

익모초, 어성초, 진피 복합 추출물의 항염증 및 항산화 평가

이훈규^{1,*} · 지중구^{2,†}

¹중부대학교 대학원 한약자원학과 대학원생

²중부대학교 한방보건제약학과, 교수

(2023년 2월 9일 접수: 2023년 2월 21일 수정: 2023년 2월 21일 채택)

Evaluation of Anti-inflammatory and Antioxidant Abilities of Complex Extracts Produced from *Leonurus japonicus* Houtt., *Houttuynia cordata* Thunberg, and *Citrus unshiu* Markovich

Hun Gyu Lee^{1,*} · Joong-Gu Ji^{2,†}

¹Department of Oriental Medicine Resources Graduate School of Joongbu University,

²Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University

(Received February 9, 2023; Revised February 21, 2023; Accepted February 21, 2023)

요 약 : 본 연구는 복합추출물(익모초, 어성초, 진피)의 생리활성을 측정하여 식·의약품, 화장품 등의 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 복합추출물은 열수 추출하였으며, 세포독성, 항산화, 항염증, MAPKs 등의 평가는 ELISA 및 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, 총 폴리페놀 함량은 35.53 ± 0.48 mg GAE/g, 플라보노이드 함량은 8.18 ± 0.16 mg QE/g으로 나타났으며, DPPH 와 ABTS radical 소거능은 농도 의존적으로 증가하였다. 대조군과 비교하여 세포독성은 400 μ g/ml 농도까지 100% 이상의 생존율이 나타났으며, NO 및 염증성 사이토카인을 유의하게 감소시켰다. 또한, 복합추출물은 MAPKs(ERK, JNK, p38) 단백질 발현을 유의하게 억제시켰다. 이러한 결과는 복합추출물이 산화적 손상 및 염증에 사용될 수 있음을 나타낸다. 따라서 본 연구 결과는 식·의약품, 화장품용 복합소재의 의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

주제어 : 익모초, 어성초, 진피, 항산화활성, 항염증활성

Abstract : This study aimed to confirm the potential as a material for food, medicine, and cosmetics by measuring the physiological activity of the complex extract(*Leonurus japonicus* Houtt., *Houttuynia cordata* Thunberg and *Citrus unshiu* Markovich). The complex extract was with hot water, The evaluation of cytotoxicity, antioxidant, anti-inflammatory, and MAPKs of the extract was performed by using ELISA and western blot. Total polyphenols and flavonoid contents of complex extracts were 126.16 mg/g and 105.84 mg/g, respectively. The scavenging activities of DPPH and ABTS radical significantly increased in a dose-dependent in complex extracts. Compared

[†]Corresponding author
(E-mail: jjg1970@joongbu.ac.kr)

to the control group, the complex extracts treatments significantly reduced concentrations of nitric oxide and inflammatory cytokine (i.e., IL-1 β , TNF- α , and IL-6). Furthermore, the complex extracts treatments significantly reduced protein expression levels of MAPKs (i.e., ERK, JNK, and p38). The results indicate that the complex extract can be used for oxidative damage and inflammation. Thus, the results of this study can be used as basic data for composite materials for food, medicine, and cosmetics.

Keywords : *Leonurus japonicus* Houtt., *Houttuynia cordata* Thunberg, *Citrus unshiu* Markovich, Anti-oxidant activity, Anti-inflammatory activity

1. 서론

최근 천연소재에 대한 소비자의 관심이 높아짐에 따라 식·의약품, 화장품을 비롯한 다양한 분야에서 안전성을 기반으로 항산화 및 항염증 효능을 지닌 기초 연구가 끊임없이 진행되고 있다. 이는 인체의 질병 예방과 치료, 피부보호와 개선, 피로감 해소 등에 공통적인 인자로 인식되고 있는 항산화와 항염증에 관한 천연소재를 활용하여 소비자 만족과 사회적 비용이 절감되는 제품개발에 필요한 중요한 과정의 일환이다.

천연 항산화제는 주로 천연자원 유래의 항산화성 화합물로, 잎, 줄기, 꽃, 뿌리, 열매, 씨앗 등의 많은 부분에 존재하며, 대부분 페놀화합물로서 프리 라디칼 및 활성산소종의 생성억제를 통해 항산화 물질로서 역할을 하는 것으로 보고되고 있다[1-3]. 합성 항산화제는 천연 항산화제 보다 우수한 효과를 가지며 저렴하다는 장점이 있으나, 안전성 문제로 인해 근래에는 합성 항산화제의 단점을 개선한 안전하고 효과가 우수한 천연 항산화제의 개발이 꾸준히 이루어지고 있다[4-5]. 항염증제로는 스테로이드 계열인 코르티코스테로이드(Corticosteroid)를 비롯하여 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs; Non-Steroidal anti-inflammatory drugs), 면역 특이 소염 제제(imSAIDs; Immune Selective Anti-Inflammatory Derivatives) 등으로 나뉘어, 소염과 진통, 붓기, 발열이 발생하는 질환에 맞추어 처방되고 있으나, 장기간 복용 시 위장장애, 심혈관질환, 천식, 간 또는 신장 악화 등의 위험을 초래하는 것으로 알려져 있다[6]. 이로 인해 생강, 강황과 같은 헬렌알린(helenalin)을 포함하는 소재와 국화과 식물의 세스퀴테르펜 락톤(sesquiterpene lactone), 그리고 아스피린의 원료가 된 살리실산을 포함하는

버드나무 껍질 등이 대표적인 천연물 신약 소재로 활용되고 있다[1]. 이 밖에도 연구를 통해 식물의 폴리페놀(polyphenol) 계열 중 플라보노이드(flavonoid) 그룹인 케르세틴(querceetin)이 항염증 효과가 있다는 결과와 녹차의 항산화 작용이 염증 치료에 효과적임이 보고되었으며, 많은 치료제 약물이 천연물의 특정 성분을 통해 만들어진다는 점에서 볼 때 천연물을 활용한 연구가 지속적으로 필요한 실정이다[7-8]. 나아가 최근에는 단일천연물을 통해 진행되던 소재 개발 연구에서 천연물 배합을 활용하여 항산화 및 항염증 효과를 극대화 할 수 있는 시너지 효과가 동반된 복합물에 관한 연구가 활발히 진행 중이다.

본 연구에 사용한 천연물을 살펴보면, 익모초(*Leonuri Herba*)는 꿀풀과(Labiaceae) 2년생 초본 식물로서 한국, 중국 및 일본 등의 아시아 지역에 널리 분포되어 있다[9]. 생리활성 물질로는 leonuridine, leonurinine, leonurine, stachydrine, 등 여러 종류의 alkaloid와 vit. A 성분이 알려져 있으며, 실험적 검증 연구로 항산화, 항염증, 기억력 및 인지기능 개선 등이 보고되었다[10-13].

