 μM , LPS를 처리하지 않은 군에서 0.86 μM 로 약 39배 정도 NO 생성이 증가한 것으로 보아 LPS에 의해 염증반응이 잘 유도된 것을 알 수 있었다. LFE를 처리한 군에서는 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 NO 생성이 유의하게 저해되었으며 ($p < 0.05$) 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 13.37 μM 로서, LPS 단독 처리군에 비해 약 60.3% 저해율을 보였다. LLE과 LLE with CR를 처리한 군은 각각 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 농도 의존적으로 NO 생성이 유의하게 저해되었으며, 두 시료 모두 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 LPS 단독 처리군 대비 약 75%의 저해율을 보였다 (LLE군 8.48 μM , LLE with CR군 8.40 μM , $p < 0.05$). NO 생성 억제 효과는 저농도에서는 구기자 추출물이 구기엽 추출물에 비해 높은 경향을 보여주었으나 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서는 LLE with CR군 > LLE군 > LFE군 순으로 나타났다.

RAW264.7 세포에서 염증성 사이토카인 분비량 억제 효과

LFE 및 LLE, LLE with CR 등의 추출물들이 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증성 사이토카인의 분비에 영향을 줄 수 있는지 알아보려고 실험한 결과는 Fig. 3과 같다. TNF- α 생성량은 LPS 처리 군에서 119.1 ng/mL로 아무것도 처리하지 않은 정상세포 군의 18.7 ng/mL에 비해 약 6배 정도 높아졌으며, LFE 및 LLE, LLE with CR를 LPS와 동시에 처리한 군에서는 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 농도 의존적으로 유의하게 TNF- α 의 생성이 억제되었음을 확인하였다 ($p < 0.05$). 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 LPS 처리군 대비 LFE군은 약 51%, LLE군은 74.8%, LLE with CR군은 77.9%의 저해율을 보였다 (LFE 58.4 ng/mL, LLE 28.8 ng/mL, LLE with CR 26.3 ng/mL). 또한 IL-6 생성량은 LPS 처리 군에서 205.8 ng/mL, LPS를 처리하지 않은 군에서 0.5 ng/mL로 유의하게 증가하였으며, LFE 및 LLE, LLE with CR를 처리하였을 경우에 LFE군은 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도부터, LLE군과 LLE with CR군은 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 유의하게 감소하기 시작하여 이후 농도 의존적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 LPS 처리군 대비 LFE군은 약

