

Original Article

## 포공영, 금은화, 익모초 혼합물의 항산화 및 항염증 효과에 관한 연구

허성신, 김영일\*

대전대학교 한의과대학 침구학교실

### The Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt, *Lonicera japonica* Thunberg and *Leonurus japonicus* Houtt. Complex

Sung Sin Huh, Young Il Kim\*

Department of Acupuncture and Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

**Objectives:** This study was designed to experiment with the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt, *Lonicera japonica* Thunberg, and *Leonurus japonicus* Houtt. complex (TLL) in LPS-induced RAW264.7 cell.

**Methods:** The antioxidant activity of TLL was measured by FRAP assay, DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity. Total polyphenol and flavonoid contents of TLL were measured by using standard methods. The anti-inflammatory effects of TLL were measured by NO production, biomarker production (PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), mRNA expression level (iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) and protein expression level (ERK, JNK, p38).

**Results:** Total polyphenol and flavonoid contents in TLL were 58.03 $\pm$ 1.02 mg of Gallic acid equivalents (GAE)/g and 16.58 $\pm$ 0.60 mg of Quercetin equivalents (QE)/g respectively. In FRAP assay, DPPH and ABTS radical scavenging activity, a concentration-dependent increase in TLL was observed. To explore antioxidant and anti-inflammatory effects of TLL, RAW 264.7 cells were treated with TLL and LPS for 24 hours. Cell viability of RAW 264.7 cells were measured by adding EZ-Cytox. It was remarkably increased at 50, 100, 200  $\mu$ g/ml concentrations of TLL. NO, ROS, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ERK, JNK and p38 were remarkably decreased at 50, 100, 200  $\mu$ g/ml concentrations of TLL compared to the control group. PGE<sub>2</sub> and COX-2 were remarkably decreased at 100, 200  $\mu$ g/ml concentrations

**Conclusion:** These results suggest that TLL complex has antioxidant and anti-inflammatory effects.

**Key Words** : antioxidant, anti-inflammation, *Taraxacum platycarpum*, *Lonicera japonica*, *Leonurus japonicus*.

## 서론

인체 내 산소의 대사과정에서 생성되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 일반적으로 미토콘드리아에서 생체 에너지인 ATP를 생성할 때 사용되고<sup>1)</sup>, 체내에서는 항산화 반응을 통해 제거가 가능하다. 그러나 미토콘드리아의 기능 이상, 산화효소(oxidase)에 의한 ROS의 과잉생성 혹은 활성산소를 제거하는 효소(catalase, superoxide dismutase 등)의 기능 이상이 생겨 과잉 생성된 ROS의 제거가 적절하게 이루어지지 않으면 산화스트레스가 유발되어 세포의 기능소실 또는 사멸을 초래한다<sup>2)</sup>. 산화스트레스는 세포나 조직을 손상시켜 류마티스성 관절염, 종양 등의 원인이 되고, 중추신경계를 포함한 노화에도 영향을 미치며, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병, 근위축성 측색경화증과도 연관이 깊은 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

염증은 국소감염, 조직손상 또는 해로운 물질 노출에 대한 혈관 및 결합조직계의 방어반응으로 원인 인자를 제거하여 개체를 보호하는 기능을 한다<sup>4)</sup>. 병원성 미생물이나 물리적·화학적 자극으로 대식세포, 수지상세포 등이 활성화되면 선천면역반응의 초기단계에 작용하는 염증성 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), 케모카인, 프로스타글란딘 등이 분비되고, 비만세포는 히스타민과 다른 염증매개물질을 분비하며<sup>5)</sup>, 이는 염증의 특징적 현상인 발적, 발열 및 종창을 유발한다<sup>6)</sup>. 과도한 염증은 동맥경화증, 심혈관질환, 류마티스 관절염 등과 같은 개체에 해로운 결과를 초래할 수도 있다<sup>4)</sup>.

진통, 소염, 해열 등의 효과가 있는 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 프로스타글란딘 합성에 관여하는 효소 cyclooxygenase-1(COX-1)과 COX-2를 억제한다. 그러나 COX-1을 억제하게 되면 위 점막 보호효과의 저해와 항혈소판 작용을 일으켜 위장관계 부작용을 빈번히 일으키는 단점이 있다. 이러한 이유로 COX-2 선택적 억제제가 개발되었으나 최근 연구들에 의하

면 COX-2 선택적 억제제를 사용했을 때 위병증 및 위장관의 출혈 감소가 뚜렷하게 나타나지 않았으며, 뇌졸중, 부종, 고혈압, 심근경색, 심부전 등 부작용이 예상되어<sup>7,8)</sup> 대체 치료약물의 요구가 증가되고 있다. 최근에는 안전성이 높은 천연물 유래 생리활성물질들에 대한 연구가 증가하는 추세이며, 한의학에서도 한약에 대한 항산화 및 항염증 연구가 시행되고 있다<sup>9-11)</sup>.

한의학에서는 항산화, 항염증을 목표로 淸熱解毒藥이 많이 사용되고 있다. 淸熱解毒의 ‘毒’은 火熱壅盛으로 인한 紅腫熱痛 등의 화농성 감염증을 뜻하며, 淸熱解毒은 소염, 항감염 등의 작용을 뜻한다<sup>12)</sup>. 그중 포공영은 淸熱解毒藥으로 淸熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋의 효능이 있으며<sup>12)</sup>, 항염증<sup>13)</sup>, 항산화<sup>14)</sup> 항암<sup>15)</sup>, 항알레르기<sup>16)</sup> 등의 효과가 보고되었다. 금은화는 淸熱解毒藥으로 淸熱解毒, 涼散風熱, 涼血止痢의 효능이 있으며<sup>12)</sup>, 항산화 및 항염증 효과<sup>9)</sup>, 신경세포보호<sup>17)</sup>, 류마티스성 관절염 치료 효과<sup>18)</sup> 등이 보고되었다. 익모초는 活血祛瘀藥으로 行血祛瘀, 利尿消腫, 淸熱解毒의 효능이 있으며<sup>19)</sup>, 항산화 및 항염증<sup>10)</sup>, 위염 예방<sup>20)</sup> 등의 효과가 보고되었다.

금은화와 포공영은 熱毒으로 인한 염증성 피부질환에 쓰이는 五味消毒飲의 君藥과 臣藥으로 配伍하면 淸熱解毒, 消散壅腫하는 작용이 증강된다<sup>21)</sup>. 박 등<sup>22)</sup>은 한약재의 조합이 방제학적인 시너지효과가 있어 항산화 및 항염증 효과가 개별 한약재 효능의 합보다 더 뛰어나다고 보고하였고, 최근 연구 동향에 따르면 금은화와 포공영 조합에 더욱 시너지효과를 내기 위해 단일 약재를 추가하여 항균, 항산화 및 항염작용에 대한 연구가 진행 중에 있다<sup>23-26)</sup>. 이에 저자는 活血祛瘀藥으로 淸熱解毒, 消腫 효능이 있는 약재를 가하면 금은화와 포공영 조합의 효능을 더욱 증강시킬 것이라고 사료하여 익모초를 추가하여 실험을 진행하였다. 다양한 염증성 질환에 사용가능성을 확인하기 위해 어느 병증이나 쉽게 적용할 수 있도록 포공영, 금은화, 익모초를 1:1:1로 혼합하여 실험을 진행

하였고, 물에 한약재를 달여 湯藥을 제공하므로 추출 용매를 물로 설정하여 열수 추출하였다.

포공영, 금은화, 익모초 혼합물의 polyphenol 및 flavonoid 총 함량을 측정하였고, 항산화 효과를 확인하기 위해 혼합물의 FRAP assay, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능을 측정하였다. 항염증 효과를 확인하기 위해 LPS로 염증반응을 유도한 RAW264.7 세포에 혼합물을 처리하여 ROS, NO, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2, MAPKs (ERK, JNK, p38)의 생성량을 측정하여 유의미한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시료

실험에 사용한 포공영, 금은화, 익모초 혼합물 (*Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt, *Lonicera japonica* Thunberg, *Leonurus japonicus* Houtt. complex 이하, TLL)을 구성하는 약재는 대전 한약국에서 구입하였다. 포공영과 익모초는 대한민국, 금은화는 중국이 원산지이며, 모든 약재는 건재로 대전 대학교 한의학과 병리학교실에서 중 동정 및 정선한 후 사용하였다.

