



## 참조팝나무 추출물의 항산화 활성 및 항염증 효과

최은영\* · 허성일\*\*\* · 권용수\*\* · 김명조\*†

\*강원대학교 식물자원응용과학전공, \*\*강원대학교 약학과, \*\*\*(재)홍천메디칼허브연구소

### Anti-Oxidant Activity and Anti-Inflammatory Effects of *Spiraea fritschiana* Schneid Extract

Eun Yeong Choi\*, Seong Il Heo\*\*\*, Yong Soo Kwon\*\* and Myong Jo Kim\*†

\*Applied Plant Sciences Program, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

\*\*Department of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

\*\*\*Hongcheon Institute of Medicinal Herb, Hongcheon 25142, Korea.

#### ABSTRACT

**Background :** We studied the anti-oxidant activity and anti-inflammatory effects of *Spiraea fritschiana* Schneid extract (SFSE).

**Methods and Results :** The SFSE was prepared using methanol and was evaluated for its total phenol and flavonoid content, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free-radical scavenging activity, reducing power, and effect on nitric oxide (NO) production, and cell viability by using real-time polymerase chain reaction (PCR). The total phenol content was 212.78  $\mu\text{g} \cdot \text{gallic acid equivalent (GAE)}/\text{mg}$  and the total flavonoid content was 66.84  $\mu\text{g} \cdot \text{quercetin equivalent (QE)}/\text{mg}$ . The extract showed antioxidant activity (DPPH free-radical scavenging activity) with  $\text{RC}_{50}$  value of 76.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The reducing power of the extract was Abs 0.58 at 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cell viability was determined using the MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. To evaluate anti-inflammatory activity, we examined the inhibitory effects on lipopolysaccharide-(LPS)-induced NO production in RAW 264.7 cells. The NO inhibition rate was 90% at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SFSE. At the same concentration, the expression of pro-inflammatory genes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 also decreased.

**Conclusions :** Our results suggest that SFSE is a novel resource for the development of foods and drugs that possess anti-oxidant and anti-inflammatory activity.

**Key Words :** *Spiraea fritschiana* Schneid, Anti-Inflammatory, Anti-Oxidant, Lipopolysaccharide, RAW 264.7 Cells

#### 서 언

식물자원이 가지고 있는 다양한 기능성 성분의 개발과 그 효능에 대한 연구가 주목받기 시작하면서 우리가 예로부터 이용해 왔거나 혹은 그 이용가능성을 아직 검증하지 못한 다양한 식물에 대한 관심도가 증가되고 있는 실정이다 (Cho *et al.*, 2007). 지구상에는 약 20만종의 식물이 존재하고 있으며, 이 중 우리나라에 발생하는 종류는 약 5,000종의 식물이 발생하고 있는 것으로 추정되고 있다. 다양한 식물은 이에 수반되는 다양한

기능성 물질을 가지고 있음이 알려지면서 이를 이용하고자 자 원식물을 중심으로 다양한 연구가 진행되고 있다 (Kang, 2014).

인체의 노화와 질병 발생 원인은 매우 다양하지만 가장 많이 논거되는 것이 활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS) 이다. 이는 과산화수소, superoxide anion, hydroxyl radical과 같은 정상적인 대사과정 중에서 발생하는 free radical들로 인체 내 지질, 단백질, DNA 효소를 파괴하여 염증, 피부 노화, 암 등의 세포조직의 심각한 손상을 야기한다고 알려져 있다. 과 도한 활성산소의 생성은 NO의 축적을 야기하면서 대식세포의

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6413 (E-mail) kimmjo@kangwon.ac.kr

Received 2015 September 24 / 1st Revised 2015 October 12 / 2nd Revised 2015 November 6 / 3rd Revised 2015 November 20 / Accepted 2015 November 23

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.

지나친 활성 및 염증의 과활성화를 유발하게 된다 (Song and Lee, 2015). 염증 반응은 인체의 생체조직을 방어하기 위한 기전이지만 지속적인 염증반응은 점막손상을 유발하고 심각한 경우 암을 비롯한 다양한 질병을 유발하기도 한다 (Jung *et al.*, 2014). 최근까지의 연구에서 급성염증반응 유발 및 조절하는 가장 중요한 인자는 iNOS와 COX-2로 알려져 있다. Lipopolysaccharide (LPS)에 의하여 유발된 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 칼슘비의존성 경로를 통해 발현되며, cyclooxygenase-2 (COX-2)는 염증 부위에서 염증성 자극에 의하여 다량 유도되어 발현된다. iNOS와 COX-2는 정상 상태에서는 발현되지 않으나 LPS 등에 의해서 발현이 유도되면 다량의 NO를 생성하거나 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등과 같은 염증발현 중개 물질이 발생 된다 (Choi, 2009; Chae, 2004; Bak *et al.*, 2011).