어성초(*Houttuyniae Herba*)는 삼백초과의 여러해살이풀인 약모밀의 지상부이다. 생리활성 물질로는 essential oil, quercetin, hyperin의 flavonoids, alkaloids 등이 알려져 있으며, 실험적 검증 연구로 항바이러스, 항백혈병, 항암 등이 보고되었다[14-20].

진피(*Citrus unshiu Pericarpium*)는 운향과에 속한 귤나무의 성숙한 과실의 과피이다[21]. 생리활성 물질로는 ferulic acid, vanillic acid, coumaric acid 등의 phenolic acids와 각종 flavonoid가 있는 것으로 알려져 있으며, 실험적 검증 연구로 항염증, 항균, 항암, 면역증진, 항산화 등이 보고되었다[22-25].

이에 본 저자는 인체에서 광범위하게 적용될 수 있는 복합물 소재를 찾아내고자 기존 기초 연구를 통해 안전성 및 항산화, 항염증, 면역 등 다양한 효능이 밝혀진 익모초, 어성초, 진피를 배합하여 연구를 진행하였다.

이를 통해 식·의약품, 화장품 등 인체에서 광범위하게 적용될 수 있는 기초자료를 제공하고자 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량, DPPH, ABTS 라디칼 소거능 등 항산화 확인하였으며, 안전성 및 항염증 효능 검증을 위해 RAW 264.7 세포로 진행한 세포독성 평가를 기반으로 LPS로 염증반응을 유도한 후 NO 및 염증성 사이토카인 등의 생성량과 MAPKs (ERK, JNK, p38) 등의 단백질 발현량을 측정하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 aluminum nitrate nonahydrate, gallic acid, quercetin, sodium carbonate, penicillin-streptomycin, protease inhibitor cocktail, potassium acetate solution, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4, trypan blue, phosphatase inhibitor cocktail 2, phosphatase inhibitor cocktail 3, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid는 Sigma사 (Sigma, USA)에서 구입하였다. Ethanol, folin-ciocalteu's phenol reagent는 Merck사 (Merck, Germany)에서 구입하였다. Dulbecco's phosphate buffered saline은 Welgene사 (Welgene, Korea)에서 구입하였다. RIPA lysis and extraction buffer, Pierce™ BCA protein assay Kit, 10% ammonium persulfate은 Thermo Fisher사 (Thermo Fisher, USA)에서 구입하였다. NO (Nitric Oxide) plus detection kit, Acrylamide-Bis Solution 30%, 29:1, pH 6.8 w/SDS, 0.5M Tris-HCl, 10X Tris-Glycine-SDS buffer, GangNam-STAIN™ prestained protein ladder, pH 8.8 w/SDS, 1.5M Tris-HCl, 10X transfer Buffer, 10X TBS with Tween 20, miracle star™ western blot detection system은 Intrabio사 (Intrabio, Korea)에서 구입하였다. EZ-cytox은 Daeilab사 (Daeilab, Korea)에서 구입하였다. Mouse IL-1

β ELISA kit, mouse IL-6 ELISA kit, mouse TNF- α ELISA kit은 Komabiotech사 (Komabiotech, Korea)에서 구입하였다. Sample buffer (Laemmlis 5x)은 ELPISbiotech사 (ELPISbiotech, Korea)에서 구입하였다. TEMED은 Bio-RAD사 (Bio-RAD, USA)에서 구입하였다. Methyl alcohol은 Samchunchemicals사 (Samchunchemicals, Korea)에서 구입하였다. Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) Mouse mAb, p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb, SAPK/JNK Antibody, p38 MAPK Antibody은 Cell signaling사 (Cell signaling, USA)에서 구입하였다.

기기는 CO₂ incubator (Sanyo, Japan), micro plate reader (Molecular Devices, USA), freeze dryer (ilshin biobase, Korea), fursion FX (Vilber, USA), rotary vacuum evaporator (EYELA FDU-540, Japan), mini trans-Blot (Bio-RAD, USA) 등을 사용하였다.

2.2. 시료 및 추출

본 실험에 사용한 시료 익모초(*Leonurus japonicus* Houtt.), 어성초(*Houttuynia cordata* Thunberg), 진피(*Citrus unshiu* Markovich) 복합물(이하, LHC)의 구성 약재는 대전 한약국에서 구매하여 사용하였다.

추출은 시료 각 10 g씩 총 30g에 Distilled water 500 mL을 넣고 3시간 동안 환류 추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 이후 농축된 용액을 동결 건조하여 분말 5.18 g(수율 17.27%)을 얻었으며 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하며 실험에 따라서 필요한 농도만큼 증류수로 희석하여 사용하였다.

2.3 항산화 효능

2.3.1. 총 폴리페놀(polyphenol) 함량 측정

1 mg/mL 농도의 LHC 추출물 1 mL과 50% folin-ciocalteu's phenol reagent (Merck, Germany) 0.5 mL를 혼합하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응시킨 용액을 Na₂CO₃ 포화용액 1 mL와 Distilled water 7.5 mL를 혼합한 후 30분 정치시킨 뒤, 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 흡광도를 760 nm 파장에서 측정하였다. 총 phenol 함량은 표준물질인 gallic acid를 이용하여 작성한 검량선을 활용하여 함량

을 구하였다.

2.3.2. 플라보노이드(flavonoid) 함량 측정

1 mg/ml 농도의 LHC 추출물 0.1 ml와 80% 에탄올 0.9 ml를 혼합하여 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium niatate 0.1 ml와 1 M potassium acetate 0.1 ml, 80% 에탄올 4.3 ml를 첨가하여 실온에서 40분 방치하고 흡광도를 415 nm 파장에서 측정하였으며, 표준물질인 quercetin을 활용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 구하였다.