#### 2) 시약

시약은 quercetin (Sigma, U.S.A.), ethanol (Merck, Germany), mouse IL-6 ELISA kit (Komabiotech, Korea), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS : Sigma, U.S.A.), miracle-star™ western blot detection system (Intronbio, Korea), protease inhibitor cocktail (Sigma, U.S.A.), ultrapure bovine serum albumin (BSA : GenDEPOT, U.S.A.), NO (Nitric Oxide) plus detection kit (Intronbio, Korea), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck., Germany), lipopolysaccharides from *Escherichia*

*coli* O111:B4 (Sigma, U.S.A.), gallic acid (Sigma, U.S.A.), easy-spin™ total RNA extraction kit (Intronbio, Korea), trypan blue (Sigma, U.S.A.), qPCR BIO SyGreen Blue Mix Lo-ROX (PCR Biosystems, U.S.A.), Pierce™ BCA protein assay Kit (Thermo Fisher, U.S.A.), EZ-cytox (Daeilab, Korea), peroxidase-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson immunoresearch, U.S.A.), DEPC-DW (Bioneer, Korea), phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma, U.S.A.), mouse TNF-alpha ELISA kit (Komabiotech, Korea), aluminum nitrate nonahydrate (Sigma, U.S.A.), 10X Tris-Glycine-SDS buffer (Intronbio, Korea), sample buffer (Laemmli's 5x) (ELPISbiotech, Korea), potassium acetate solution (Sigma, U.S.A.), RIPA lysis and extraction buffer (Thermo Fisher, U.S.A.), 0.5M Tris-HCl, fetal bovine serum (FBS : Gibco, U.S.A.), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), sodium carbonate (Sigma, U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH : Sigma, U.S.A.), Acrylamide-Bis Solution 30%, 29:1 (Intronbio, Korea), phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma, U.S.A.), peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson immunoresearch, U.S.A.), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM : Gibco, U.S.A.), 10% ammonium persulfate (Thermo Fisher, U.S.A.), p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb (Cell signaling, U.S.A.), p38 MAPK Antibody (Cell signaling, U.S.A.), 10X TBS with Tween 20 (Intronbio, Korea), Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP® Rabbit mAb (Cell signaling, U.S.A.), 1.5M Tris-HCl, penicillin-streptomycin (Sigma, U.S.A.), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb (Cell signaling, U.S.A.), pH 8.8 w/SDS (Intronbio,

Korea), aluminum nitrate nonahydrate (Sigma, U.S.A.), mouse IL-1 beta ELISA kit (Komabiotech, Korea), DEPC-DW (Bioneer, Korea), accupower® cyclescript RT premix (dT20) (Bioneer, Korea), pH 6.8 w/SDS (Intronbio, Korea), SAPK/JNK Antibody (Cell signaling, U.S.A.), 10X transfer Buffer (Intronbio, Korea), TEMED (Bio-RAD, U.S.A.), GangNam-STAIN™ prestained protein ladder (Intronbio, Korea), Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) Mouse mAb (Cell signaling, U.S.A.) 등을 사용하였다.

### 3) 기기

기기는 heating mantle with stirring for extraction apparatus (Misung scientific, Korea), centrifuge (Hanil, Korea), freeze dryer (Ilshin biobase, Korea), fursion FX (Vilber, U.S.A.), clean bench (Vision scientific, Korea), deep-freezer (Sanyo, Japan), mini trans-Blot (Bio-RAD, U.S.A.), ice-maker (Brema, Australia), CO<sub>2</sub> incubator (Sanyo, Japan), rotary vacuum evaporator (EYELA FDU-540, Japan), alpha cycler 1 PCRmax (PCRmax, U.K.), vortex mixer (Vision scientific, Korea), nanodrop (Thermo Fisher, U.S.A.), Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany), microplate reader (Molecular Devices, U.S.A.), autoclave (Sanyo, Japan), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료 추출

포공영, 금은화, 익모초 한약재를 1:1:1 중량비로 배합한 혼합물 30g에 500 ml의 증류수를 넣은 후 3 시간 동안 환류추출 하였다. 추출물을 여과지로 여과한 이후 rotary vacuum evaporator를 통해 감압 농축을 하였고 freeze dryer로 동결건조를 진행하여 6.86 g (수득률 22.87%)의 분말을 얻었고, 초저온

냉동고 (-80℃)에 보관하였다. 증류수에 분말을 희석해 실험에 필요한 농도로 만들어 사용하였다.

### 2) 항산화 효능 평가

#### ① 총 polyphenol 함량 측정

TLL을 1 mg/ml 농도로 준비하였으며, TLL 1 ml에 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 첨가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 1 ml의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액과 7.5 ml의 증류수를 차례대로 혼합하여 30분간 정지시킨 후 14,000 g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 얻어 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. phenol의 총 함량은 gallic acid를 표준물질로 사용해서 작성한 검량선에 따라 구하였다.

#### ② 총 flavonoid 함량 측정

TLL을 1 mg/ml 농도로 준비하였으며, 80% ethanol 0.9 ml에 TLL 0.1 ml를 혼합하여 혼합물을 만들었다. 혼합물 0.5 ml를 10% aluminium nitrate 1 M, 80% ethanol 4.3 ml, potassium acetate 0.1 ml를 가하여 실온에 40분을 방치한 이후 415 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, quercetin을 표준물질로 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

#### ③ DPPH radical 소거능 측정

TLL이 1, 10, 100, 1000 µg/ml가 되도록 희석시켰다. 0.2 mM의 DPPH를 ethanol에 녹인 용액 150 µl와 TLL을 100 µl씩 혼합하여 30분 동안 37℃에서 반응시켰다. 반응 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군은 증류수를, DPPH 용액의 대조군은 ethanol을 넣어 보정 값을 얻었다. 다음 식을 이용하여 DPPH radical 소거능을 구하였다.

$$\text{소거능(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

④ ABTS radical 소거능 측정

TLL이 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 희석시켰다. ABTS 용액은 2.6 mM의 potassium persulfate와 7.4 mM의 ABTS를 제조한 이후, 하루 동안 암소에 방치하여 양이온 (ABTS<sup>+</sup>)을 형성시켰다. 그 다음 732 nm의 파장에서 1.5 이하의 흡광도 값이 나오도록 희석시켰다. 희석된 ABTS<sup>+</sup> 용액 150  $\mu\text{l}$ 와 TLL을 5  $\mu\text{l}$ 씩 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 뒤, 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS의 대조군은 증류수를 사용하였고, 다음 식을 이용하여 ABTS radical 소거능을 구하였다.

$$\text{소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

⑤ FRAP 활성 측정

40 mM HCl, 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6)에 용해시킨 10 mM TPTZ와 20 mM FeCl<sub>3</sub>를 각각 10:1:1 비율로 혼합해 FRAP reagent를 준비하였다. 그 후 15 ml tube에 1, 5, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도의 TLL 100  $\mu\text{l}$ 와 증류수 900  $\mu\text{l}$ 를 넣어 혼합한 용액에 FRAP reagent 2 ml를 가하여 암실에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 후 593 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, FeSO<sub>4</sub>를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 항산화능을 구하였다.

3) 세포배양

37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 조건의 세포배양기에서 DMEM 배지를 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum으로 조성하여 RAW264.7 세포를 배양하였고, 계대배양은 2-3일 간격으로 수행하였다.

4) 세포생존율 측정

24시간 동안 24 well plate에 RAW264.7 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 배양하였다. 24시간 후, TLL을 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석시켜 다시 24시간

동안 배양하였고, EZ-Cytox 용액을 세포배양액 100  $\mu\text{l}$ 당 10  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 세포배양기에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 증류수를 사용하였고, 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 나타내었다.

5) ROS 생성량 측정

24시간 동안 24 well plate에 RAW264.7 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 배양하였다. 이후 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$  TLL과 100 ng/ml LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였고, 5분 동안 1200 rpm에서 원심분리하여 모은 세포를 차가운 PBS를 사용해서 2회 세척하였고, DCF-DA를 10  $\mu\text{M}$ 이 되도록 첨가하여 30분 동안 상온에서 암소에 두었다. 염색한 후에 차가운 PBS를 넣어 5분 동안 1200 rpm에서 원심분리한 다음 상등액을 제거하였다. 다시 PBS 400  $\mu\text{l}$ 를 부유시켰고, 유세포 분석기를 사용하여 형광강도를 측정하였다. 대조군은 증류수를 사용하였고, 대조군에 대한 형광강도 세기에 따른 변화를 백분율로 나타내었다.