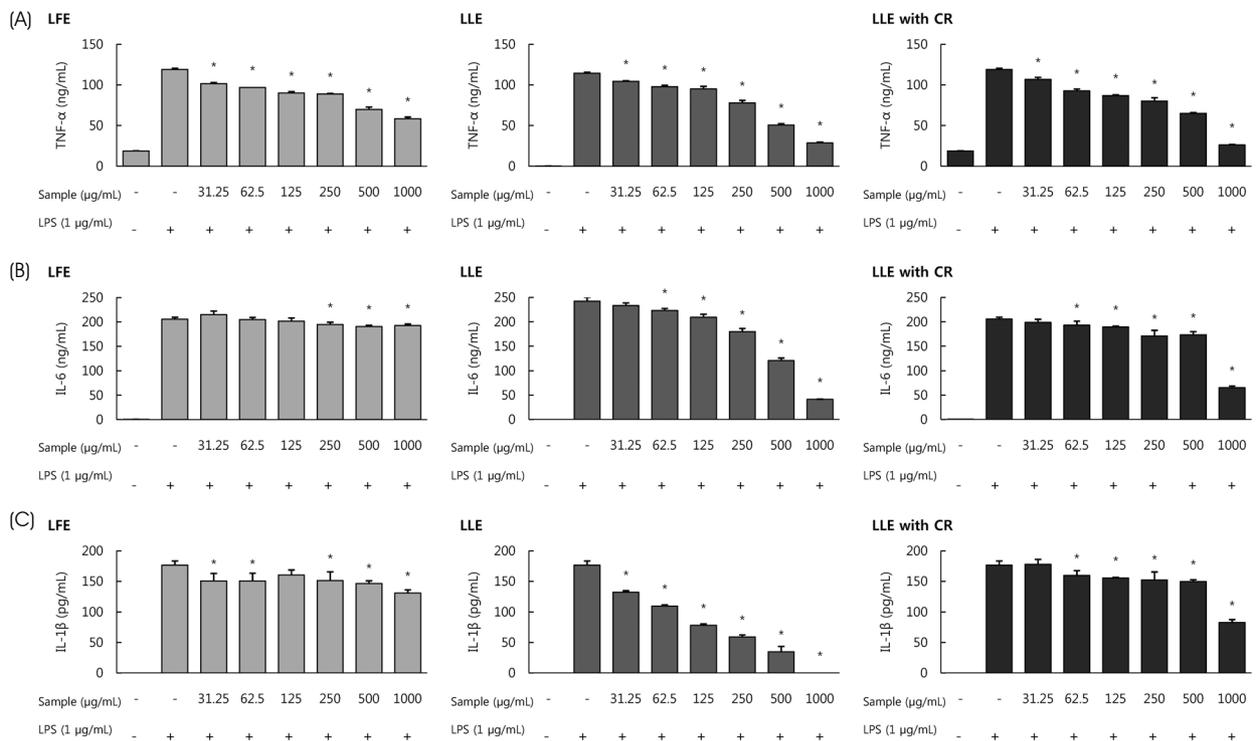


Fig. 3. Effect of Lycium’s fruit extracts (LFE) and leaf extracts (LLE), leaf extracts chlorophyll removal (LLE with CR) on the production of TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with LFE, LLE, LLE with CR (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), then with or without LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The levels of pro-inflammatory cytokines in the cell culture supernatant were determined by ELISA. Each bar represents the mean \pm SD. Significant values are represented by an asterisk (*) ($p < 0.05$ compared to the group treated with LPS alone).

6.4%, LLE군은 83%, LLE with CR군은 68.2%의 저해율을 보였다 (LFE 192.6 ng/mL, LLE군 41.3 ng/mL, LLE with CR군 65.5 ng/mL). 추출물이 IL-1 β 생성량에 미치는 영향은 LPS를 처리한 군에서 IL-1 β 생성량이 177 pg/mL로 증가하였으나, LFE군, LLE군은 31.25 μ g/mL에서부터, LLE with CR군은 62.5 μ g/mL농도에서부터 IL-1 β 생성이 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). LFE 및 LLE with CR를 1,000 μ g/mL로 처리했을 때 IL-1 β 생성량이 LPS 단독 처리군 대비 각각 26%, 53.1% 저해율을 보였고 (LFE 131 pg/mL, LLE with CR 83 pg/mL), LLE군의 경우는 IL-1 β 생성을 LPS를 처리하지 않은 군 수준까지 감소시켰다. IL-1 β 생성에 미치는 효과는 LFE군에 비해 LLE군이 월등히 컸고 LLE with CR군은 LLE군에 비해 억제 효과가 1,000 μ g/mL에서 약 2배 정도 낮았다.

RAW264.7 세포에서 iNOS, COX-2 단백질 발현량 억제 효과

LFE 및 LLE, LLE with CR가 RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통하여 NO와 염증성 사이토카인의 생성을 억제하였는지 알아보기 위하여 western blot을 수행하였다. 그 결과, Fig. 4에 보이는 것처럼 iNOS와 COX-2의 발현량이 LPS를 처리하지 않은 RAW264.7 세포에서는 거의 발현되지 않았지만 LPS 처리군에서는 LPS 자극에 의하여 현저하게 증가함을 확인하