2.3.3. DPPH radical 소거능 측정

LHC 추출물의 최종 농도를 희석하여 1000, 100, 10, 1 µg/ml의 농도로 정하였으며, 에탄올에 0.2 mM 농도로 용해한 DPPH 용액 150 µl와 LHC 추출물 100 µl를 혼합시킨 후 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 반응 후 흡광도를 517 nm 파장에서 측정하였으며, 시료 대조군에 Distilled water를 넣었으며, DPPH 용액은 대조군으로 에탄올을 넣고 보정값을 구하였다. DPPH radical 소거능으로 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\left(\frac{\text{대조군흡광도} - (\text{시료 첨가군흡광도})}{\text{대조군 흡광도}} \right) \times 100 = \text{소거능 (\%)}$$

2.3.4. ABTS radical 소거능 측정

LHC 추출물의 최종 농도를 1000, 100, 10, 1 µg/ml의 농도로 희석하였으며, ABTS 용액으로 2.6 mM potassium-persulphate와 7.4 mM ABTS로 제조한 후, Dark room에서 하루 정도 방치해서 양이온 (ABTS+)을 형성시킨다. 흡광도를 732 nm 파장에서 측정하여 흡광도 값이 0.7 ± 0.03 정도 나오게 희석하여주고, 희석된 ABTS+ 용액 150 µl와 LHC 추출물 5 µl를 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 흡광도를 732 nm 파장에서 측정하였다. ABTS radical 소거능은 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\left(1 - \frac{(\text{시료 첨가군 흡광도})}{\text{대조군 흡광도}} \right) \times 100 = \text{소거능 (\%)}$$

2.4. 세포 배양

대식세포 RAW 264.7 세포에 10% fetal

bovine serum과 1% penicillin-streptomycin으로 만들어진 DMEM 배지를 사용하고 5% CO₂, 37°C 조건으로 세포 배양기에서 배양하고 2일 주기로 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

2.4.1. 세포 생존율 측정

대식세포 RAW 264.7 세포를 24 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하며 24시간 동안 배양하여주었다. 이후, LHC 추출물을 800, 400, 200, 100, 50, 25 (µg/ml) 농도로 처리해주고 다시 24시간 배양한 후 세포배양액 100 µl당 10 µl의 EZ-Cytox 용액으로 세포 배양기에서 30분 반응시켰다. 반응 후 흡광도 450 nm 에서 변화를 측정하고 대조군의 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2.4.2. NO (Nitric oxide) 생성량 측정

대식세포 RAW 264.7 세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 배양하였다. LPS 100 ng/ml를 LHC 추출물 농도를 400, 200, 100, 50 (µg/ml) 처리하여 다시 24시간 배양하고, 세포배양액 100 µl과 N1 buffer 50 µl를 96-well plate에 추가하여 상온에서 10분 반응시켰으며, 이후 N2 buffer 50 µl를 가하여 상온 10분간 반응시켰다. 반응 후, 흡광도 540 nm 에서 변화를 측정하여 대조군의 생성량을 백분율로 표시하였다.

2.4.3. 염증성 사이토카인 생성량 측정

대식세포 RAW 264.7 세포를 3×10^5 cells/well을 6 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 이후, LHC 추출물 농도를 400, 200, 100, 50 (µg/ml)로 하여 LPS 100 ng/ml 를 처리하고 다시 24시간 배양하였다. 배양 후 세포배양액을 100 µl씩 96-well plate에 넣고 상온 2시간 반응시키며, well에 있는 시약을 비우고 washing buffer를 넣고 4회 정도 세척하였다. 세척 후 100 µl씩 detection antibody를 추가하고 상온에서 2시간 반응시키고 plate에 100 µl씩 streptavidin-HRP 추가하고 상온에서 30분 반응시켰다. 이후 100 µl씩 TMB or pink-ONE solution 넣은 후 15분간 반응시키며 100 µl의 stop solution을 넣어주고 micro reader를 통해 흡광도를 450 nm에서 측정하였으며, standard curve를 기준으로 절대값을 나타내었다.

2.5. MAPKs 단백질 발현량 확인

대식세포 RAW 264.7 세포를 3×10^5 cells/well 로 6-well plate에 분주하여 이후, LHC 추출물 농도를 400, 200, 100, 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에 100 ng/ml LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포에 protease inhibitor cocktail I 과 phosphatase inhibitor II 및 III가 포함된 RIPA buffer를 넣어서 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 pierce BCA protein assay kit로 정량하며, sample loading buffer와 혼합하여 95°C에서 5분 반응시켜 준비하였다. 단백질은 10% acrylamide gel을 이용하여 SDS PAGE하고 크기 별로 분리하였으며, PVDF membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane을 5% BSA에 담근 후 상온에서 2시간 반응시켰다. TBS-T buffer를 이용해 3회 세척하고 p-JNK (1:2000), p-ERK (1:2000), p-p38 (1:1000), JNK (1:1000), ERK (1:1000), p38 (1:1000), β -actin (1:5000) first antibody를 넣고 4°C에서 14시간 반응시켰다. 이후 5회 세척하며 secondary antibody (1:10000)를 넣어서 상온에 1시간 반응시켰으며, 반응 후 10회 세척하며 ECL solution으로 단백질 발색을 시켰다. 이후 chemidoc fusion FX으로 단백질 발현량을 분석하였다.

2.6. 통계처리

실험 결과 통계처리는 SPSS 21.0를 활용하여 평균(mean)±표준편차(standard error)로 나타내었으며, ANOVA를 이용하여 다중 비교하였고 Tukey's HSD test으로 $p < 0.001$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.05$ 수준에서의 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀(polyphenol) 함량

페놀산은 벤젠고리와 수산기(-OH)를 갖는다. 대개 자연에서 분리된 형태보다는 당, 아미노산 지질, 유리당 등과 에스테르 결합으로 연결되어 있다[26]. 또한, 페놀산은 hydroxycinnamic acids와 hydroxybenzoic acids로도 분류된다. Hydroxybenzoic acids에는 gallic acid, vanillic acid, syringic acid, benzoic acid, salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid 등이 있으며, hydroxycinnamic acids는 p-coumaric acid, trans-

cinnamic acid, ferulic acid, caffeic acid, 그리고 hydrocaffeic acid 등이 있다[27]. 이 성분들은 항염, 항균, 항암, 항산화의 효과를 갖는 것으로 보고되었다[28-31].

표준물질로 Galic acid를 이용하여 활용한 검량선에 따라 함량을 구하였으며, LHC 추출물 1 mg/ml 농도에 존재하는 총 폴리페놀 함량을 측정 한 결과, 35.53 ± 0.48 mg GAE¹⁾/g으로 나타났다 (Table 1).

이와 같은 결과는 앞선 선행 연구를 통해 보고된 단일 추출물의 총 polyphenol 함량인 어성초 60% 메탄을 추출(17.71 ± 0.22 mg/g), 익모초 열수 추출(44.36 ± 0.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 진피 열수 추출(20.75 ± 0.31 mg/g)과 비교하였을 때, 복합물이 단일 추출물 대비 페놀 함량을 높게 나타나 항산화 효과가 우수한 것을 보여주고 있다[32-34]. 추후 복합물의 에탄올 추출을 통한 비교가 필요하지만, 식품, 화장품과 같은 열수 추출이 선호되는 분야에서는 본 연구 결과의 활용도가 높을 것으로 판단된다.