6) NO 생성량 측정

24시간 동안 24 well plate에 RAW264.7 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 배양하고 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$  TLL과 100 ng/ml LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포배양액 100  $\mu\text{l}$ 를 96 well plate에 넣고 N1 buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 처리하여 10분 동안 상온에서 반응시킨 후, N2 buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 처리하여 10분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후, 540 nm의 파장에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조군은 증류수를 사용하였고, NO 생성량을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

7) 바이오마커 생성량 측정

24시간 동안 6 well plate에 RAW264.7 세포를  $3 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 배양하고 TLL 50,

100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 LPS 100  $\text{ng}/\text{ml}$ 를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후, 96 well plate에 세포 배양액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 후 plate에 있는 시약을 버리고 washing buffer로 4회 세척하였고, detection antibody를 100  $\mu\text{l}$ 씩 추가하여 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 plate에 streptavidin-HRP를 100  $\mu\text{l}$ 씩 추가하여 30분간 상온에서 반응시켰다. 반응 후 각 well에 pink-ONE solution 또는 TMB 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 15분 동안 반응시킨 다음 stop solution 100  $\mu\text{l}$ 를 추가하여 microplate reader를 통해 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였고, 대조군은 증류수를 사용하여 standard curve를 기준으로 절대값을 나타내었다.

## 8) 유전자 발현량 측정

### ① RNA 추출

24시간 동안 6 well plate에 RAW264.7 세포를  $3 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 배양하고 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TLL과 100  $\text{ng}/\text{ml}$  LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포에 1 ml의 easy blue와 200  $\mu\text{l}$ 의 chloroform을 넣고 vortexing 해준 다음, 4°C에서 10분 동안 13000 rpm에서 원심분리 하였다. 실온에서 1분 동안 binding buffer 400  $\mu\text{l}$ 를 상층액 400  $\mu\text{l}$ 와 반응시킨 후, column에 반응액 700  $\mu\text{l}$ 를 주입하여 30초 동안 13000 rpm에서 원심분리 하였다. Washing buffer A 700  $\mu\text{l}$ 를 Column에 넣고 30초 동안 13000 rpm에서 원심분리 후, washing buffer B 700  $\mu\text{l}$ 를 넣고 동일하게 원심분리 하였다. Column 하단부를 1.5 ml tube로 교체하고, elution buffer 30  $\mu\text{l}$ 를 column에 넣고 1분 동안 반응시킨 뒤, 다시 1분 동안 13000 rpm에서 원심분리를 하여 total RNA를 추출하였다.

### ② cDNA 합성

역전사 (reverse transcription, RT) 반응은 RT premix kit의 mixture (reaction buffer, stabilizer,

dNTPs mixture, RNase inhibitor, oligo dT15 primer)를 이용하여 total RNA를 1  $\mu\text{g}$  넣고, 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 DEPC-DW를 첨가하였다. 혼합액을 잘 섞은 뒤, 60분 동안 45°C에서 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였고, 5분 동안 95°C에서 정치시킨 후, M-MLV RT를 불활성화시키고, 증합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 합성이 완료된 cDNA에 사용하였다.

### ③ 유전자 증폭

Real-time PCR을 통해 합성이 완료된 cDNA를 증폭시키고자 하였다. SYBR Green 10  $\mu\text{l}$ , DEPC-DW 5  $\mu\text{l}$ , primer 2  $\mu\text{l}$ , cDNA 1  $\mu\text{l}$ 를 Real-time 전용 tube에 넣고 2분 동안 95°C에서 반응시킨 다음 5초 동안 95°C에서, 30초 동안 62.5°C에서 반응시키는 것을 40회 반복하여 유전자를 증폭시켰다. Target gene (iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2) 및 reference gene (housekeeping gene:  $\beta$ -actin)의 유전자 증폭량 (Ct)을 분석하고, Target gene의 유전자 발현량은  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method을 사용하여 상대정량 하였다 (Table 1).

### 9) 단백질 발현량 측정

24시간 동안 6 well plate에 RAW264.7 세포를  $3 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 배양하였다. 배양 후 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TLL과 100  $\text{ng}/\text{ml}$  LPS를 처리한 뒤, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II, phosphatase inhibitor III가 포함된 RIPA buffer를 첨가하여 단백질을 추출하였다. pierce BCA protein assay kit를 사용하여 추출한 단백질을 정량하였고, sample loading buffer를 혼합하여 5분 동안 95°C에서 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질을 크기별로 분리하기 위하여 10% acrylamide gel을 통해 SDS-PAGE를 진행하였고, PVDF membrane에 이 동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane을 5% BSA에

답가 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후, TBS-T buffer를 이용하여 3회 세척한 후,  $\beta$ -actin (1:5000) first antibody, p-JNK (1:2000), JNK (1:1000), p-ERK (1:2000), ERK (1:1000), p-p38 (1:1000), p38 (1:1000)를 넣어 14시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 다시 5회 세척하여 secondary antibody (1:10000)를 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시켰으며, 다시 10회를 세척한 후, ECL solution을 사용하여 단백질을 발색시켰고, chemidoc fusion FX를 이용하여 단백질 발현량을 분석하였다. 대조군은 증류수를 사용하였고, 단백질 발현량을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

### 3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 21.0을 이용하여 mean±standard error of mean으로 나타내었다. ANOVA를 이용하여 다중 비교하였고, 유의성은 Tukey's HSD test를 통하여  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  수준에서 검정하였다.

## 실험 결과

### 1. 총 polyphenol 함량 및 총 flavonoid 함량

#### 1) 총 polyphenol 함량

표준물질로 Gallic acid를 사용하여 TLL의 총 polyphenol의 함량을 측정된 결과,  $58.03 \pm 1.02$  mg GAE<sup>#</sup>/g으로 나타났다 (<sup>#</sup>Total polyphenol contents were expressed as milligram of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract).

#### 2) 총 flavonoid 함량

표준물질을 Quercetin으로 사용하여 TLL의 총 flavonoid의 함량을 측정된 결과,  $16.58 \pm 0.60$  mg QE<sup>##</sup>/g으로 나타났다 (<sup>##</sup>Total flavonoid contents were expressed as milligram of quercetin equivalent (QE) per gram of extract).

### 2. 항산화 효능평가

#### 1) DPPH radical 소거능

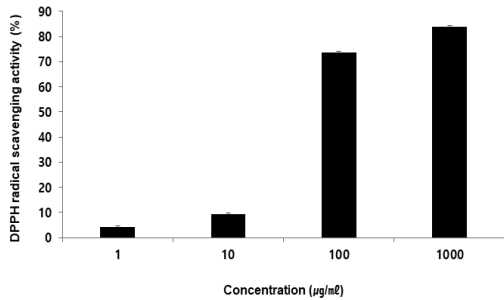
DPPH radical 소거능을 실험한 결과, TLL 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/ml에서 각각  $4.33 \pm 0.39$ ,  $9.38 \pm 0.47$ ,  $73.57 \pm 0.62$ ,  $83.93 \pm 0.36$  % 로 농도 의존적인 소거능의 증가가 나타났다 (Fig. 1).

#### 2) ABTS radical 소거능

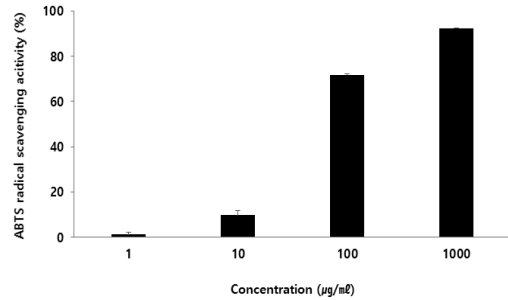
ABTS radical 소거능을 실험한 결과, TLL 1, 10,

Table 1. The Sequence of Primers in Real-Time PCR

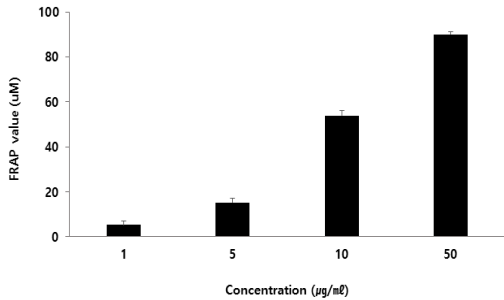
Primer	Forward / Reverse	Sequence (5'→3')
iNOS	Forward	CGAAACGCTTCACTTCCAA
	Reverse	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
IL-1 $\beta$	Forward	AAGAAGAGCCCATCTCTGT
	Reverse	GGAGCCTGTAGTGCATTGT
IL-6	Forward	AGTCCTTCTACCCCAATTTCC
	Reverse	GGTCTTGGTCCTTAGCCACT
TNF- $\alpha$	Forward	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT
	Reverse	TTTGCTACGACGTGGGCTAC
COX-2	Forward	AACCGCATTGCCTCTGAAT
	Reverse	CATGTTCCAGGAGGATGGAG
$\beta$ -actin	Forward	AGGGAAATCGTGCGTGACAT
	Reverse	TCCAGGGAGGAAGAGGATGC