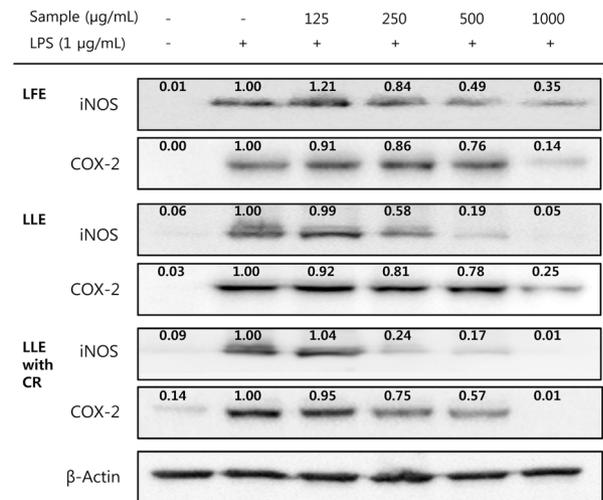


Fig. 4. Effect of Lycium’s fruit extracts (LFE) and leaf extracts (LLE), leaf extracts chlorophyll removal (LLE with CR) on iNOS and COX-2 protein expression in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with LFE, LLE, LLE with CR (125, 250, 500 and 1,000 μ g/mL), then with or without LPS (1 μ g/mL) for 24 h. Cell lysates were used for western blot analysis. The levels of protein expression in iNOS and COX-2 were normalized to the β -actin signals. The relative band intensities are indicated above each band.

였다. LFE군 및 LLE군, LLE with CR군은 LPS에 의해 증가한 iNOS 단백질의 발현을 각각 65%, 95%, 99% 감소시켰고, COX-2 단백질 발현에서 LPS군 대비 LFE군은 86%, LLE군은 75%, LLE with CR군은 99%의 저해율을 보여 iNOS 단백질 발현의 감소와 유사한 경향을 나타내었다.

실험동물의 체중 변화

구기엽 추출물의 경구투여에 따른 실험동물의 체중 변화는 Table 1에 나타내었다. 정상대조군의 체중 변화는 없었고, LPS를 투여한 단독 투여군, LLE 투여군, LLE with CR 투여군에서 각각 4.4%, 4.9%, 6.1% 정도의 체중 감소를 보였다 ($p < 0.05$).

LPS 염증 유도 동물모델에서 구기엽 추출물의 항염증 효과

LPS로 염증 반응을 유도한 실험동물의 혈청에서 TNF- α 와 IL-6, IL-1 β 의 농도를 측정된 결과는 Fig. 5에 나타내었다. LPS 투여 8시간 경과 후 혈청 TNF- α 농도는 LPS 투여군에서 202.05 pg/mL로 정상대조군에 비해 약 200배 정도 증가하여 염증 반응이 잘 유도되었음을 알 수 있었다. 혈청 TNF- α 의 농도를 LPS 단독 투여군과 비교했을 때, LLE군과 LLE with CR군에서 각각 23.1%, 61.1% 저해됨을 확인하였다 (LLE 투여군 155.29 pg/mL, LLE with CR 투여군 78.6 pg/mL). 혈청 IL-6 농도는 LPS 투여군에서 8.37 ng/mL로 정상대조군에 비해 유의하게 증가 하고 있었으나, LLE 투여군은 6.39 ng/mL로 약 23.7%의 감소경향을 보여주었고, LLE with CR 투여군에서는 1.48 ng/mL로서 약 82.3%의 유의한 저해율을 보였다 ($p < 0.05$). 혈청 IL-1 β 농도를 측정된 결과, 구기엽 추출물을 투여했을 때 혈청 IL-1 β 의 생성량이 LPS 단독 투여군 대비 LLE 투여군은

Table 1. Body weight of mice before and after oral administration

Group ¹⁾	Body weight (g)		t-value ⁴⁾
	Before oral administration	After oral administration	
N	24.17 \pm 1.53 ²⁾	23.70 \pm 1.01	1.468 ^{NS3)}
C	24.73 \pm 1.25	23.63 \pm 1.34	19.053 ^{*4)}
LLE	24.57 \pm 2.46	23.37 \pm 2.39	20.785 [*]
LLE with CR	25.37 \pm 0.64	23.83 \pm 0.38	5.890 [*]

1) N (normal), treated with PBS for 8 h; C (control), only treated with LPS 5 mg/kg body weight for 8 h; LLE, treated with Lycium’s leaf extracts (200 mg/kg body weight) for seven days and LPS 5 mg/kg body weight for 8 h; LLE with CR, treated with Lycium’s leaf extracts chlorophyll removal (200 mg/kg body weight) for seven days and LPS 5 mg/kg body weight for 8 h
 2) Values represent mean \pm SD (n = 3).
 3) Not significantly different
 4) $p < 0.05$ for body weight after oral administration vs baseline, paired t-test