참조팝나무 (*Spiraea fritschiana* Schneid)는 장미과에 속하며 우리나라 중부 이북의 산중턱 이상이나 산골짜기에서 나는 낙엽 관목으로 반그늘 혹은 양지의 토양 비옥도가 높은 곳에서 성장한다. Byeon 등 (2014)이 발표한 바에 따르면 백두대간 갈전곡봉 등에서 생육이 확인되었으며, 국내 관속식물상 연구 및 삼목시기 등의 생장연구 등이 보고되었으나 1967년도에 참조팝나무의 alkaloid에 관한보고 이외에 그 기능성이 명확히 보고된바 없다 (Oh *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Jin, 1967). 동일한 *Spiraea* 속인 조팝나무 (*Spiraea prunifolia*)의 경우 예부터 중국 등지에서 어린잎이나 과실, 뿌리를 이노제, 해독제, 염증 치료제 및 진통제로서 사용되었다는 보고가 된 바 있으나, 참조팝나무에 경우 식용 및 약리적 이용이 명확히 보고된바 없다 (Park, 2013).

이에 본 연구에서는 참조팝나무 추출물의 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성을 확인하였으며, RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 염증반응을 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 NO 생성저해 활성 및 iNOS, COX-2 발현도를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시료의 추출

본 연구에서 사용된 재료는 ㈜아모레퍼시픽 약초원에 식재된 참조팝나무 (*Spiraea fritschiana* Schneid)의 뿌리를 제외한 지상부를 채취하여 실험에 사용하였다. 채집한 식물은 이물질 제거 후 3일간 실온에서 음건하여 시료대비 10배 volume의 methanol (MeOH)로 2회 반복 추출한 후 감압농축기 (N-1110, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 농축물을 동결건조 (FD8508, ilShinBioBase, Dongducheon, Korea) 한 후 실험에 사용하였다. 농축된 시료는 각 실험의 특성에 따라 일정 농도로 희석 한 후 실험에 적용하였다.

### 2. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 Singleton 등 (1999)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 시료 100  $\mu$ l 에 Folin-Ciocalteu 시약 50  $\mu$ l 을 넣어 5분간 안정화 시킨 뒤 20% sodium carbonate (Junsei chemical, Tokyo, Japan)을 300  $\mu$ l 첨가하여 다시 15분간 안정화 시킨 뒤 1.0 ml 의 증류수를 첨가하여 UV/Vis spectrophotometer (V530, JASCO Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 725 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 gallic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 표준곡선의 검량선을 작성하였다. 총페놀 함량은  $\mu$ g  $\cdot$  gallic acid equivalent (GAE)/mg 으로 나타내었다.

### 3. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등 (2000)이 사용한 방법을 응용하여 수행하였다. 일정농도로 희석된 시료 100  $\mu$ l 에 10% aluminum nitrate (Yakuri Pure Chemical, Kyoto, Japan) 30  $\mu$ l 와 1 M potassium acetate (Junsei chemical, Tokyo, Japan) 30  $\mu$ l 를 혼합한 후 80% ethyl alcohol (EtOH) 1.24 ml 를 넣어 실온에서 약 40분간 안정화 시킨 후 UV/Vis spectrophotometer (V530, JASCO Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 415 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 quercetin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 표준곡선의 검량선을 작성하였다. 총 플라보노이드 함량은  $\mu$ g  $\cdot$  quercetin equivalent (QE)/mg 으로 나타내었다.

### 4. DPPH radical 소거능 측정

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical 소거법 (Xiong *et al.*, 1996)을 변형하여 측정하였다. 96 well-plate에 일정농도로 희석한 시료 100  $\mu$ l 씩을 넣은 후 빛을 차단한 시약병에 희석한 0.15 mM DPPH (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 반응구에 100  $\mu$ l 씩 혼합하여 암조건에서 30분간 반응시켰다. 반응이 종료된 plate는 microplate reader (Model-680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 515 nm에서 흡광도 (absorbance, Abs)를 측정하였다. 측정된 값은 다음과 같은 식을 이용하여 EDA (electron donating ability, %)로 산출한 후 RC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)값을 확인하였다. 이때 RC<sub>50</sub>값은 화합물을 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 화합물의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인 ascorbic acid와 butylated hydroxytoluene (BHT)를 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입 후 측정하여 활성을 비교하였다.

$$\text{EDA (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{sample blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

**5. 환원력 측정**

Reducing power (환원력) 측정은 Oyaizu가 사용한 방법 (1986)을 변형하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 농도별로 희석한 시료 100 µl에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 100 µl와 1% potassium ferricyanide 100 µl를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 이 혼합물에 10% trichloroacetic acid 100 µl 넣어 다시 10분간 실온에서 반응시켰다. 이 반응액에 증류수 400 µl를 첨가한 후 0.1% ferric chloride 50 µl를 첨가하는 즉시 UV/Vis spectrophotometer (V530, JASCO Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 700 nm에서 흡광도 (Abs)를 측정하여 이를 결과값으로 사용하였다.