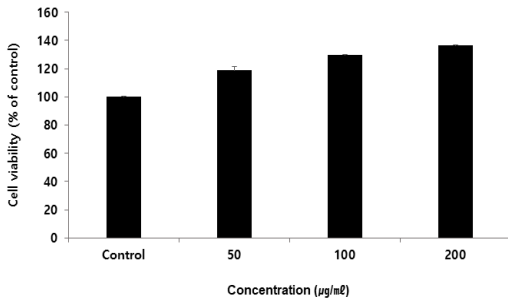
**Fig. 1.** DPPH Radical Scavenging Activity of TLL  
Each concentration (1, 10, 100, and 1000 µg/ml) of TLL was incubated with DPPH solution for 30 min. Activities were determined by measuring absorbance at 517 nm. The results were provided as mean ± SEM (n=3)



**Fig. 2.** ABTS Radical Scavenging Activity of TLL  
Each concentration (1, 10, 100, and 1000 µg/ml) of TLL was incubated with ABTS solution for 10 min. Activities were determined by measuring absorbance at 732 nm. The results were provided as mean ± SEM (n=3)



**Fig. 3.** FRAP Value of TLL.  
Each concentration (1, 5, 10, and 50 µg/ml) of TLL was incubated with FRAP reagent solution for 30 min. Activities were determined by measuring absorbance at 593 nm. The results were provided as mean ± SEM (n=3)



**Fig. 4.** Cell viability of TLL in RAW264.7 cell.  
RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 µg/ml) of TLL for 24 h. EZ-Cytox was added to treated cells and reacted for 30 min, thereafter microplate reader was used for measuring absorbance of the solution at 450 nm. Cell viability was calculated as percentage with regard to the control. The results were provided as mean ± SEM (n=3)

100, 1000 µg/ml에서 각각 1.19±1.17, 9.83±2.07, 71.84±0.33, 92.47±0.15 % 로 농도 의존적인 소거능의 증가가 나타났다 (Fig. 2).

### 3) FRAP 활성

FRAP 활성을 실험한 결과, TLL 1, 5, 10, 50 µg/ml에서 각각 5.41±1.47, 15.31±1.94, 53.94±2.10, 90.00±1.03 µM로 농도 의존적인 FRAP 활성의 증가가 나타났다 (Fig. 3).

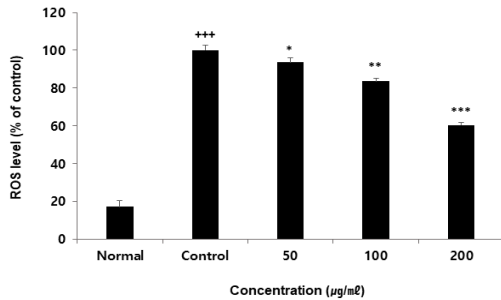
### 3. 세포생존율

세포생존율을 측정된 결과, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서는 각각 118.95±2.43, 129.59±0.64, 136.34±0.54 %로 50 µg/ml 이상의 농도에서 세포를 농도의존적으로 증식시켰다 (Fig. 4).

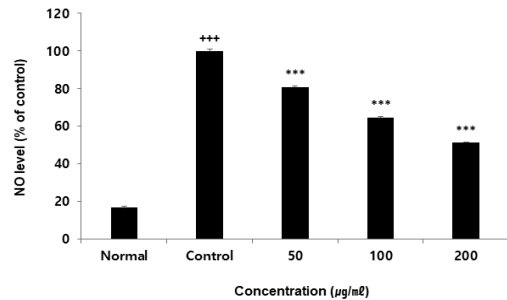
### 4. ROS 생성량

ROS 생성량을 측정된 결과, 정상군에서는 17.26 ±3.36 %, 대조군에서는 100.00±2.68 %, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각각 93.53±2.32, 83.49±1.82,





**Fig. 5.** Effect of TLL on ROS level in RAW264.7 cell  
RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100 and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. ROS levels were calculated as percentage with regard to the control. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, \*\*\*: p<0.001 compared to normal, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



**Fig. 6.** Effect of TLL on NO level in RAW264.7 cell  
RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100 and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. NO levels were calculated as percentage with regard to the control. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, \*\*\*: p<0.001 compared to normal, \*\*\*: p<0.001 compared to control).

60.42±1.38 %로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50 µg/ml 이상의 농도에서 유의미한 ROS 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 5).

## 5. NO 생성량

NO 생성량을 측정된 결과, 정상군에서는 16.59 ±0.86 %, 대조군에서는 100.00±0.82 %, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각각 80.78±0.40, 64.61±0.54, 51.23±0.05 %로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50 µg/ml 이상의 농도에서 유의미한 NO 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 6).

## 6. 바이오마커 생성량

### 1) PGE<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정된 결과, 정상군에서는 113.42±8.89 pg/ml, 대조군에서는 446.37±8.77 pg/ml, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각각 425.01±13.63, 323.17 ±12.72, 282.59±14.08 pg/ml로 TLL은 대조군과 비교했을 때 100 µg/ml 이상의 농도에서 유의미한 PGE<sub>2</sub> 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 7).

### 2) IL-1β

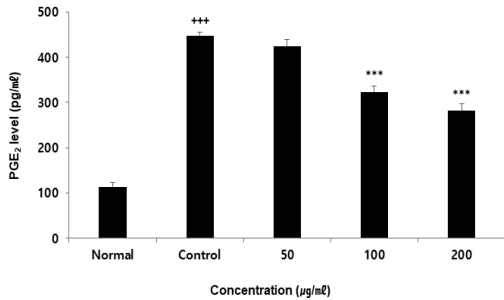
IL-1β 생성량을 측정된 결과, 정상군에서는 26.47 ±0.45 pg/ml, 대조군에서는 358.20±14.53 pg/ml, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각각 231.83±20.62, 198.32±11.67, 158.35±24.60 pg/ml로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50 µg/ml 이상의 농도에서 유의미한 IL-1β 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 8).

### 3) IL-6

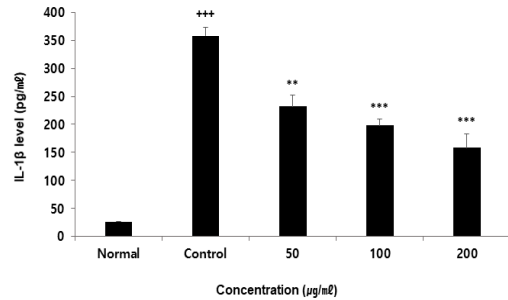
IL-6 생성량을 측정된 결과, 정상군에서는 5.73 ±0.29 pg/ml, 대조군에서는 24270.88±2858.22 pg/ml, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각각 20723.95±960.56, 19548.45±475.09, 17314.85±472.33 pg/ml로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50 µg/ml 이상의 농도에서 유의미한 IL-6 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 9).

### 4) TNF-α

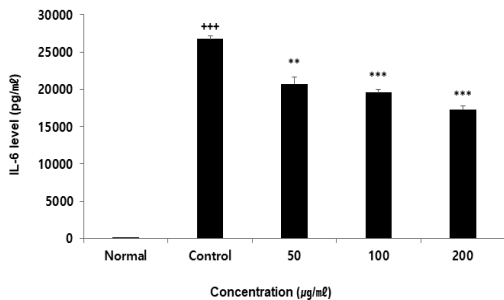
TNF-α 생성량을 측정된 결과, 정상군에서는 64.37 ±3.71 pg/ml, 대조군에서는 60950.07±3607.11 pg/ml, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각각 51834.47±5181.02, 42840.53±4158.75, 41543.67±2783.23 pg/ml로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50 µg/ml 이상의



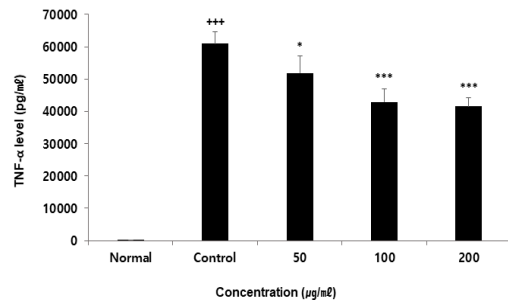
**Fig. 7.** Effect of TLL on PGE<sub>2</sub> level in RAW264.7 cell  
RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse PGE<sub>2</sub> ELISA kit. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



**Fig. 8.** Effect of TLL on IL-1β level in RAW264.7 cell  
RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse IL-1β ELISA kit. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



**Fig. 9.** Effect of TLL on IL-6 level in RAW264.7 cell  
RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse IL-6 ELISA kit. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



**Fig. 10.** Effect of TLL on TNF-α level in RAW264.7 cell  
RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse TNF-α ELISA kit. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*: p<0.05, \*\*\*: p<0.001 compared to control).