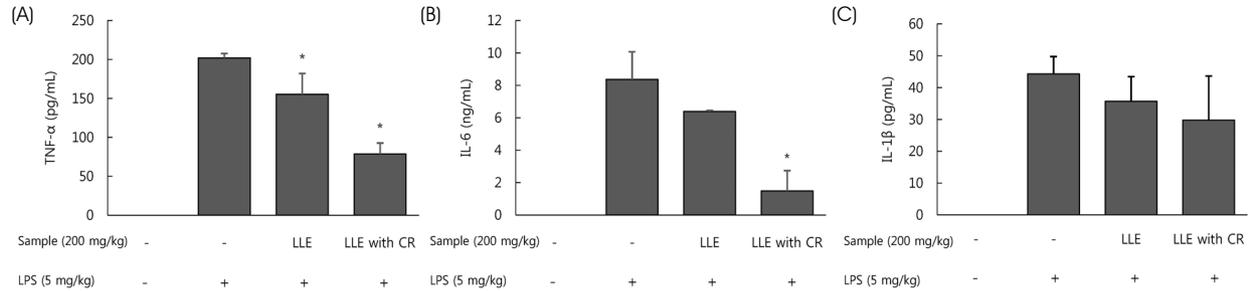


Fig. 5. Effect of Lycium's leaf extracts (LLE), leaf extracts chlorophyll removal (LLE with CR) on the production of serum TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) in LPS-induced BALB/c mice. LLE and LLE with CR (200 mg/kg body weight) was administered orally in mice for seven days, and then challenged intraperitoneally with LPS (5 mg/kg body weight). The levels of pro-inflammatory cytokines in the serum were determined by ELISA. Serum TNF- α , IL-6, IL-1 β levels were analyzed 8 h after the last LPS challenge. Each bar represents the mean \pm SD. Significant values are represented by an asterisk (*) ($p < 0.05$ compared to the group treated with LPS alone).

Table 2. Levels of DNA damage expressed as tail DNA, tail length and tail moment in BALB/c mice lymphocyte

Group ¹⁾	Tail DNA (%)	Tail length (μ m)	Tail moment
N	5.40 \pm 0.65 ^{2)3)a}	10.21 \pm 1.75 ^a	0.82 \pm 0.17 ^a
C	15.64 \pm 5.14 ^b	46.61 \pm 14.17 ^b	9.48 \pm 6.06 ^b
LLE	8.42 \pm 1.40 ^a	20.23 \pm 3.91 ^a	2.29 \pm 0.74 ^a
LLE with CR	8.57 \pm 1.63 ^a	14.77 \pm 1.29 ^a	1.93 \pm 0.42 ^a
F-value	7.176 [*]	14.438 [*]	4.996 [*]

1) N (normal), treated with PBS for 8 h; C (control), only treated with LPS 5 mg/kg body weight for 8 h; LLE, treated with Lycium's leaf extracts (200 mg/kg body weight) for seven days and LPS 5 mg/kg body weight for 8 h; LLE with CR, treated with Lycium's leaf extracts chlorophyll removal (200 mg/kg body weight) for seven days and LPS 5 mg/kg body weight for 8 h

2) Values represent mean \pm SD (n = 3).

3) Means with different letters (a-b) are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

4) * $p < 0.05$

19.4%, LLE with CR 투여군은 32.8% 낮아지는 경향을 보였으나 유의한 차이는 아니었다 (LPS 단독 투여군 44.28 pg/mL LLE 투여군 35.67 pg/mL, LLE with CR 투여군 29.76 pg/mL).

LPS 염증 유도 동물모델에서 구기엽 추출물의 DNA 손상 보호 효과

LLE 및 LLE with CR 추출물들이 염증반응으로 인한 림프구 DNA 손상을 억제시킬 수 있는지 확인하기 위해 comet assay를 실시하였다 (Table 2). 광학현미경으로 염색한 세포핵의 형태를 확인하였을 때 LLE 및 LLE with CR를 투여하고 LPS만 투여한 동물의 림프구 핵은 추출물을 처리하지 않고 LPS만 처리한 양성대조군에 비해 DNA 손상이 유의하게 적었다. Tail DNA, tail length, tail moment의 모든 지표에서 LPS 단독 투여군에 비해 LLE 및 LLE with CR 투여군의 값이 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). LLE 투여군의 tail DNA 8.42%, tail length 20.23 μ m, tail

moment 2.29였고, LLE with CR 투여군에서는 tail DNA 8.57%, tail length 14.77 μ m, tail moment 1.93으로 나타났다.