**6. 세포배양**

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)와 1% antibiotic mixture (Penicillin-Streptomycin Solution, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건으로 CO<sub>2</sub> humidified incubator (NU-5510G, NuAire, Inc., Plymouth, MN, USA)에서 배양하였다. 세포는 일정 주기로 계대배양을 실시한 후 실험에 사용하였다.

**7. 세포독성평가**

추출물의 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 이용한 방법에 의해 측정하였다. 일정량 이상으로 배양된 세포를 1 × 10<sup>6</sup> cell/ml의 밀도로 96 well-plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양시 사용된 배지를 깨끗이 제거한 후 배지 90 µl와 농도별로 희석된 시료를 10 µl씩 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> incubator (NU-5510G, NuAire, Inc., Plymouth, MN, USA)에서 24시간 배양하였다. 이후 기존의 배지를 모두 제거한 후 5 mg/ml의 농도 용해시켜 제조한 MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 µl를 새로운 배지 90 µl와 함께 첨가하여 3시간 동안 배양한 후 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Daejung chemical and metal Co., Ltd, Siheung, Korea) 100 µl를 첨가하여 microplate reader (Model-680, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 (Abs)를 측정하여 세포의 생존율을 대조구와 비교하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

**8. Nitric oxide (NO) 생성 저해효과**

추출물의 NO 생성 저해효과를 측정하기 위하여 마우스 대식세포 (RAW 264.7 cell)를 사용하였으며, LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA) 처리에 의해 유도된 NO 생성량을 확인하기 위하여 일정기간 배양된 세포를 96 well-plate에 1 × 10<sup>6</sup> cell/ml의 밀도로 분주하고 24시간 배양하였다. 각 반응구에 농도별로 추출물을 첨가한 후 최종농도 1.0 µg/ml의 농도가 되도록 LPS로 동시처리 또는 LPS를 단독 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배양 상등액 100 µl와 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylendiamine in 25% phosphoric acid) 100 µl를 혼합하여 96 well plate에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Model-680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 (Abs)를 측정하여 NO 생성저해율을 LPS 무처리구와 비교하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = 1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

**9. RT-PCR**

mRNA 수준에서의 염증 관련 bio-marker인 iNOS, COX-2의 발현정도를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. RAW 264.7 세포를 6 well plate에 1 × 10<sup>6</sup> cell/ml의 밀도로 분주하여 시료를 농도별로 처리하고 24시간 처리 후 Total RNA Extraction Kit (Intron Biotechnology Co., Ltd, Seongnam, Korea)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA의 농도를 측정하여 정량하였으며, 이를 이용하여 cDNA를 합성한 후 template로 사용하여 iNOS, COX-2 유전자를 polymerase chain reaction (PCR, SC200, Kyratex, Queensland, Australia)방법으로 증폭하였다.

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들은 1% agarosegel (USB Co., Cleveland, OH, USA)을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr)를 이용하여 UV하에서 image analyse system (FireReader, UVITec Cambridge Co., Cambridge, England)을 이용하여 발현정도를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

**Table 1.** Sequences of primer used in real-time PCR analysis.

Name	Sequences
iNOS	Forward 5'-CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'
	Reverse 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
COX-2	Forward 5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'
	Reverse 5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'
GAPDH	Forward 5'-CACTCACGGCAAATTC AACGGCAC-3'
	Reverse 5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'

10. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정하여 평균값 ± S.D. (n = 3)으로 나타내었으며, 통계처리는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Tukey (1949)의 다중비교검정법을 사용하여 유의성을 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 페놀은 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지기 때문에 단백질처럼 거대분자와 결합하여 다양한 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있어 기능적면에서 매우 중요하게 여겨진다 (Park et al., 2007). 또한, 이러한 식물유래 페놀성 화합물은 단순한 phenol류, phenolic acid류, phenylpropanoid류 및 flavonoid류 등으로 대부분 분류되며 항균, 항알러지, 항산화, 항암, 충치예방, 심장질환 및 당뇨병 예방에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (Azuma et al., 1999). 이와 동시에 폴리페놀에 속하는 플라보노이드는 페놀성 물질과 유사하게 항산화능을 비롯한 항염증, 항알레르기 효과가 밝혀진바 있으며, 최근까지도 플라보노이드계열 성분의 다양한 연구가 진행되고 있다 (Sun et al., 2002; Kawaguchi et al., 1997).