농도에서 유의미한 TNF-α 생성량의 감소가 나타났 다 (Fig. 10).

군과 비교했을 때 50 µg/ml 이상의 농도에서 유의미 한 iNOS 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 11).

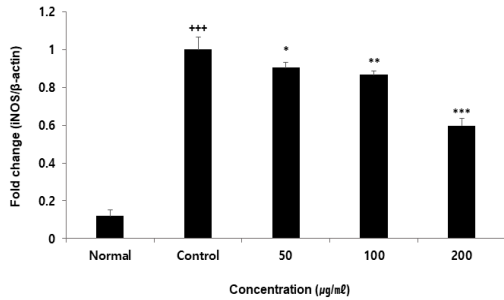
## 7. 유전자 발현량

### 1) iNOS

iNOS 유전자 발현량을 측정한 결과, iNOS/β-actin 값은 정상군에서는 TLL은 0.12±0.03, 대조군 에서는 1.00±0.07, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각 각 0.90±0.03, 0.87±0.02, 0.60±0.04로 TLL은 대조

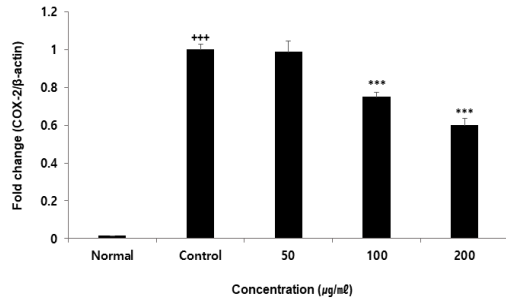
### 2) COX-2

COX-2 유전자 발현량을 측정한 결과, COX-2/β-actin의 값은 정상군에서는 TLL은 0.01±0.00, 대조 군에서는 1.00±0.03, TLL 50, 100, 200 µg/ml에서 각각 0.99±0.06, 0.75±0.02, 0.60±0.03로 TLL은 대 조군과 비교했을 때 100 µg/ml 이상의 농도에서 유의



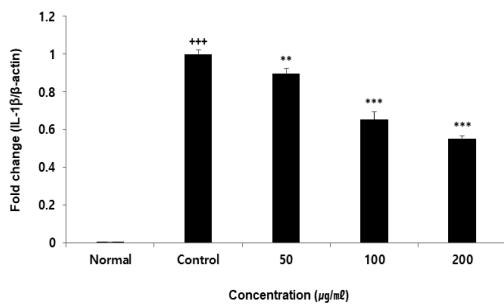
**Fig. 11.** Effect of TLL on iNOS mRNA expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 μg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. The mRNA levels of iNOS expression were measured by polymerase chain reaction. The normal group was not treated LPS. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



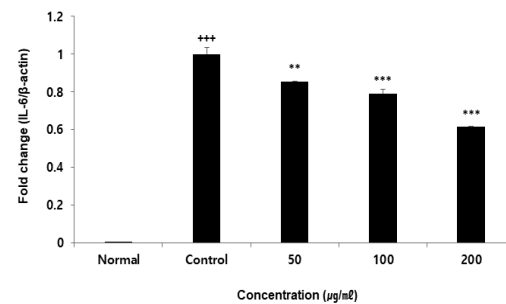
**Fig. 12.** Effect of TLL on COX-2 mRNA expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 μg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. The mRNA levels of COX-2 expression were measured by polymerase chain reaction. The normal group was not treated LPS. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



**Fig. 13.** Effect of TLL on IL-1β mRNA expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 μg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. The mRNA levels of IL-1β expression were measured by polymerase chain reaction. The normal group was not treated LPS. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



**Fig. 14.** Effect of TLL on IL-6 mRNA expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 μg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. The mRNA levels of IL-6 expression were measured by polymerase chain reaction. The normal group was not treated LPS. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 compared to control).

미한 COX-2 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 12).

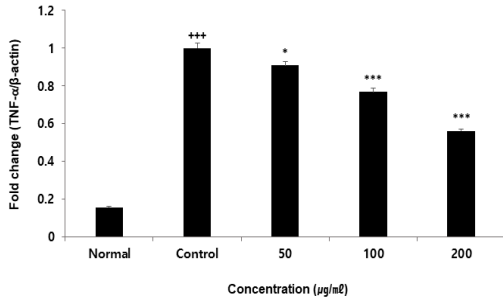
### 3) IL-1β

IL-1β 유전자 발현량을 측정한 결과, IL-1β/β-actin의 값은 정상군에서는 TLL은 0.00±0.00, 대조군에서는 1.00±0.02, TLL 50, 100, 200 μg/ml에서 각각 0.90±0.03, 0.65±0.04, 0.55±0.01로 TLL은 대

조군과 비교했을 때 50 μg/ml 이상의 농도에서 유의미한 IL-1β 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 13).

### 4) IL-6

IL-6 유전자 발현량을 측정한 결과, IL-6/β-actin의 값은 정상군에서는 TLL은 0.00±0.00, 대조군에서는 1.00±0.04, TLL 50, 100, 200 μg/ml에서 각각



**Fig. 15.** Effect of TLL on TNF- $\alpha$  mRNA expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of TLL with 100  $\text{ng}/\text{ml}$  LPS for 24 h. The mRNA levels of TNF- $\alpha$  expression were measured by polymerase chain reaction. The normal group was not treated LPS. The results were provided as mean  $\pm$  SEM (n=3) (Significance of results, \*\*\*:  $p < 0.001$  compared to normal, •:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  compared to control).

0.85 $\pm$ 0.00, 0.79 $\pm$ 0.02, 0.61 $\pm$ 0.00로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 유의미한 IL-6 생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 14).

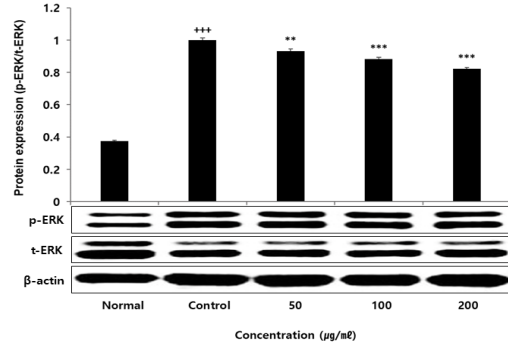
### 5) TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  유전자 발현량을 측정된 결과, TNF- $\alpha/\beta$ -actin의 값은 정상군에서는 TLL은 0.15 $\pm$ 0.01, 대조군에서는 1.00 $\pm$ 0.03, TLL 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 0.91 $\pm$ 0.02, 0.77 $\pm$ 0.02, 0.56 $\pm$ 0.01로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 유의미한 TNF- $\alpha$  생성량의 감소가 나타났다 (Fig. 15).

## 8. 단백질 발현량

### 1) ERK

ERK 단백질 발현량을 측정된 결과, p-ERK/t-ERK의 값은 정상군에서는 TLL은 0.38 $\pm$ 0.00, 대조군에서는 1.00 $\pm$ 0.01, TLL 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 0.93 $\pm$ 0.01, 0.88 $\pm$ 0.01, 0.82 $\pm$ 0.01로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 유의미한 ERK 단백질 발현량의 감소가 나타났다 (Fig. 16).



**Fig. 16.** Effect of TLL on ERK protein expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of TLL with 100  $\text{ng}/\text{ml}$  LPS for 24 h. The total cell extracts were subjected to western blot and 10% SDS-PAGE analysis with the respective primary and secondary antibodies. The results were provided as mean  $\pm$  SEM (n=3) (Significance of results, \*\*\*:  $p < 0.001$  compared to normal, \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  compared to control).