고 찰

현대사회에서는 다양한 합성 항염증제가 이용되고 있지만 안전성에 관한 문제 때문에 최근에는 다양한 기능성 성분을 함유하고 있는 천연 항염증 소재에 대한 관심이 증가하고, 보다 높은 기능성과 안전성이 요구되는 천연 소재 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 천연 소재이며 항염 활성을 갖는 기능성 소재로 구기엽의 활용 가능성을 탐색하고 구기자와 비교, 검토하고자 하였다. 아울러 식품이나 화장품 소재로 사용할 때 불안정하고 제품의 색상을 어렵게 하는 문제가 있는 구기엽의 클로로필을 제거한 시료의 활성도 비교 검토하였다.

염증 반응은 LPS 자극에 의해 NF- κ B가 활성화 되어 NO 및 염증성 사이토카인 등의 염증매개물질을 분비하는 RAW264.7 대식세포에서 일반적으로 연구된다 [18]. Oh 등 [21]은 구기자 열수 추출물을 세포에 처리한 결과 1,000 μ g/mL 농도까지 독성이 나타나지 않았다고 하여 구기자는 비교적 안전한 추출물이라고 하였다. 본 연구에서도 구기자 및 구기엽 추출물을 대식세포에 처리했을 때 1,000 μ g/mL까지 세포 독성이 없는 것을 확인하였으며, 클로로포름을 이용하여 클로로필을 제거한 구기엽도 같은 농도까지 세포 증식률에 영향이 없는 것을 확인하였다. RAW264.7 세포에 LPS와 구기자 및 구기엽 추출물을 동시에 처리한 후, 주요 염증매개물질인 NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성과 이와 관련된 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 측정하고, 모든 추출물이 NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성을 효과적으로 저해하고 단백질 발현을 억제함을 확인

하였다. 이러한 결과는 RAW264.7 세포에 구기자 및 구기엽 추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 NO 및 TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성이 감소하였다고 보고한 Oh 등 [21]과 Cho 등 [22]의 연구결과와 일치한다. 본 연구결과에서 시료를 처리한 세포의 TNF- α 와 IL-1 β 생성량이 유사한 변화를 보였는데 이는 동일한 세포 내 신호전달경로 및 전사인자를 활성화시키는 기전을 공유하기 때문으로 보인다. IL-1은 TNF와 기능적으로 유사하고 이러한 이유로 TNF의 조절을 받는 많은 유전자들이 다른 사이토카인, 특히 IL-1에 의한 영향을 받는다고 알려져 있다 [23]. 대표적인 염증성 사이토카인 TNF- α 는 면역반응의 초기에 분비되어 염증의 활성화와 세포괴사의 조절에 관여하는 인자로서, 인체에서 TNF- α 의 농도가 증가하면 류마티스 관절염, 크론병과 같은 염증 질환을 유발할 수 있다 [24]. 또한 IL-1 β 는 TNF- α 와 함께 세포 내 신호를 공유하면서 국소 및 전신 염증반응을 매개하고 혈관 내피 세포에 부착 분자(adhesion molecule)의 발현을 통해 염증 세포를 염증 부위로 유도함으로써 염증반응에 중요한 역할을 한다 [25]. IL-6는 체액성 면역과 세포성 면역에 모두 관련되어 신체 방어 및 조직손상에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 [26]. NO는 체내 방어기능, 혈관확장, 신호전달 등 다양한 생리 기능을 가지고 있으며, iNOS는 L-arginine을 L-citrulline으로 전환하면서 NO를 생성하고 이는 다양한 병리작용을 나타낸다 [6]. NO 및 염증성 사이토카인의 생성 억제가 iNOS, COX-2의 단백질 발현과 관련이 있는지 확인한 결과, 구기자 및 구기엽 추출물이 iNOS와 COX-2의 발현에 뚜렷한 억제 효과를 보였다. 이러한 결과는 구기자 및 구기엽 추출물 처리가 iNOS와 COX-2 단백질 발현의 억제를 통하여 NO와 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 인터루킨들의 생성을 억제함으로써 항염 효능을 나타내는 것으로 볼 수 있다.