Table 1. Total Polyphenol Contents of LHC extracts

Sample	Total polyphenol contents (mg/g)
LHC	35.53 ± 0.48

The results were expressed as mean \pm S.D.

3.2. 플라보노이드(flavonoid) 함량

플라보노이드는 담황색이나 노란색을 띠고, 방향족 2개와 탄소 3개로 구성된 C6-C3-C6의 기본 구조 화합물로 결합하는 다양한 hydroxyl기로 anthocyanidins, flavones, flavanones, flavonols, isoflavonoids, catechins 등으로 분류된다 [35-36]. 플라보노이드 성분물질은 catechins, apigenin, hesperidin, quercetin, luteolin, kaempferol, epicatechin, proanthocyanidins, isoquercitrin, limonin 등이 있다[36]. 플라보노이드는 피부보호, 심장보호, 항염, 항바이러스, 면역증진, 항암효과가 있으며, 활성산소 제거 효과가 높아 항산화 효과를 나타낸다[37-40].

Quercetin을 표준물질로 사용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며, LHC 추출물 1 mg/ml 농도에서 존재하는 flavonoid 함량을 측정 한 결과, 8.18 ± 0.16 mg/g으로 나타났다 (Table 2).

이와 같은 결과는 앞선 총 polyphenol 결과와

동일하게 어성초 80% 에탄올 추출(33.30±0.55 mg/g) 보다는 낮았으나, 어성초 60% 메탄올 추출(75.80±0.37 µg/g), 익모초 열수 추출(1.08±0.01 µg/ml) 보다 높은 것으로 나타나 복합물의 긍정적 시너지 효과에 의한 것임을 보여주고 있다[41-42].

Table 2. Total Flavonoid Contents of LHC extracts

Sample	Quercetin contents (mg/g)
LHC	8.18±0.16

The results were expressed as mean ± S.D.

3.3. DPPH radical 소거능

DPPH는 짙은 보라색을 나타내는, 비교적 안정한 free radical로서 항산화 성분과 반응하면, 보라색이 무색으로 변하게 되는 특성이 있어서 항산화 활성을 간단히 검증 가능하여 다양한 천연 소재들로 항산화 물질의 전자공여능을 측정에 많이 이용되어진다[43].

DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 1000, 100, 10, 1 (µg/ml) 농도에서 각각 4.16±0.28%, 5.46±0.49%, 23.14±0.81%, 64.19±0.50%로 나타나 농도 의존적으로 소거능이 증가되었다(Fig. 1).

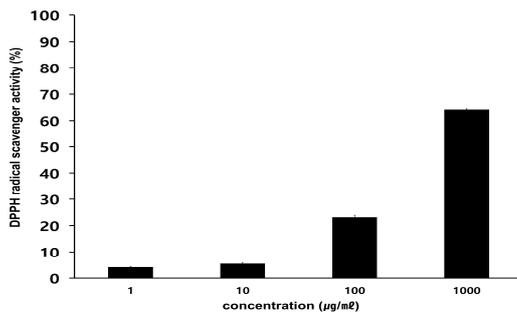


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of LHC extracts. LHC extracts were incubated at 1000, 100, 10, and 1 µg/ml with DPPH solution for 30 min. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean ± S.D from three independent experiments.

3.4. ABTS radical 소거능

ABTS radical은 potassium persulfate와 반응하여 생성된 peroxide radical 의 ABTS가 항산화성 물질에 제거되면서 청록색이 탈색된 것을 이용하여 항산화능의 차이를 청록색이 탈색 되어지는 정도를 흡광도 수치로 나타낸다. 유리라디칼이 소거 되어지는 것을 이용한 DPPH radical 소거능과 반면, 양이온인 라디칼이 소거 되어지는 것을 이용한 ABTS radical 소거능이다[44].

ABTS radical 소거능을 측정한 결과, 1000, 100, 10, 1 (µg/ml) 농도에서 각각 1.35±0.36%, 6.05±0.66%, 45.17±0.40%, 92.55±0.21%로 나타나 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

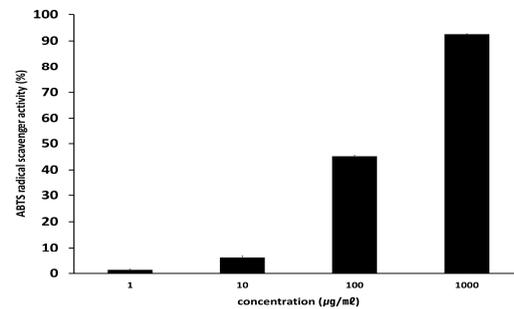


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of LHC extracts. LHC extracts were incubated at 1000, 100, 10, and 1 µg/ml with ABTS solution for 10 min. Activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean ± S.D from three independent experiments.

3.5. 세포 생존율

인체는 생체방어 및 면역의 매우 복잡하며 다양한 세포들이 관여하는 것으로 알려져 있다[45]. 생체방어 기전 중 생체 내로 바이러스가 침입하였을 때 가장 먼저 반응하는 면역 세포는 대식세포 (macrophage), 호중구 (neutrophile) 및 단핵구 (monocyte) 등이 있으며, 이들은 선천면역체계의 중추적인 역할을 담당한다[46]. 대식세포 (macrophage)는 점막을 가진 상피세포 장벽 이후 생체방어 시스템에 있어서 최초로 병원체에 대응하는 면역세포로 항원의 식균작용, 감시 및 이동 등에 매우 중요한 역할을 담당한다. 또한,

후천면역계를 담당하는 T 세포와 반응하여 T 세포의 활성을 조절하는 역할을 수행하며, 선천면역 뿐만 아니라 후천면역계에서도 중요한 역할을 수행하는 대식세포를 활용한 세포 생존을 평가는 연구자가 손쉽게 다룰 수 있어 실험이 용이 하기에 시료의 연구 농도 선정에 많이 활용되고 있다[47].

세포 생존율을 측정된 결과, 800 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 $92.60 \pm 0.35\%$ 로 나타났다(Fig. 3).

이와 같은 결과는 LHC 추출물이 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이하에서 독성을 나타내지 않는 안전한 범위를 보여주고 있어 이후 LPS 처리 후 확인한 항염증 실험은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지로 설정하여 진행하였다.