### 2) JNK

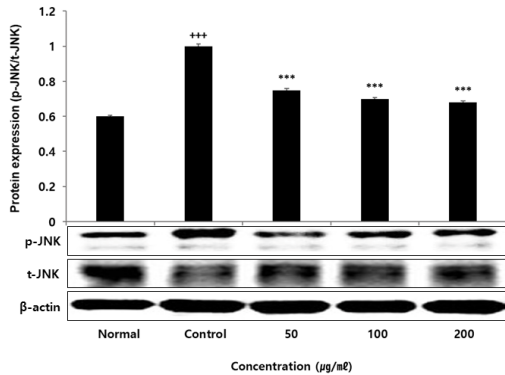
JNK 단백질 발현량을 측정된 결과, p-JNK/t-JNK의 값은 정상군에서는 TLL은 0.60 $\pm$ 0.01, 대조군에서는 1.00 $\pm$ 0.01, TLL 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 0.75 $\pm$ 0.01, 0.70 $\pm$ 0.01, 0.68 $\pm$ 0.01로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 유의미한 JNK 단백질 발현량의 감소가 나타났다 (Fig. 17).

### 3) p38

p38 단백질 발현량을 측정된 결과, p-p38/t-p38의 값은 정상군에서는 TLL은 0.09 $\pm$ 0.01, 대조군에서는 1.00 $\pm$ 0.01, TLL 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 0.91 $\pm$ 0.01, 0.91 $\pm$ 0.01, 0.88 $\pm$ 0.01로 TLL은 대조군과 비교했을 때 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 유의미한 p38 단백질 발현량의 감소가 나타났다 (Fig. 18).

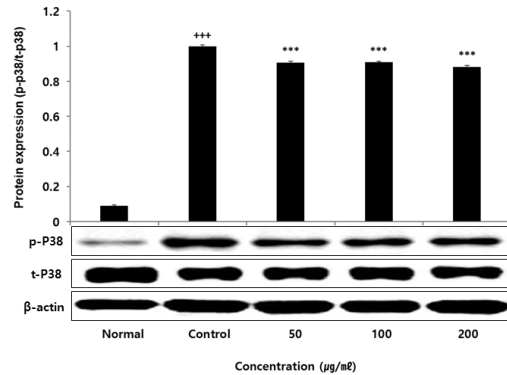
## 고찰

ROS는 활성산소를 포함하는 용어로 singlet oxygen ( $\text{O}_2$ ), superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ), hydroxyl



**Fig. 17.** Effect of TLL on JNK protein expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. The total cell extracts were subjected to western blot and 10% SDS-PAGE analysis with the respective primary and secondary antibodies. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*\*: p<0.001 compared to control).



**Fig. 18.** Effect of TLL on p38 protein expression level in RAW264.7 cell

RAW264.7 cells were treated by each concentration (50, 100, and 200 µg/ml) of TLL with 100 ng/ml LPS for 24 h. The total cell extracts were subjected to western blot and 10% SDS-PAGE analysis with the respective primary and secondary antibodies. The results were provided as mean ± SEM (n=3) (Significance of results, +++: p<0.001 compared to normal, \*\*\*: p<0.001 compared to control).

radical ( $\cdot\text{OH}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 등을 가리킨다. 그 중 hydroxyl radical은 DNA 염기서열에 산화 손상을 입혀 특히 더 위험하며 다양한 메커니즘을 통해 생성될 수 있다<sup>27</sup>). ROS는 염증 매개물질로 세포 신호전달, 염증성 사이토카인의 생성 및 방출의 활성화, 염증반응을 지속시킨다<sup>28</sup>). 때문에 체내 항산화 반응에 이상이 생겨 과잉 생성된 ROS 제거가 적절하게 이루어지지 않으면 산화스트레스가 유발되어 세포의 기능 소실과 사멸을 초래한다<sup>2</sup>). 합성 항산화제인 Troxal-C, BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) 등이 개발되었으나 발암 등의 부작용이 있으며<sup>29</sup>), NSAIDs는 위장관계 부작용을 빈번히 유발하여 NSAIDs의 대체제로 COX-2 선택적 억제제가 개발되었으나 뇌졸중, 부종, 고혈압, 심근경색, 심부전 등 부작용을 초래할 수 있어<sup>7,8</sup>), 안전한 항산화 및 항염증제가 요구되는 상황이다.

포공영의 주요성분은 taraxasterol, taraxerol, taraxacerin, taraxacin, Vit-A, B, D 등이 함유되어 있고<sup>19</sup>), 淸熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋의 효능이 있어

目赤, 咽痛, 乳癰, 腸癰, 疔瘡腫毒, 외과의 각종 熱毒癰腫 등을 치료하는 약재이다<sup>12</sup>). 피부의 화농성감염, 급성 호흡기감염, 이하선염, 편도선염, 급성 유선염, 위염 등에 사용된다<sup>30</sup>). 관련 연구로는 염증성 사이토카인의 생성 저해<sup>13</sup>), 유방암세포의 증식억제와 NO 생성 저해 및 iNOS의 발현 억제<sup>15</sup>), RBL-2H3 비만세포의 탈과립 억제를 통한 항알레르기 효과<sup>16</sup>) 등이 있다.

금은화의 주요 성분은 chlorogenic계 화합물이며, inositol, saponin, flavonoid 화합물인 luteolin 등이 함유되어 있다<sup>19,30</sup>). 淸熱解毒, 涼散風熱, 涼血止痢의 효능이 있고, 熱毒瘡癰을 치료하는 要藥이다. 風熱感冒, 溫病發熱, 喉痹, 丹毒, 癰腫疔瘡, 熱毒血痢 등을 치료하며<sup>12</sup>), 상기도 감염증, 피부 화농성 감염, 부인과 감염증 등에 사용된다<sup>30</sup>). 관련 연구로는 glutamate에 의한 신경세포 사멸 보호<sup>17</sup>), 인간 제대정맥 내피세포 (HUVEC)에서 죽상동맥경화증과 관련된 염증인자 발현 억제<sup>31</sup>), MIF 활성을 조절하여 COX-2 및 MMP-9의 생성 억제를 통한 류마티스성 관절염 치

료효과<sup>18)</sup> 등이 있다.

익모초는 주로 alkaloids를 함유하고 그 중 leonurine이 주성분이며, 그 외에 arginine, leosibirin, isoleosibirin이 함유되어 있다<sup>30)</sup>. 活血調經, 利水消腫의 효능이 있어 月經不調, 痛經, 閉經, 惡露不盡, 水腫尿少를 치료하고<sup>12)</sup>, 급성신장부종, 관상동맥질환, 고혈압, 생리불순 등에 사용된다<sup>30)</sup>. 익모초는 위에서 분비되는 PGE<sub>2</sub>의 농도 증가시키고 선상피세포 및 점막표피세포의 손상과 울혈을 예방하며<sup>20)</sup>, 염증인자 및 염증성 단백질의 발현을 감소시키는 효능이 보고되었다<sup>10)</sup>. 라디칼 소거능 실험에서 농도 의존적인 항산화 효과가 확인되었고, 고농도의 익모초 추출물에서 Vit-C와 비교하여 유의미한 SOD활성이 확인되었다<sup>32)</sup>.

상기 내용처럼 본 연구에서 사용된 포공영, 금은화, 익모초는 단독 사용 시 항산화 및 항염증에 효능이 있음이 선행연구들을 통해 확인되었다.

이에 저자는 세 가지 천연 복합물의 항산화 및 항염증 효과를 확인하고자 항산화 효능평가, 세포생존율, ROS 생성량, NO 생성량, 바이오마커 생성량, 유전자 발현량, 단백질 발현량을 측정하였다.

본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW264.7 세포를 대상으로 하였다. 대식세포를 LPS로 자극하면 염증 반응에 관련된 전사인자가 활성화되어 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO 등의 사이토카인 분비가 증가한다<sup>33)</sup>. 그러므로 항염증 관련 실험에서 LPS를 처리하여 염증 반응이 유도된 RAW264.7 세포를 다용하고 있다.