천연물 소재들의 항산화 및 항염 활성은 함유하고 있는 항산화 물질에 의해 나타나게 되는데 구기자는 다당류와 플라보노이드 및 폴리페놀성 물질을 함유하고 있고 [22, 27], 구기엽에도 폴리페놀 계열인 rutin 등의 플라보노이드를 다량 함유하고 있는 것으로 보고되었다 [12,22]. 다당류와 플라보노이드 및 폴리페놀성 물질은 항산화 및 항염 활성의 주요 요인으로 [27-29], 본 연구에서 확인한 구기자 및 구기엽의 뛰어난 항염 효능은 플라보노이드 및 폴리페놀성 화합물에 의한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 구기엽의 효능평가가 주요 목적이었으므로 구기엽 추출물의 항염 효능을 동물모델에서 확인하였다. 그 결과, 구기엽 추출물 투여 후 LPS 투여군과 추출물을 투여한 군에서 약 5%의 유의한 체중 감소를 보였는데

이는 LPS 투여에 따른 급성 염증 반응에 의한 것으로 사료된다. 또한 LPS와 함께 구기엽 추출물을 7일간 투여한 군들에서 LPS 단독 투여군에 비하여 모든 염증 지표가 감소하여 구기엽 추출물들의 보호 효과를 보여주었다. 이러한 BALB/c mouse 동물모델에서 혈청 염증성 사이토카인 수준의 감소는 RAW264.7 대식세포에서의 결과와 일치하였다. Cho 등 [19]은 BALB/c mice에 LPS를 주사한 결과, 간세포에서 NF- κ B 전사 촉진을 통하여 NF- κ B 활성이 증가하였다는 연구 결과를 발표하였으며 아울러 NF- κ B가 전사 인자로 작용하여 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 유전자 발현을 유도함을 확인하였다 [6]. Chapple [30]에 따르면 LPS 자극으로 활성화된 대식세포는 염증매개물질뿐만 아니라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 과잉 생성하여 염증반응으로 인한 산화적인 스트레스를 증가시킨다고 하였다. 이러한 산화스트레스가 구기엽 추출물 투여로 억제되어 세포 보호 효과를 보임은 DNA fragmentation을 측정할 결과에서 확인할 수 있었다. DNA 손상 억제 효과는 녹색식물에 함유된 단일 물질에 의한 것이 아닌 다양한 생리활성물질에 의한 복합적인 작용의 결과로 보고 있다 [31]. 본 연구의 DNA 손상 억제 효과 역시 구기엽에 함유되어 있는 폴리페놀 외 다양한 생리활성물질에 의한 것으로 볼 수 있다.

한편, 동물모델에서 구기엽 추출물에 비해 클로로필을 제거한 구기엽 추출물에서 더 뛰어난 항염 효능 및 세포 보호 효과가 나타났던 이유는 클로로필 제거 추출물에서 폴리페놀과 같은 항산화 성분의 함량이 높았던데 기인한다고 볼 수 있다. 본 연구실의 선행 연구에서 구기엽 에탄올 추출물과 클로로필 제거 에탄올 추출물의 수율을 살펴본 결과, 구기엽 추출물의 수율은 클로로필 제거로 인해 약 20% 감소하였으며 클로로필 제거 후 총 폴리페놀은 2배 이상 증가하여 구기엽으로부터 클로로필을 제거하는 과정에서 많은 성분들이 제거되었지만 폴리페놀은 오히려 농축된 것으로 사료된다. 이러한 결과는 다른 연구들에서도 보고되었는데 Olatunde 등 [15]은 클로로포름을 용매로 사용하여 구아바 잎 추출물에서 클로로필을 제거하게 되면 항산화 활성이 높아진다고 하였고, Benjakul 등 [32]은 *Leucaena leucocephala* 종자를 대상으로 클로로필을 제거한 후 DPPH, ABTS 라디칼 소거능이 증가하고 철 이온 환원력도 증가하였다고 하였다. Benjakul 등은 클로로필을 제거하면서 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 갖는 화합물의 추출을 용이하게 할 수 있다고 설명하였고, 철 이온 환원력이 증가한 것은 포르피린 고리에 마그네슘이 킬레이트화 된 클로로필의 구조적인 이유로 설명하였다. 이러한 화학적 구조는 항산화 활성을 결정하는 중요한 요인이