본 연구에서는 참조팝나무의 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량은 각각 gallic acid와 quercetin을 검량선으로 하여 결과를 나타내었으며 측정 결과는 Table 2와 같다. 참조팝나무 추출물의 총 페놀함량은 212.78 µg · GAE/mg의 함량을 나타내었으며, 플라보노이드 함량의 경우 66.84 µg · QE/mg의 함량을 나타내었다. 동일한 장미과에 속하는 짚신나물 추출물에서 259.6 µg/mg의 페놀 함량을 가진다는 점에서 참조팝나무의 높은 페놀 함량을 확인하였으며, 결과적으로 높은 페놀 함량을 나타내었을 때 높은 항산화능을 나타내었다 (Hyun et al., 2007). 이는 Kim 등 (2004)이 항산화활성을 나타내는 약용식물을 연구한 결과에서도 20여종의 약용식물에서 폴리페놀의 함량이 플라보노이드 보다 많음을 증명하였고, 폴리페놀 함량이 많은 식물이 대부분 플라보노이드 함량을 나타냄을 확인함으로써 높은 폴리페놀 함량이 여러 생리활성 효과를 보일 것으로 사료된다.

대표적인 항산화 활성 물질로 ascorbic acid, α-tocopherol 등의 천연 항산화제와 butylated hydroxyanisole (BHA) 및 butylated hydroxytoluene (BHT) 등의 합성 항산화제가 이용되고 있으나 천연 항산화제들은 항산화력이 비교적 낮고 합성 항산화제의 경우는 생체 효소 및 지방의 병이원성, 독성으로

Table 2. Total phenolic, flavonoids contents and DPPH radical scavenging activity of the methanol extract about *Spiraea fritschiana* Schneid.

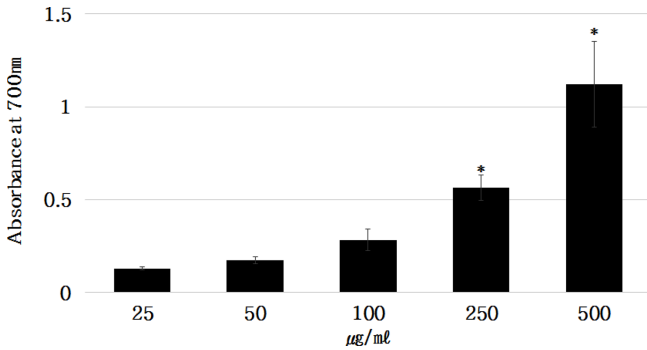
Sample	Total phenolic (µg · GAE <sup>1</sup> /mg)	Total flavonoids (µg · QE <sup>2</sup> /mg)	DPPH <sup>3</sup> RC <sub>50</sub> <sup>4</sup> (µg/ml)
<i>Spiraea fritschiana</i> Schneid	212.78 ± 1.53	66.84 ± 9.51	76.61 ± 2.35
Ascorbic acid	-	-	5.37 ± 0.06
Butylated hydroxytoluene	-	-	15.66 ± 1.16

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. <sup>1</sup>GAE; Gallic Acid Equivalent. <sup>2</sup>QE; Quercetin Equivalent. <sup>3</sup>DPPH; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. <sup>4</sup>RC<sub>50</sub>; Extract concentrations, which show 50% activity of DPPH radical scavenging, were determined by interpolation.

인체에 암을 유발한다고 보고된바 있다 (Branen, 1975). Lee 등 (2015)은 폴리페놀 성분은 수소원자를 유리라디칼에 제공하고 비활성 라디칼로 변화시킴으로서 항산화효과를 나타내며, 이러한 폴리페놀에 속하는 플라보노이드는 활성산소종을 효과적으로 제거함으로써 항염증 및 항암 효과가 있다고 언급한 바 있다. 이에 본 연구에서는 앞서 확인된 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 기초로 항산화 측정에 대표적으로 쓰이는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)을 기질로 이용하여 참조팝나무 추출물의 항산화 활성을 측정하였다. 시료에 대한 항산화 활성은 DPPH free radical을 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도 (RC<sub>50</sub>)로 표기하였다. 참조팝나무 추출물은 76.61 µg/ml의 농도에서 RC<sub>50</sub>값을 나타내었으며, 대조군으로 사용된 ascorbic acid에서는 5.37 µg/ml, BHT 15.66 µg/ml의 농도에서 RC<sub>50</sub>값을 확인하였다 (Table 2). 참조팝나무 추출물을 대조군과 비교하였을 때 약 3배정도의 RC<sub>50</sub>값 차이를 보이나 특정물질을 단리하지 않은 조 추출물임을 감안하였을 때 높은 항산화 활성을 가지고 있다고 판단된다. Kim 등 (2012)이 연구한 감나무를 포함하는 40여종의 자생식물과 생약자원 추출물에서 항산화 활성이 일반적으로 1,000 ppm에서 10-80%의 radical 소거능을 가지고 있다고 보고되었으며, 본 연구 결과를 ppm으로 계상하였을 경우 약 70 ppm의 농도에서 50%의 radical 소거능을 나타내어 기타 자생식물과의 항산화 활성을 비교하였을 때 높은 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