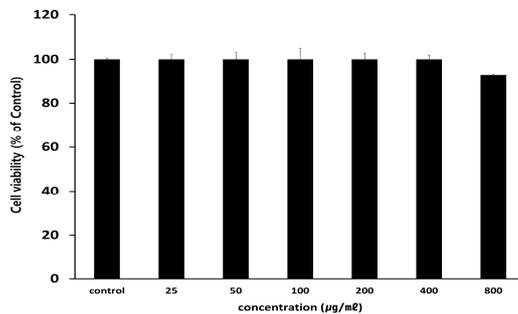


Fig. 3. Cell viability of LHC extracts in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated by 25, 50, 100, 200, 400, and 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LHC extracts for 24 h. Treated cells were reacted by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using micro plate reader. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments.

3.6. Nitric oxide(NO) 생성량

면역반응성에 비해 면역 관용 기작이 강해지는 경우 인체 면역계는 병원균, 암, 외부 바이러스 등의 침입하게 되어 세균성 질환 및 바이러스를 발생시키고, 이와 반대로 면역 반응성이 면역 관용 기능보다 강해질 경우에 류마티스 관절염과 같은 알레르기, 자가 면역질환 및 강력한 이식 거부 반응과 같은 염증성 질환을 초래하게 되며, 염증과 면역은 서로 밀접한 관계가 있다고 할 수

있다[48]. 특히 염증 반응은 상처와 외부 이물질의 침입하면 생체를 방어하기 위해 가장 먼저 발생 되는 선천성 면역(innate immunity) 반응으로 알려졌으며 면역과 염증의 관계를 뒷받침해주고 있다[49]. 이러한 선천성 면역 반응에 관여하는 대표적인 물질로 일산화질소(NO)는 혈압 조절과 혈액 응고, 암세포에 대한 면역 효능이 있지만, 일산화질소가 과도하게 생성되면 인체에 염증 반응과 세포손상을 통해 관절염, 알츠하이머, 파킨슨 등과 같은 퇴행성 질환의 원인으로 작용하게 된다[50].

본 연구에서 NO 생성량을 측정된 결과, 400, 200, 100, 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 각각 $86.65 \pm 0.27\%$, $75.08 \pm 0.75\%$, $62.90 \pm 0.39\%$, $60.30 \pm 0.99\%$ 로 모든 농도에서 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 4).

이와 같은 결과는 LHC 추출물이 대표적인 염증 매개체인 nitric oxide 생성을 효과적으로 제거함으로써 주요 발병 원인으로 알려진 알츠하이머, 파킨슨 질환을 비롯하여 유사한 염증 질환을 개선할 수 있음을 보여주고 있다. 특히, nitric oxide가 급성 염증 단계에서 소거되지 않으면 PGE₂에 의해 만성 염증 단계로 전환되므로 LHC 추출물은 염증 초기 단계에 활용도가 높을 것으로 생각된다.

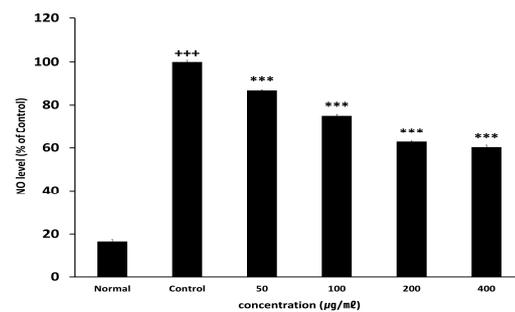


Fig. 4. Effect of LHC extracts on Nitric oxide level in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LHC extracts with 100 ng/ml LPS for 24 h. Nitric oxide levels were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$ compared to control).

3.7. 염증성 사이토카인 생성량

IL-1 β 는 염증반응을 촉진하며 면역계를 자극하는 염증 유발 인자로 B-cell의 성숙, T-cell의 활성화 등에 관련하여 종양의 침습에도 관련이 있다고 알려져 있다[51]. IL-6는 체내에서 과잉 생산 되면 악성 종양이나 자가 면역질환 및 감염성 질환 등의 여러 가지 질환을 유발하게 되어 다양한 염증성 질환에서 IL-6 분비량이 항상 증가하는 것으로 보고되어 있다[51-52]. TNF- α 는 여러 급성 또는 만성 염증 질환의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하며, TNF- α 의 합성 조절이 질환의 치료에 이용될 수 있다고 알려져 있다[53-54].

본 연구에서 사이토카인 생성량을 측정한 결과, 400, 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 IL-1 β 생성량은 각각 328.48 ± 11.44 pg/ml, $255.78 \pm$

21.31 pg/ml, 189.48 ± 5.15 pg/ml, 140.32 ± 46.76 pg/ml, IL-6 생성량은 각각 25759.45 ± 378.95 pg/ml, 23253.68 ± 3465.41 pg/ml, 17351.33 ± 1224.30 pg/ml, 12046.58 ± 213.14 pg/ml로 나타났다. 또한, TNF- α 생성량은 각각 48426.73 ± 3582.57 pg/ml, 46077.87 ± 8254.93 pg/ml, 38420.13 ± 2736.52 pg/ml, 35115.93 ± 1465.92 pg/ml로 나타나, IL-1 β 생성은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 제외하고 모든 농도에서, IL-6 및 TNF- α 생성은 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 대비하여 유의하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5).

이와 같은 결과는 LHC 추출물이 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 염증성 사이토카인의 증가를 특징으로 하는 류마티스관절염, 천식, 아토피피부염 등과 같은 질환 개선에 도움을 줄 수 있으며, 나아가