고, 클로로필 제거 후에 금속 킬레이션 능력을 가진 화합물이 농축되어 항산화 활성이 더 높아진 것으로 보고 있다. 본 연구에서도 클로로필을 제거하는 과정에서 항산화 활성이 더 높은 폴리페놀성 화합물들이 농축되었을 것으로 생각되며, 구기엽 자체의 생리 활성과 함께 클로로필을 제거하면서 높아지는 항산화 활성으로 인해 클로로필을 제거한 구기엽 추출물이 더 뛰어난 항염 효능 및 세포 보호 효과를 보인 것으로 생각된다.

본 연구결과, 구기엽 추출물은 LPS로 처리한 RAW264.7 세포에서 NO와 TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성을 억제하고 iNOS 및 COX-2의 발현을 저해시켰으며 구기자에 비해서도 그 효과는 낮지 않았다. 또한 구기엽 추출물들 모두 LPS로 염증반응을 유도한 BALB/c 동물모델에서 뛰어난 항염증 및 세포보호 효과를 나타내었다. 따라서 구기엽 추출물과 클로로필 제거 구기엽 추출물들은 항염활성을 보이는 천연소재로서 활용 가능하며 원료 표준화에 대한 연구를 수행한다면 구기자 나무의 부가가치를 높일 수 있을 것이다.

요 약

구기자 나무의 열매와 잎, 클로로필 제거 잎의 에탄올 추출물들의 항염 효능을 확인하여 항염 기능성 소재로의 적용 가능성을 알아보고자 하였다. 효능 측정은 세포단위와 동물실험을 통하여 실시하였다. RAW264.7 세포에서는 LPS와 동시에 추출물 (LFE, LLE, LLE with CR)을 처리한 세포에서 NO와 TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성량 및 iNOS와 COX-2의 발현을 측정하였고, 동물실험에서는 7일간 추출물들 (LLE, LLE with CR)을 경구투여한 BALB/c mice에 LPS를 투여하여 염증을 유도한 후 혈청의 TNF- α , IL-6, IL-1 β 농도와 DNA fragmentation을 측정하였다. RAW264.7 세포에 처리한 추출물들은 모두 1,000 μ g/mL의 농도까지 세포증식능에 영향을 주지 않아 안전한 것으로 확인되었다. LPS와 추출물을 처리한 세포로부터 생성된 NO와 TNF- α , IL-6, IL-1 β 는 모두 유의하게 억제되었고 구기자 추출물에 비하여 구기엽 추출물들의 영향이 더 크게 나타났다 ($p < 0.05$). 또한 세포의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현도 구기자 < 구기엽 < 클로로필 제거 구기엽의 순으로 억제됨을 확인할 수 있었다. BALB/c mice 동물모델에서 구기엽 추출물들의 항염 효능을 측정한 결과, 혈청 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 농도는 구기엽 추출물 및 클로로필 제거 구기엽 추출물 투여군에서 감소하였으며 그 효과는 클로로필 제거 구기엽군에서 더 크게 나타났다. 구기엽 추출물들은 DNA 손상보호효과를 유의하게 보였으나 두 군 간에는

차이가 없었다. 따라서 구기엽 추출물과 클로로필 제거 구기엽 추출물은 항염효능을 가진 천연 소재로 활용되어 기능성 식품 및 화장품 개발에서 활용될 수 있으므로 구기자 나무의 부가가치를 높일 수 있을 것으로 생각된다.