2. 환원력 측정

환원력 측정은 700 nm에서 ferric-ferricyanide (Fe<sup>3+</sup>)혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe<sup>2+</sup>)로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타낸 것이다 (Sa et al., 2010). 환원력은 측정 시료에 따라서 차이가 있고 또 반응조건에 따라 상이하여, 상대적인 양의 함량만을 측정할 수 있다는 특징이 있다 (Lee et al., 2008). 참조팝나무 추출물을 25

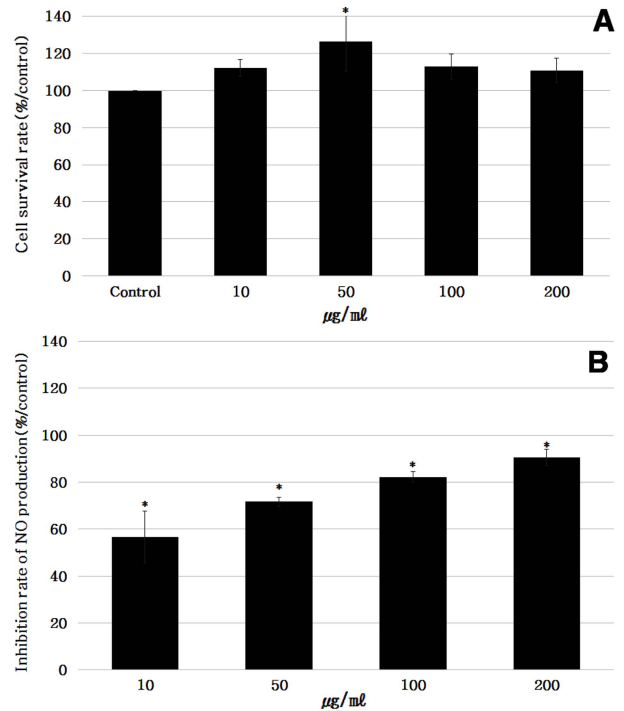


**Fig. 1.** Reducing power of the methanol extract about *Spiraea fritschiana* Schneid. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. \*Significantly different as compared with control by one way ANOVA-Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

- 500 µg/ml 농도로 설정하여 환원력을 측정한 결과 시료 농도가 높아짐에 따라 Abs 0.13 - 1.8로 흡광도 값이 농도 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 이는 100 µg/ml 농도에서 대조군으로 사용된 BHT (Abs 0.77)와 비교해 보았을 때 약 50%정도의 환원력을 나타내었으나 특정 유효물질을 분리 정제하지 않은 조 추출물임을 감안하였을 때 높은 활성도로 평가되며, 이보다 저농도인 50 µg/ml의 수준에서는 시료와 대조군이 각각 Abs 0.18, 0.23의 수치를 나타냄으로서 비교적 높은 항산화 활성을 가지고 있다고 생각된다. Kang 등 (1996)에 따르면 phenolic acid 및 phenol성 물질에 의하여 나타나는 항산화 작용의 지표가 되는 것이 전자공여능이며 이러한 물질을 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다는 연구결과를 발표한 바 있다. 따라서, 상기 결과는 참조팝나무 추출물에 함유된 총 페놀 함량과 항산화 활성간에 높은 연계성을 가지는 결과로 사료된다.