RAW264.7 세포에 TLL을 처리하여 세포생존율을 측정된 결과, TLL 50  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 농도 의존적인 세포의 증식이 나타났다. 모든 농도에서 100% 이상의 세포생존율이 나타난 것으로 보아 TLL은 RAW264.7 세포에 대한 독성이 없음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

항염증 및 항산화 물질로 알려진 polyphenol과 flavonoid의 총 함량을 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하여 TLL에 존재하는 총 polyphenol 함량

은 58.03 $\pm$ 1.02 mg GAE/g이었다. 최 등<sup>10)</sup>은 익모초 ethanol 추출물의 polyphenol 함량이 51.40 $\pm$ 0.10 mg GAE/g임을 보고하였고, 신 등<sup>34)</sup>은 금은화의 열수 추출물에서 polyphenol 함량이 56.5 $\pm$ 4.9 mg GAE/g임을 보고했다. Quercetin을 표준물질로 하여 TLL에 존재하는 총 flavonoid 함량은 16.58 $\pm$ 0.60 mg QE/g으로 나타났다. 이<sup>11)</sup>는 금은화의 flavonoid 함량은 12.10 mg QE/g임을 보고했다. 이상의 결과와 비교했을 때 flavonoid와 polyphenol의 추출 함량이 일부 단일 약재보다는 TLL 혼합물이 조금 더 높으나 추출 조건에 따라서 함량의 차이가 있을 수 있다고 판단된다.

대표적인 항산화 실험인 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, FRAP assay를 통해 항산화 효과를 측정하였다. DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정된 결과, TLL은 농도 의존적인 소거능의 증가가 나타났으며 100  $\mu$ g/ml에서 급격한 증가를 보였고, 1000  $\mu$ g/ml에서 각각 83.93%, 92.47%의 소거능을 보였다 (Fig. 1, 2). FRAP 활성을 측정된 결과, TLL은 농도 의존적인 FRAP 활성의 증가가 나타났으며 50  $\mu$ g/ml에서 90%의 활성이 나타났다 (Fig. 3). 이상의 결과로 보아 TLL은 유의미한 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다.

활성화된 대식세포에 의해 생성되는 NO와 ROS는 미생물 사멸에 중요한 역할을 수행하지만<sup>6)</sup>, 과도한 ROS의 생성은 DNA, 단백질, 지질막을 손상시키고, 종양 유발신호가 활성화되면 종양을 촉진하고, 심혈관 질환을 포함한 여러 질병의 원인이 된다<sup>35,36)</sup>. 또한 염증 등의 상황에서 과도하게 생성된 ROS와 NO가 반응할 경우 강력한 세포독성을 나타내는 Peroxynitrite(ONOO-)가 생성된다<sup>37)</sup>. LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 TLL을 처리하여 ROS 생성량과 NO 생성량을 측정된 결과, TLL 50  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났으며, TLL의 농도가 증가할수록 ROS와 NO생성량이 더욱 감소하여, TLL은 세포 내 ROS와 NO 생

성억제를 통한 항산화, 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다 (Fig. 5, 6).

선천면역 혹은 염증반응의 초기 단계에서 만들어지는 염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등은 COX-2의 발현을 유도하여 PGE<sub>2</sub>를 합성시키고<sup>5)</sup>, 시상하부에서 염증세포활성에 관여하는 PGE<sub>2</sub>는 발열을 유발한다<sup>8)</sup>. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 는 감염 조직의 혈관내피세포 변화를 유발하여 혈관은 확장되고 혈류속도는 감소시켜 호중구와 다른 백혈구들이 혈액을 빠져나가 감염부위로 이동하도록 하고, IL-6는 지방세포와 근육세포의 대사를 유도하여 열을 발생시켜 감염 조직의 온도를 상승시킨다. 이러한 염증성 사이토카인의 작용으로 인해 감염부위에 염증상태가 형성된다<sup>38)</sup>. LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 TLL을 처리하고 효소면역분석법(ELISA assay)을 통해 염증성 사이토카인 생성의 미치는 영향을 확인해 보았다. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정한 결과, TLL 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났다. PGE<sub>2</sub>의 생성량을 측정한 결과, TLL 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났다. 따라서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 는 TLL 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상에서, PGE<sub>2</sub>는 TLL 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상에서 항염증 효과를 보이는 것으로 사료된다 (Fig. 7-10).

iNOS(inducible nitric oxide synthase)는 대식세포에서 주로 생성되어 arginine을 NO(nitric oxide)로 변화시킨다<sup>6)</sup>. 염증성 사이토카인에 의해 유도되는 COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 대사하는 효소로 염증, 고열, 통증 등의 기능을 갖으며 염증성 및 활성화된 조직에서 발현된다<sup>8)</sup>. TLL이 항염증에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 TLL을 처리한 후, RNA를 추출하여 역전사 반응을 일으켜 cDNA를 합성시켰다. 합성시킨 cDNA에 real-time PCR을 진행하여 유전자를 증폭시키고 iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현량을 측정하였다. iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6,

TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현량을 측정한 결과, TLL 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났다. COX-2의 유전자 발현량을 측정한 결과, TLL 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났다. 따라서 TLL은 NO를 생성하는 iNOS, PGE<sub>2</sub>를 합성하는 COX-2와 초기 염증반응에서 중요한 역할을 담당하는 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하는 기전을 통한 항염증 효과가 있을 것으로 사료된다 (Fig. 11-15).

염증성 사이토카인 발현에 중요한 전사인자인 MAPKs(ERK, JNK, p38)는 인산화 되지 않은 상태로 세포질에 존재한다. LPS 등 염증 유발인자의 자극으로 MAPKs가 인산화되면 핵으로 전위하여 염증성 사이토카인의 발현을 증가시킨다<sup>39)</sup>. Chan 등<sup>40)</sup>은 JNK와 ERK경로는 LPS에 의해 iNOS 유도를 증가시키는데 p38이 JNK 및/혹은 ERK의 활성화를 억제하여 NO<sub>2</sub>의 발현을 억제한다 하였으며, Murakami-Mori 등<sup>41)</sup>은 p38은 ERK 1/2에 의해 매개되는 카포시육종 세포의 성장을 억제한다고 밝혔다. LPS를 처리하여 염증반응이 유도된 RAW264.7 세포에 TLL 처리 후 단백질을 추출하여 Western blot analysis 통해 단백질 발현량을 측정하였다. ERK, JNK, p38은 TLL은 대조군과 비교했을 때 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 유의미한 감소가 나타났다. TLL이 염증성 사이토카인의 상위 시그널인 MAPKs의 활성을 억제하는 것으로 보아 항염증 효과를 나타낼 것으로 기대할 수 있다 (Fig. 16-18).

이상의 연구결과를 통하여 TLL의 항산화 및 항염증 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구는 세포 실험이며, 혼합물 내에서의 개별 약제 상호작용에 대한 연구는 부족한 점이 있고, 본 약제들의 배합비에 따른 효능 비교는 추가적인 연구가 필요할 것이라고 사료된다. 또한 dexamethasone과 같은 양성대조군과의 비교를 통해 TLL 효능의 우수성에 대한 후속연구를 기대한다.

## 결론

포공영, 금은화, 익모초 혼합물(TLL)의 항산화 및 항염증 효과를 확인하기 위해 혼합물의 총 polyphenol 및 총 flavonoid 함량, FRAP assay, DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정하고, LPS로 염증반응을 유도한 RAW264.7 세포에 혼합물을 처리하여 ROS, NO, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2, MAPKs (ERK, JNK, p38)의 생성량을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TLL에 존재하는 총 polyphenol과 총 flavonoid의 함량을 측정한 결과, Gallic acid를 표준물질로 하여 TLL에 존재하는 총 polyphenol 함량은 58.03 $\pm$ 1.02 mg GAE/g, Quercetin을 표준물질로 하여 TLL에 존재하는 총 flavonoid 함량은 16.58 $\pm$ 0.60 mg QE/g으로 나타났다.
2. TLL은 농도 의존적인 DPPH radical 소거능 증가, ABTS radical 소거능 증가, FRAP 활성 증가가 나타났다.
3. 세포생존율을 측정한 결과, TLL은 50, 100, 200  $\mu$ g/ml에서 농도 의존적인 세포의 증식이 나타났다.
4. ROS 및 NO생성량을 측정한 결과, TLL은 50, 100, 200  $\mu$ g/ml에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났다.
5. 바이오마커 생성량을 측정한 결과 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 는 TLL 50, 100, 200  $\mu$ g/ml에서, PGE<sub>2</sub>는 TLL 100, 200  $\mu$ g/ml에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났다.
6. 유전자 발현량을 측정한 결과, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 는 TLL 50, 100, 200  $\mu$ g/ml에서 COX-2는 TLL 100, 200  $\mu$ g/ml에서 대조군과 비교했을 때 유의미한 감소가 나타났다.
7. 단백질 발현량을 측정한 결과, JNK, ERK, p38은 TLL 50, 100, 200  $\mu$ g/ml에서 대조군과 비교했을

때 유의미한 감소가 나타났다.