ORCID

배수미: <https://orcid.org/0000-0002-3022-6954>

김지은: <https://orcid.org/0000-0002-2789-7853>

배은영: <https://orcid.org/0000-0003-1844-1296>

김경아: <https://orcid.org/0000-0002-2611-3033>

이선영: <https://orcid.org/0000-0001-6813-8573>

References

- Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12(6): 595-601.
- Isomäki P, Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med* 1997; 29(6): 499-507.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(6): 2046-2050.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 1990; 144(4): 1425-1431.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6(12): 3051-3064.
- Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54(4): 469-487.
- Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Kim AD, Chae S, et al. Cytoprotective effect of the fruits of *Lycium chinense* Miller against oxidative stress-induced hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(2): 299-306.
- Kim TS, Park WJ, Ko SB, Kang MH. Development of extracts of *Lycii folium* having high antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008; 37(10): 1318-1322.
- Xiao J, Liang EC, Ching YP, Chang RC, So KF, Fung ML, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. *J Ethnopharmacol* 2012; 139(2): 462-470.
- Chen H, Olatunji OJ, Zhou Y. Anti-oxidative, anti-secretory and anti-inflammatory activities of the extract from the root bark of *Lycium chinense* (Cortex *Lycii*) against gastric ulcer in mice. *J Nat Med* 2016; 70(3): 610-619.
- Luo Q, Cai Y, Yan J, Sun M, Corke H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci* 2004; 76(2): 137-149.
- Mocan A, Vlase L, Vodnar DC, Bischin C, Hanganu D, Gheldiu

- AM, et al. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Molecules* 2014; 19(7): 10056-10073.
13. Liu SC, Lin JT, Hu CC, Shen BY, Chen TY, Chang YL, et al. Phenolic compositions and antioxidant attributes of leaves and stems from three inbred varieties of *Lycium chinense* Miller harvested at various times. *Food Chem* 2017; 215: 284-291.
 14. Albishi T, John JA, Al-Khalifa AS, Shahidi F. Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *J Funct Foods* 2013; 5(3): 1191-1203.
 15. Olatunde OO, Benjakul S, Vongkamjan K. Antioxidant and antibacterial properties of guava leaf extracts as affected by solvents used for prior dechlorophyllisation. *J Food Biochem* 2018; 42(5): e12600.
 16. Park SH, Kim JM, Kim JH, Oh YS, Joo DH, Lee EY, et al. Antioxidative effects and component analysis of graviola (*Annona muricata*) leaf extract/fractions. *J Soc Cosmet Sci Korea* 2017; 43(4): 309-320.
 17. Kim JE, Bae SM, Nam YR, Bae EY, Ly SY. Antioxidant activity of ethanol extract of *Lycium barbarum*'s leaf with removal of chlorophyll. *J Nutr Health* 2019; 52(1): 26-35.
 18. Ko YE, Oh SR, Song HH, Ryu HW, Ly SY, Kim JW. The effect of 4 α ,5 α -epoxy-10 α ,14-dihydro-inuvicolide, a novel immunosuppressant isolated from *Carpesium abrotanoides*, on the cytokine profile in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* 2015; 25(1): 121-129.
 19. Cho HY, Noh KH, Cho MK, Jang JH, Lee MO, Kim SH, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of genistein in BALB/c mice injected with LPS. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008; 37(9): 1126-1135.
 20. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35(3): 206-221.
 21. Oh YC, Cho WK, Im GY, Jeong YH, Hwang YH, Liang C, et al. Anti-inflammatory effect of *Lycium* fruit water extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Int Immunopharmacol* 2012; 13(2): 181-189.
 22. Cho EJ, Kim YE, Lee DE, Sung NY, Byun EH, Park WJ. Comparison of the antioxidative and anti-inflammatory activities of *Lycium chinense* leaves and fruits extracts according to the harvest time. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2018; 47(7): 717-724.
 23. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266(12): 7313-7316.
 24. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 861231.
 25. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(4): 232-241.
 26. Scheller J, Garbers C, Rose-John S. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol* 2014; 26(1): 2-12.
 27. Xie JH, Tang W, Jin ML, Li JE, Xie MY. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: structures and functionalities. *Food Hydrocoll* 2016; 60: 148-160.
 28. Zhu J, Zhang Y, Shen Y, Zhou H, Yu X. *Lycium barbarum* polysaccharides induce Toll-like receptor 2- and 4-mediated phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells via activation of NF- κ B. *Mol Med Rep* 2013; 8(4): 1216-1220.
 29. González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr* 2010; 104 Suppl 3: S15-S27.
 30. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24(5): 287-296.
 31. Shibata H, Sakamoto Y, Oka M, Kono Y. Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63(7): 1295-1297.
 32. Benjakul S, Kittiphattanabawon P, Sumpavapol P, Maqsood S. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *J Food Sci Technol* 2014; 51(11): 3026-3037.