### 3. Nitric oxide (NO) 생성저해 활성 및 세포 생존율

Nitric oxide (NO)는 활성질소종 (reactive nitrogen species)의 하나로 최근 염증반응의 중요한 작용인자로 알려져 있다. 이러한 NO의 생성저해 효과를 검증하기 위하여 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 이용하여 NO 생성을 유도하였으며, 참조팝나무 추출물을 농도별로 처리하여 NO 생성저해율을 확인하였다. 또한, NO 생성 저해가 세포독성에 기인하는 것인지 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 동일 농도로 측정하였다. 우선 세포독성측정결과 (Fig. 2A) 시료를 10 - 200 µg/ml의 농도로 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 모든 농도에서 세포의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였으며 해당 농도를 기준으로 후차적인 실험에 적용하였다. 참조팝나무 추출물을 10 - 200 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 NO 생성저해 활성은 Fig. 2B와 같이 확인되었다. 추출물 10 µg/ml 농도에서 약 60%의 NO 생성저해율



**Fig. 2.** Effect of methanol extract about *Spiraea fritschiana* Schneid on cell viability (A) and NO production (B) in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with *Spiraea fritschiana* Schneid methanol extract and LPS (1.0 µg/ml) for 24 hr. NO production was determined in culture supernatant by Griess reagent. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. \*Significantly different as compared with control by one way ANOVA-Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

을 확인하였으며, 최종 농도 200 µg/ml에서 90%의 높은 NO 생성저해율을 나타내었다. Jung 등 (2013)이 연구한 소태나무 잎 추출물의 LPS에 의해 생성된 nitric oxide 생성저해 활성에도 농도 의존적으로 생성량이 감소하는 것을 확인 하였으며, 100 µg/ml의 농도에서는 약 80%, 50 µg/ml의 농도에서는 약 60%의 억제능을 확인하여 본 실험결과와 유사한 활성을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 참조팝나무 추출물의 농도가 증가함에 따라 NO 생성저해율 증가가 확인됨으로서 이를 이용한 천연물 유래 항염증 물질로 이용가능성을 확인하였다.

### 4. iNOS 및 COX-2 발현억제 효과

염증 반응에 관여하는 iNOS는 염증반응에서 NO의 생성량에 영향을 주는 효소로 정상상태에서는 방어 작용, 신경전달물질과 혈관 조절 기능 등을 수행하나 염증 반응에서는 강한 독성을 가지는 NO를 발생시켜 세포 손상 및 만성염증, 자가면역질환의 원인이 된다고 알려져 있으며, COX-2의 경우 arachidonic acid로부터 PGE<sub>2</sub>를 생성하는데 관여하는 효소로 생성된 PGE<sub>2</sub>는 혈관확장, 통증발생 등 염증반응에서 많은 영

향을 주는 것으로 알려져 있다 (Namkoong *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2014). 즉, iNOS와 COX-2의 발현증가를 억제하는 것은 염증발생을 억제하는 것을 의미한다. 이에 본 연구에서는 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 발현에 있어 참조팝나무 추출물의 발현 억제능을 확인하고자 RT-PCR을 이용하여 그 발현정도를 확인하였다. 실험은 앞서 수행한 세포 생존률을 기준으로 1-200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였으며, 실험결과 iNOS와 COX-2 모두 일정농도 이상에서 발현도가 감소함을 확인하였다 (Fig. 3). RAW 264.7 세포에 염증 유도를 위하여 LPS를 처리하였으며, 처리 후 LPS 무처리구와 비교하였을 때 iNOS와 COX-2 모두 높은 발현을 확인하였다. 그러나, 염증을 유도한 세포에 참조팝나무 추출물 처리시 발현억제능을 확인하였으며 COX-2의 발현억제능에 비하여 iNOS의 발현억제능이 높은 것을 확인하였다. iNOS의 경우 시료를 10  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 후 시료 무처리구와 비교하였을 때 약 20%정도 발현 억제능을 보였다. 이후 시료 농도가 증가함에 따라 뚜렷한 iNOS 발현 억제능을 확인하였으며 최종농도 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 시료 무처리구 대비 약 45%정도의 발현 억제능을 확인하였다. 이는 앞서 연구한 NO 생성 조절에 미치는 영향과 매우 유사한 패턴으로서 참조팝나무 추출물은 iNOS-NO 조절 경로를 거친다는 것을 확인하였다. COX-2의 경우 참조팝나무 추출물을 1-100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였을 때 뚜렷한 발현억제능을 나타내지 않았으나 최종농도 200  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리시 무처리구 대비 약 20%의 발현 억제능을 확인하였다. 최종농도 처리시 iNOS와 COX-2를 발현억제능을 비교하였을 때 2배정도의 억제능 차이를 나타내었다. 상기 결과를 Oh 등 (2014)이 연구한 동규자오일의 항염증 활성을 확인한 결과와 비교하였을 때 동규자 오일을 250  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리시 약 90%의 NO 억제 활성을 확인하였으며, iNOS의 발현은 약 32%가 억제되었으나 COX-2의 경우 발현 억제를 확인할 수 없었다. 따라서, 동규자오일은 염증을 유발하는 다양한 사이토카인중 NO와 iNOS를 조절하는 메커니즘으로 항염증효과를 갖는다는 것을 확인하였다. 본 연구에서도 상기 연구의 경우와 마찬가지로 참조팝나무 추출물 NO 생성 억제 효과는 COX-2 발현 보다는 iNOS 발현에 기인하는 하는 것으로 사료된다.