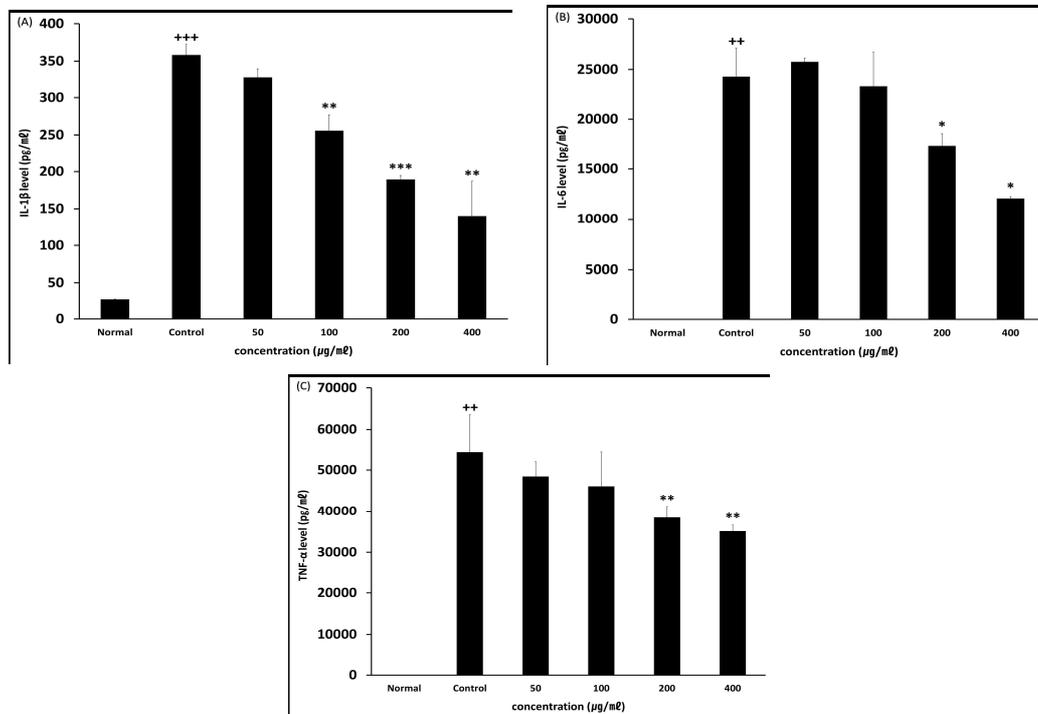


Fig. 5. Effect of LHC extracts on IL-1 β (A), IL-6(B), TNF- α (C) level in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g/ml}$ of LHC extracts with 100 ng/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse IL-1beta, IL-6, TNF- α ELISA kit. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

TNF- α 억제제와 유사한 용도로도 활용될 수 있을 것으로 보여진다.

3.8. MAPKs 단백질 발현량

MAPKs는 세포의 자극을 세포막에서부터 세포 내 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달경로로서 성장호르몬, 스트레스, 사이토카인 등의 수용체로부터 활성화된 신호를 세포 내로 전달하며 세포의 분화, 증식, 사멸 등 다양한 기능을 한다. 크게 ERK(Extracellular signal-activated kinase), JNK(c-JUN N-terminal kinase) 및 p38 MAPK로 분류할 수 있다. ERK는 성장호르몬의 신호전달에 관여하여 세포의 증식과 분화에 중추적인 역할을 담당하며, JNK와 p38 MAPK는 세포 외부의 스트레스 자극을 통해 활성화되며 세포 사멸, 염증반응 등을 매개한다[55].

본 연구에서 MAPK 단백질 발현량을 확인한

결과, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 ERK 발현은 각각 $1.06 \pm 0.01\%$, $0.87 \pm 0.01\%$, $0.58 \pm 0.01\%$, $0.54 \pm 0.01\%$, JNK발현은 각각 $0.82 \pm 0.01\%$, $0.78 \pm 0.01\%$, $0.74 \pm 0.01\%$, $0.68 \pm 0.01\%$ 로 확인되었다. 또한, p38발현은 각각 $0.95 \pm 0.01\%$, $0.94 \pm 0.01\%$, $0.91 \pm 0.01\%$, $0.82 \pm 0.01\%$ 로 확인되어 MAPK 관련 단백질 발현을 ERK 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 제외하고 모든 농도에서 대조군에 대비하여 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 6).

이와 같은 결과는 LHC 추출물이 MAPK 관련 신호분자의 경로 활성 억제를 통해 사이토카인, 바이러스 감염, DNA 손상, 세포 노화 등과 같은 임상적 손상을 방어할 수 있음을 확인되었고 이들의 손상이 산화 및 염증과 관련이 높다는 점에서 앞선 실험 결과의 유의적인 결과가 이를 뒷받침하고 있다.

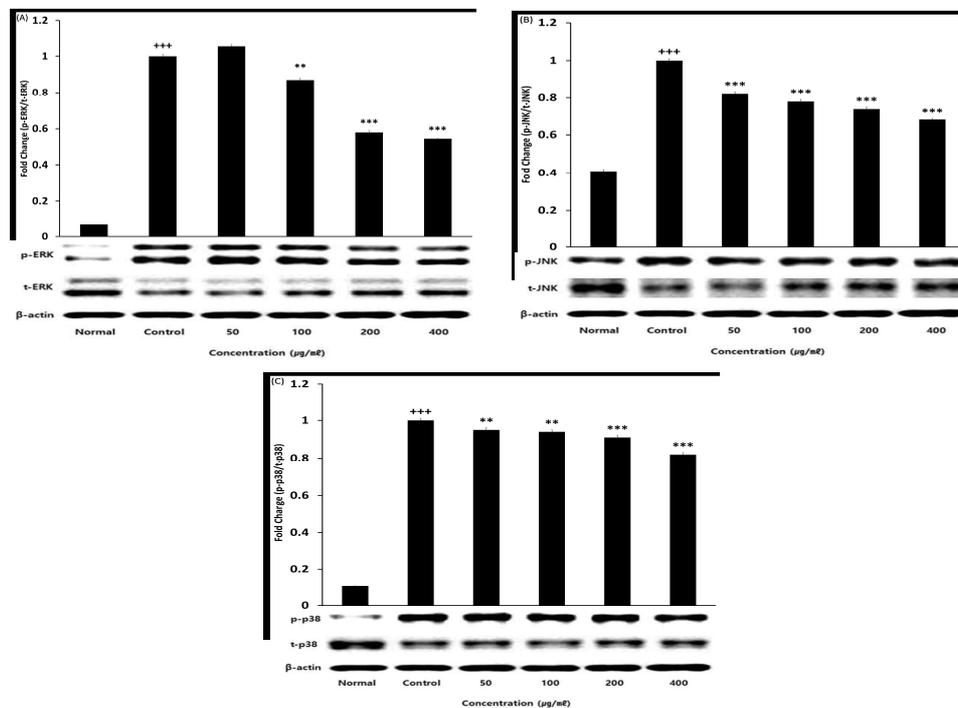


Fig. 6. Effect of LHC extracts on ERK(A), JNK(B), and p38(C) protein expression level in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g/ml}$ of LHC extracts with 100 ng/ml LPS for 24 h. The total cell extracts were subjected to 10% SDS-PAGE and western blot analysis with the respective primary and secondary antibodies. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments(Significance of results, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

4. 결론

본 연구는 익모초, 어성초, 진피 복합추출물(이하, LHC)이 인간 생활과 밀접한 관련이 있는 식·의약품과 화장품 등에 광범위하게 적용될 수 있도록 안전성이 확보된 항산화 및 항염증에 효과적인 복합물 소재를 발굴하여 기초자료로 활용하고자 연구를 진행하였다.