## 참고문헌

1. Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB, & Jeon SH tr. Campbell Biology (10th ed). Seoul: Bio Science. 2016: 202-6.
2. Pack JH, & Kweon GR. (2013). Clinical Applications of Antioxidants. Hanyang Medical Reviews. 33(2), 130-6. <http://dx.doi.org/10.7599/hmr.2013.33.2.130>
3. Coyle JT, & Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science. 262(5134), 689-95. doi: 10.1126/science.7901908
4. Kwag SG, Kwon SY, Kim SK, Min BW, Seo YM, Lee JM, et al. Basic Pathology. Seoul: Jungmunkag. 2010: 84.
5. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Owen JA, & The Korean Society for Microbiology tr. Kuby Immunology (8th ed). Seoul: Panmunedu. 2020: 142-3.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, & Kim PH tr. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System (6th ed). Seoul: Panmunedu. 2020: 35, 44, 47.
7. Park MG, Yoo JD, & Lee KH. (2020). Current Guidelines for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. J Korean Orthop Assoc. 55(1), 9-28. <https://doi.org/10.4055/jkoa.2020.55.1.9>
8. Golan DE, Armstrong EJ, Armstrong AW, & Kim IK tr. Principles of Pharmacology: The pathophysiologic Basis of Drug Therapy (4th ed). Seoul: Shinilbooks. 2017: 795-8, 811.
9. Cha HY, Jeong AR, Cheon JH, Ahn SH, Park



- SY, & Kim KB. (2015). The Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of *Lonicera Japonica* on Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium in Mice. *Korean J Pediatr.* 29(3), 54-64. <http://dx.doi.org/10.7778/jpkm.2015.29.3.054>
10. Choi YN, Choi YK, Nan L, & Choo BK. (2020). Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from *Leonurus japonicus* Houtt. on LPS-induced RAW 264.7 Cells. *Korean J Org Agri.* 28(4), 659-77. <http://dx.doi.org/10.11625/KJOA.2020.28.4.659>
11. Lee YS. (2020). Anti-aging, Antioxidant and Anti-inflammation Activities of *Lonicerae* Flos, *Dictamni Radicis* Cortex and *Forsythiae Fructus* Extracts. *Journal of Investigative Cosmetology.* 16(1), 1-10. <https://doi.org/10.15810/jic.2020.16.1.001>
12. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools. *Herbology [Boncho-hak]* (4th ed). Seoul: Young-Lim Press. 2020: 236-8, 240-2, 452-3.
13. Noh KH, & Baek JH. (2009). Inhibitory Effect of *Taraxaci Herba* Extract (THE) on Pro-inflammatory Mediator. *The Journal of Korean Oriental Pediatrics.* 23(3), 165-76.
14. Kang JR. (2009). Anti-oxidation and Melanin Inhibition Characteristics of *Taraxacum platycarpum* and *Compositae* plants. Ph.D. thesis, Konkuk University.
15. So MS. (2009). Effect of *Taraxacum mongolicum* Hand-Mass on Proliferation of Breast Cancer Cells and Nitric Oxide Production. *Journal of Korean Health & Fundamental Medical Science.* 2(3), 128-31.
16. Jo JH, Lyu JH, Kim CH, Kang KH, Yoon HJ, Lee SY, et al. (2007). The Anti-allergic Effects of *Taraxaci Herba* on the RBL-2H3 Cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 20(1), 209-17.
17. Lee HW, & Ma CJ. (2021). Neuroprotective Activity of *Lonicerin* Isolated from *Lonicera japonica*. *Kor J Pharmacogn.* 52(1), 19-25. <https://doi.org/10.22889/KJP.2021.52.1.19>
18. Ahn SH, & Kim HH. (2010). *Lonicerae* Flos Inhibited COX-2 and MMP-9 in LPS Induced Arthritis of Mouse through Regulation of MIF. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 24(2), 242-8.
19. Park CW. *Herbal Pharmacology [Hanyak-yakri-hak]*. Seoul: Shin Kwang Pub. 2005: 169, 243-4.
20. Nho JH, Lee HJ, Jang JH, Yang BD, Woo KW, Kim HA, et al. (2019). Protective Effect of Water Extract of *Leonurus japonicus* Houttuyn against HCl/EtOH-induced Gastric Mucosal Damage and Genotoxicity Evaluation using Micronucleus Test. *Korean J. Plant Res.* 32(4), 282-9. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2019.32.4.282>
21. Xie M. *Formulas of Chinese Medicine [fangji-xue]*. Beijing: People's Medical Publishing House. 2008: 453-4.
22. Park JH, Park JY, & Park SD. (2014). Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effect of 7 Herbal Extracts and Methods of Herbal Formula Compositioning. *Herbal Formula Science.* 22(2): 87-103. doi: 10.14374/HFS.2014.22.2.087
23. Hong SJ, Choi EG, Lim HS, Shon JB, & Jeong SS. (2001). Effect of herbal dentifrice on dental plaque and gingivitis. *Korean Academy*

- of Dental Health. 25(4): 347-355.
24. Choi KM, Jeon JH, Kim ES, Sung KJ, & Kim YI. (2021). Study on Inflammatory-Control Mechanisms of *Lonicera japonica* Thunberg, *Forsythia viridissima* Lindley, and *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt Complex. *Journal of Haehwa Medicine*, 30(1): 11-31.
  25. Lee SB. (2021). Anti-inflammatory Effects of *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt, *Lonicera japonica* Thunberg, and *Houttuynia cordata* Thunberg Complex in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage and Mice. M.S. thesis, Daejeon University.
  26. Moon SC. (2022). Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt, *Lonicera japonica* Thunberg, *Citrus unshiu* Markovich complex. M.S. thesis, Daejeon University.
  27. Zorov DB, Juhaszova M, & Sollott SJ. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 94(3), 909-50. doi: 10.1152/physrev.00026.2013
  28. Li R, Jia Z, & Trush MA. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species (Apex)*. 1(1), 9-21. doi: 10.20455/ros.2016.803
  29. Frankel EN. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on quality. *Food Chemistry*. 57(1), 51-5. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(96\)00067-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(96)00067-2)
  30. Kim HC. *Herbal Pharmacology [Hanyak-yakri-hak]*. Seoul: Jipmoon. 2001: 150-2, 155-6, 334-6.
  31. Yang JH, Yoo HR, Kim YS, & Seol IC. (2021). The Effect of *Lonicera Japonica* Thunberg on Inflammatory Factor Expression Associated with Atherosclerosis. *J Int Korean Med*. 42(1), 25-39. <https://doi.org/10.22246/jikm.2021.42.1.25>
  32. Kim TY, Jang SA, Chae YB, & Bak JP. (2016). Antioxidant and Protective Effects of *Leonurus sibiricus* L. Extract on Ultraviolet B (UVB)-induced Damage in Human Keratinocytes. *Korean J. Plant Res*. 29(1), 11-9. <http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2016.29.1.011>
  33. Yoon HJ, Moon ME, Park HS, Im SY, & Kim YH. (2007) Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 358(3), 954-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.042
  34. Shin JH, & Yoo SK. (2012). Antioxidant Properties in Microbial Fermentation Products of *Lonicera japonica* Thunb. Extract. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*. 22(1), 95-102.
  35. Ozben T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96(9), 2181-96.
  36. Moloney JN, & Cotter TG. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 80, 50-64. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023
  37. Yim CY. (2010). Nitric oxide and cancer. *Korean J Med*. 78(4), 430-6.
  38. Jin JR, Kim JH, Lim JH, Jung YH, & Kim KH. *PP+ Immunology*. Seoul: Life Science. 2020: 40.
  39. Kim MJ, Park SH, Kim KBWR, Choi JS, & Ahn DH. (2017). Anti-Inflammatory Effect of *Chondria crassicaulis* Ethanol Extract on MAPKs and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in

LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages. *KSBB Journal*. 32(4), 352-60. <http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2017.32.4.352>

40. Chan ED, & Riches DW. (2001). IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280(3), C441-50. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.3.C441>
41. Murakami-Mori K, Mori S, & Nakamura S. (1999). p38MAP kinase is a negative regulator

for ERK1/2-mediated growth of AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 264(3), 676-82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1574>

### ORCID

허성신 <https://orcid.org/0009-0007-5894-031X>  
김영일 <https://orcid.org/0000-0001-9221-3238>