Jeoung 등 (2009)의 논문에서 평소 iNOS는 세포 내에 존재하지 않지만 발행할 경우 오랜 시간 동안 많은 양의 NO를 생성하게 되고 염증매개체의 생합성을 촉진함으로써 염증을 유발시키는데, NO와 iNOS의 발현 증가가 염증반응을 유발한다는 보고가 있음을 언급함으로써 참조팝나무의 iNOS 발현억제능이 NO 생성을 저해하며 결과적으로 항염증 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서, 본 결과를 바탕으로 참조팝나무 추출물을 이용하여 염증질환 및 관련 분야에 대한 지속적인 연구의 필요성이 요구되는 바이다.

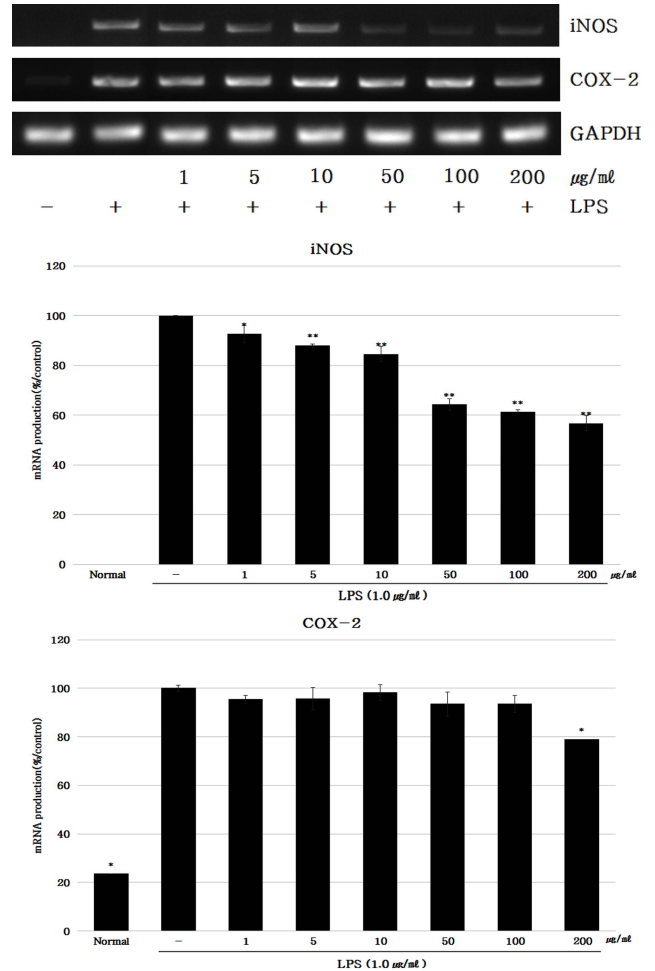


Fig. 3. Effects of *Spiraea fritschiana* Schneid on LPS-induced iNOS and COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. \*Significantly different as compared with control by one way ANOVA-Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### 감사의 글

본 연구는 강원대학교와 한방바이오 연구소의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

Azuma K, Nakayama M, Koshica M, Lppoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamaguchi Y, Ito H and Higashio H. (1999). Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47:3963-3966.

Bak JP, Son JH, Kim YM, Jung JH, Leem KH, Lee EY and Kim EH. (2011). Suppression effect of the inflammatory response in macrophages by Paeoniae Radix Rubra extracts. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:373-379.