LHC 추출물은 항산화측정 결과 총 polyphenol 함량은 35.53 ± 0.48 mg GAE/g, flavonoid 함량은 flavonoid 함량은 8.18 ± 0.16 mg QE/g으로 나타났으며, DPPH, ABTS radical 소거능은 농도 의존적으로 증가 되었다. LHC 추출물은 RAW 264.7 세포에 LPS 유도하여 NO 생성량, 염증성 사이토카인 생성량을 측정한 결과, 대조군 대비 모든 농도에서 생성을 유의성 있게 감소 되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, LHC 추출물은 세포 생존을 평가를 통해 독성이 없는 안전한 농도가 설정되었으며, 항산화 실험을 통해 성분 함량 및 효능을 검증하였다. 아울러 염증 및 AMPKs 관련 바이오마커 평가를 통해 염증과 산화적 손상 기전에 대해 객관적이고 유의적인 결과는 전임상 단계 연구뿐만 아니라 본 결과를 통해 즉시 개발이 가능한 분야에서 폭넓게 활용될 수 있는 기초적 자료로 제공될 수 있을 것으로 사료 된다.

References

1. W. H. Kim, "Gastrointestinal Side Effects of NSAIDs", *Medical Postgraduates*, Vol.29, No.6 pp. 333-347, (2001).
2. S. I. Oh, M. S. Lee, "Functional activities of ethanol extracts from *Flammulina velutipes*", *Korean J Food Nutr*, Vol.23, No.1 pp. 15-22, (2010).
3. H. W. Kang, "Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.41, No.8 pp. 1072-1078, (2012).
4. Branen, A. L., "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol.52, No.2 pp. 59-63, (1975).
5. H. S. Kim & Y. H. Kang, "Antioxidant Activity of Ethanol Extracts of Non-Edible Parts (stalk, stem · leaf, seed) from Oriental Melon", *Korean Journal of Plant Resources*. Vol.23, No.5 pp. 451-457, (2010).
6. K. S. Kim, "Clinical Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs", *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg*, Vol.47, No.2 pp. 91-98, (2004).
7. K. E. Lee, E. S. Lee and S. G. Kang, "Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of the Extract Mixtures of *Perilla frutescens*", *Houttuynia cordata and Camellia sinensis*, Vol.41, No.2 pp. 173-180, (2015).
8. Williams, G. M., C. X. Wang & Iatropoulos, M. J., "Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies", *Food and chemical toxicology*, Vol.28, No.12 pp. 799-806, (1990).
9. X. H. Shang, X. Pan, H. Wang and M. Li, "Leonurus japonicus Houtt.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine", *J. Ethnopharmacol*, Vol.152, pp. 14-32, (2014).
10. Y. Z. Zhu, W. Wu, Q. Zhu, & X. Liu, Discovery of Leonuri and therapeutical applications: from bench to bedside. *Pharmacology & therapeutics*, Vol.188, pp.26-35. (2018).
11. Wang, C., Lv, X., Liu, W., Liu, S., & Sun, Z. Uncovering the pharmacological mechanism of motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt.) for treating menstrual disorders: a systems pharmacology approach. *Computational Biology and Chemistry*, Vol.89, pp. 107384. (2020).
12. Chinese Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2020th ed. Beijing. *China Medical Science Press*. (2020).

13. Liu J, Peng C, Zhou QM, Guo L, Liu ZH, Xiong L. Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicus* and their opposite effects on uterine smooth muscle. *Phytochemistry*. Vol.145 pp. 128-136. (2018)
14. H. Lu, X. Wu, Y. Liang & J. Zhang.. "Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia THUNB*", *Chemical & pharmaceutical bulletin*, Vol.54, No.7 pp. 936-940, (2006).
15. Shingnaisui, K., Dey, T., Manna, P., & Kalita, J. Therapeutic potentials of *Houttuynia cordata* Thunb. against inflammation and oxidative stress A review. *Journal of ethnopharmacology*, Vol.220, pp. 35-43. (2018).
16. Li T, Liu L, Wu H, Chen S, Zhu Q, Gao H, Yu X, Wang Y, Su W, Yao X, Peng T. Anti-herpes simplex virus type 1 activity of Houttuynoid A, a flavonoid from *Houttuynia cordata* Thunb. *Antiviral Res*. Vol.144, pp. 273-280. (2017).
17. Hsu CC, Yang HT, Ho JJ, Yin MC, Hsu JY. *Houttuynia cordata* aqueous extract attenuated glycolytic and oxidative stress in heart and kidney of diabetic mice. *Eur J Nutr*. Vol.55, No.2 pp. 845-854. (2016).
18. M. T. Wang, K. V. Honn & D. Nie, "Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression", *Cancer and Metastasis Reviews*, Vol.26, No.3 pp. 525-534, (2007).
19. E. H. Han, J. H. Park, J. Y. Kim & H. G. Jeong, "Houttuynia cordata water extract suppresses anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response by inhibiting multiple steps of FcεRI signaling in mast cells", *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, Vol.47, No.7 pp. 1659-1666, (2009).
20. T. Y. Lin, Y. C. Liu, J. R. Jheng, H. P. Tsai, J. T. Jan, W. R. Wong & J. T. Horng., "Anti-enterovirus 71 activity screening of Chinese herbs with anti-infection and inflammation activities", *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol.37, No.1 pp. 143-158, (2009).
21. O. j. Kwon, A. R. Lee, S. S. Roh. "Improving Effects on Rats with Reflux Esophagitis Treated with Combined Extract of Young persimmon fruit and Citrus peel", *The Korea Journal of Herbology*, Vol.31, No.1 pp. 25-31, (2016).
22. J. Y. Cha & Y. S. Cho, "Biofunctional activities of citrus flavonoids". *Applied Biological Chemistry*. Vol.44, No.2 pp. 122-128, (2001).
23. Harborne J. B. & Williams C. A., "Advances in flavonoid research since 1992", *Phytochemistry*, Vol.55, No.6 pp. 481-504, (2000).
24. Lü J, Zhang D, Zhang X, Sa R, Wang X, Wu H, Lin Z, Zhang B. Network Analysis of the Herb-Drug Interactions of Citrus Herbs Inspired by the "Grapefruit Juice Effect". *ACS Omega*. Vol.7, No.40, pp. 35911-35923. (2022).
25. Dongxiao Su, Hesheng Liu, Xiangyang Qi, Lihong Dong, Ruifen Zhang, Jie Zhang, Citrus peel flavonoids improve lipid metabolism by inhibiting miR-33 and miR-122 expression in HepG2 cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.83, No.9, pp. 1747-1755, (2019)
26. Faulds C & Williamson G. "The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall", *Journal of the science of food and agriculture*, Vol.79, pp. 393-395, (1999).
27. Y. H. Kang, Y. K. Park & G. D. Lee, "The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds", *Korean journal of food science and technology*, Vol.28, No.2 pp. 232-239, (1996).
28. M. H. Bang, J. C. Song, S. Y. Lee, N. K. Park & N. I. Baek, "Isolation and

- structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*”, *Applied Biological Chemistry*, Vol.42, No.2 pp. 170–175, (1999).
29. G. S. Kim, “Effect of Dietary Phenols on Body Tissue Oxidative State and Cancer Prevention”, *Korean J Food Nutr*, Vol.10, No.1 pp. 74–81, (1997).
 30. Panizzi L, Caponia C, Catalano S, Cioni P. L., Morelli I, “In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubusulmifolius*”, *J Ethnopharmacol*, Vol.79, pp. 165–168, (2002).
 31. Pekkarinen S. S., Stöckmann H., Schwarz K, “Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate”, *J Agric Food Chem*, Vol.47, pp. 3036–3043, (1999).
 32. M. E. Yun, Y. S. Lee, Y. J. Lee, Y. M. Park, & S. N. Park, “Antimicrobial, antioxidant and cellular protective effects of *Houttuynia cordata* extract and fraction. *Applied Chemistry for Engineering*, Vol.29, No.4, pp. 452–460 (2018)
 33. K. E. Lee, E. S. Lee and S. G. Kang, “Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of the Extract Mixtures of *Perilla frutescens*”. *Houttuynia cordata and Camellia sinensis*, Vol.41, No.2 pp. 173–180, (2015).
 34. J. E. Jeong, S. P. Shim, Y. S. Jeong, H. K. Jung, Y. C. Kim and J. H. Hong, “Optimization of Extraction Conditions for Ethanol Extracts from Citrus unshiu Peel by Response Surface Methodology”, *Korean J Food Preserv*, Vol.18, No.5 pp. 755–763, (2011).
 35. Middleton E, Kandaswami C., “Potential health-promoting peoperties of citrus flavonoids”, *Inst Food Technol*, Vol.48, pp. 115–119, (1994).
 36. W. S. Woo, “Study of Natural Compounds and Chemistry”, *Seoul National University Press, Seoul*. pp. 30–34,80–83, (2002).
 37. Heim K. E., Tagliaferro A. R. & Bobilya D. J., “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships”, *The Journal of nutritional biochemistry*, Vol.13, No.10 pp. 572–584, (2002).
 38. H. Y. Sohn, H. Y. Ryu, Y. J. Jang, H. S. Jang, Y. M. Park & S. Y. Kim, “Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*”. *Microbiology and Biotechnology Letters*, Vol.36, No.3 pp. 195–200, (2008).
 39. Tsao R., “Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols”, *Nutrients*, Vol.2, No.12 pp. 1231–1246, (2010).
 40. Williams R. J., Spencer J. P. & Rice–Evans C. “Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?”, *Free radical biology and medicine*, Vol.36, No.7 pp. 838–849, (2004).
 41. H. J. Lim, H. J. Lee, M. H. Lim, “Comparison of Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Korean *Houttuynia cordata* Thunb. Extracts”, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.1 pp. 217–227, (2021).
 42. J. G. Bak, J. Kim, & S. H. Ohk, “Preparation of Shark Byproduct Extract and Gellan Gum based Antibacterial Film Containing Green Tea Extract”. *Biomedical Science Letters*, Vol.28, No.1. pp.50–57 (2022).
 43. W. Y. Song, S. J. Byeon and J. H. Choi, “Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Sasa borealis* extracts”, *Journal of Agriculture & Life Sciences*, Vol.49, pp. 145–154, (2015).
 44. G. Park, Y. Sim, W. Lee, S. H. Sung and M. S. Oh, “Protection on skin aging mediated by antiapoptosis effects of the water lily (*Nymphaea Tetragona Georgi*) via reactive oxygen species scavenging in human epidermal keratinocytes”. *Pharmacology*, Vol.97, pp. 282–293, (2016).
 45. M. W. Byun & E. H. Byun, “Immunological synergistic effects of

- combined treatment with herbal preparation (HemoHIM) and red ginseng extracts”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.44, No.2 pp. 182-190, (2015).
46. J. H. Cha & E. M. Lim, “Effects of Gardeniae fructus on cytokines in mouse macrophage”, *The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology*, Vol.27, No.1 pp. 1-16, (2014).
 47. Ripoll V. M., Meadows N. A., Raggatt L. J., Chang M. K., Pettit A. R., Cassady A. I. & Hume D. A., “Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB”, *Gene*. Vol.413, No.1 pp. 32-41, (2008).
 48. H. G. Kwon, J. S. Hwang, J. S. So & S. H. Lim, “Immunological homeostasis and inflammatory immune disorders”, *The Korean Society for Molecular and Cellular Biology*, Vol.20, No.1 pp. 48-69, (2008).
 49. Ferrero-Miliani L., Nielsen O. H., Andersen P. S. & Girardin S., “Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation”, *Clinical & Experimental Immunology*, Vol.147, No.2 pp. 227-235, (2007).
 50. J. S. Chang, L. C. Chiang, C. C. Chen, L. T. Liu, K. C. Wang & C. C. Lin, “Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb”, *The American journal of Chinese medicine*, Vol.29, No.2 pp. 303-312, (2001).
 51. Delgado A. V., McManus A. T. & Chambers J. P., “Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P”, *Neuropeptides*. Vol.37, No.6 pp. 355-361, (2003).
 52. S. Y. Chae, M. J. Kim, D. S. Kim, J. E. Park, S. K. Jo & S. T. Yee, “Effect of *Asterina pectinifera* extracts on the activation of immune cells”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.36, No.3 pp. 269-275, (2007).
 53. Tracey, K. J., H. E. Wei, K. R. Manogue, Y. Fong, Hesse DG, Nguyen HT & Cerami A. “Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation”, *The Journal of experimental medicine*, Vol.167, No.3 pp. 1211-1227, (1988).
 54. Beutler B & Cerami A., “The biology of cachectin/TNF α primary mediator of the host response”, *Annual review of immunology*, Vol.7, pp. 625-655, (1989).
 55. Caivano M., “Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages”, *FEBS letters*, Vol.429, No.3 pp. 249-253, (1998).