Branen AL. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated

- hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. Journal of the American Oil Chemists' Society. 52:59-63.
- Byeon JG, Oh SH, Lee KS, Yun JE, Jang JW, Jeong JB, Yang JC and Kim HJ.** (2014). The flora of vascular plants in Mt. Galjeongok-bong protected area for forest genetic resource conservation, Baekdudaegan, Korea. Korean Journal of Plant Resources. 27:477-484.
- Chae CH.** (2004). Functional role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in acute inflammation. Ministry of Health and Welfare. Gwacheon, Korea. p.10-11.
- Cho IS, Han YH, Lee GY and Park KY.** (2007). Search for medicinal plants on improvable effect of intestinal microflora. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:26-29.
- Choi DS.** (2009). Study on the antiinflammatory effect and mechanism of isogomaketone *in vitro* and *in vivo*. Master Thesis. Chonbuk National University. Korea. p.4-5.
- Hyun SH, Jung SK, Jwa MK, Song CK, Kim JH and Lim SB.** (2007). Screening of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in Jeju island. Korean Journal of Food Science and Technology. 39:200-208.
- Jeong YJ, Choi SY, An CS, Jeon YH, Park DK and Lim BO.** (2009). Comparative effect on anti-inflammatory activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* grown in germinated brown rice extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:97-101.
- Jin KD.** (1967). Studies on the constituents of *Spiraea Koreana* Nakai. Journal of the Korean Chemical Society. 11:111-116.
- Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, Cho JH, Kuk YI, Hyun KH and Cho HW.** (2014). Inhibitory effect of *Alopecurus aequalis* Sobol ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 22:98-104.
- Jung YS, Eun CS, Jung YT, Kim HJ and Yu MH.** (2013). Anti-inflammatory effects of *Picrasma quassioides*(D.DON) BENN leaves extracts. Journal of Life Science. 23:629-636.
- Kang BH.** (2014). Superintendence of Korean resource plant. Richvanilla. Seoul, Korea. p.12-16.
- Kang YH, Park YK and Lee GD.** (1996). The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean Journal of Food Science and Technology. 28:232-239.
- Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K and Uchino K.** (1997). Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 61:102-104.
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH and Lee BH.** (2012). Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. Korean Journal of Food Science and Technology. 44:337-342.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR and Rhyu MR.** (2004). Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean Journal of Food Science and Technology. 36:333-338.
- Lee HJ, Lee SW, Park CG, Ahn YS, Kim JS, Bang MS, Oh CH and Kim CT.** (2015). Effects of white *Habiscus syriacus* L. flower extracts on antioxidant activity and bone resorption inhibition. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:190-197.
- Lee JH, Song CY, Woo HJ and Kwon OW.** (2011). Effects of plant growth regulators for hard wood and cutting time for soft wood on rooting of Korean native *Spiraea* spp. Flower Research Journal. 19:103-109.
- Lee MA, Choi HJ, Kang JS, Choi YW and Joo WH.** (2008). Antioxidant activities of the solvent extracts from *Tetragonia tetragonioides*. Journal of Life Science. 18:220-227.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology. 71:109-114.
- Namkoong S, Jang SA, Sohn EH, Bak JP, Sohn ES, Koo HJ, Yoon WJ, Kwon JE, Jeong YJ, Meng X, Han HS and Kang SC.** (2015). Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. Korean Journal of Plant Resources. 28:145-152.
- Oh SH, Choi SY, Lee SH, Kim DS and Park SM.** (2014). The anti-inflammatory effects of *Malva verticillata* L. oil induced by lipopolysaccharide with RAW 264.7 cells. Korean Journal of Pharmacognosy. 45:23-27.
- Oh SH, Lee BC, Kim HJ, Cho HJ, Kim JS and Bae KH.** (2009). A study on vascular plants of mountain ridge from in Mt. Sobaek. The Journal of Korean Institute of Forest Recreation. 13:35-51.
- Oyaizu M.** (1986). Studies on product of browning reaction: Antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition. 44:307-315.
- Park SH.** (2013). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of new caffeoyl hemiterpene glycosides from leaves of *Spiraea prunifolia*. Master Thesis. Chungang University. Korea. p.2.
- Park YJ, Kim HJ and Heo BG.** (2007). An *in vitro* study on total phenol content, electron donor capacity and their cytotoxicity effects of extracts of four different edible flowers. Flower Resources Journal. 15:41-45.
- Sa YJ, Kim JS, Kim MO, Jeong HJ, Yu CY, Park DS and Kim MJ.** (2010). Comparative study of electron donating ability, reducing power, antimicrobial activity and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by *Sorghum bicolor* extracts. Korean Journal of Food Science and Technology. 42:598-604.
- Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventos RM.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 299:152-178.
- Song JH and Lee SR.** (2015). Anti-oxidant and inhibitory activity on NO production of extract and its fractions from *Rosa davurica* Pall. leaves. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:20-26.
- Sun J, Chu YF, Wu X and Liu RH.** (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:7449-7454.
- Tukey JW.** (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics. 5:99-114.
- Xiong Q, Kadota S, Tani T and Namba T.** (1996). Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 19:1580-1585.
- Yoon YI, Chang MY, Hwang JS, Goo TW, Ahn MY, Lee YB, Han MS and Yun EY.** (2014). Anti-inflammatory effect of *Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract in LPS-induced RAW 264.7 cells. Journal of Life Science. 24:370-376.