

싸리나무 줄기 추출물의 추출 용매에 따른 항산화활성과 Nitric Oxide 생성 억제 활성

이경인^{****†} · 양선아^{**} · 김선민^{**}

*동신대학교 생물자원산업화지원센터, **동신대학교 한약재산업학과, ***조선대학교 바이오신약개발학과

Antioxidative and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Lespedeza bicolor* Stem Extracts Depending on Solvents

Kyoung In Lee^{****†}, Sun Ah Yang^{**} and Sun Min Kim^{**}

*Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju 520-811, Korea.

**Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 520-811, Korea.

***Department of Bio New Drug Development, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.

ABSTRACT : In this study, we investigated on antioxidative activity and nitric oxide production inhibitory activity of various solvent extracts of *Lespedeza bicolor*. The total polyphenol content of the methanol extract was 192.6 mg/g and flavonoid content of the acetone extract was 40.6 mg/g, as the highest content. In DPPH radical scavenging ability, SC₅₀ values of the ethanol and methanol extract were exhibited 0.69 mg/ml and 0.89 mg/ml, respectively. However, in nitric oxide(NO) scavenging ability, SC₅₀ values of the acetone was exhibited 0.72 mg/ml as the highest activity. Moreover, the acetone extract showed strong NO production inhibitory effect in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated Raw 264.7 cell. In the cytotoxicity measurement by MTT assay, the extracts were exhibited Raw 264.7 cell viabilities of 92.57~129.04% as nontoxic result in concentration of 65~650 µg/ml. As a result, the acetone extract of *L. bicolor* could be applicable to functional materials for anti-inflammatory related fields.

Key Words : *Lespedeza bicolor*, Antioxidative Activity, Nitric Oxide, Cytotoxicity

서 언

싸리 (*Lespedeza bicolor*)는 콩과 (Leguminosae)식물에 속하는 다년생의 낙엽 관목으로 7~8월에 개화하며 우리나라 전역의 양지바른 산과 들에 널리 분포하는 식물이다. 한방에서는 싸리의 줄기와 뿌리를 야관문 (夜關門)이라 하여 진해, 거담, 만성 기관지염, 지혈, 청열, 학질, 발한, 해열 등의 치료 및 이뇨제와 건비제 등으로 사용하였으며, 뿌리에는 자궁수축제로 사용되는 dimethyl triptamine 성분을 함유한 것으로 보고되고 있다 (Lee, 1993; Kang *et al.*, 1998; Mitsuhashi, 1998). 싸리나무의 생리활성과 관련된 연구로는 주로 전자공여능이나 아질산염소거능, SOD 유사활성 등 항산화 활성과 xanthin oxidase 저해활성, tyrosinase 저해활성 등이 보고되고 있으며, 항균효과나 세포독성에 대한 연구도 일부 진행되었다 (Lee *et al.*, 2005, 2006a, 2006b). 최근에는 싸리나무 꽃의 에탄올 추출물의 화장품의 원료로서의 가능성에 대한 연구와 참싸리 줄기의 메탄올 추출물로부터 분리된 dalbergioidin의 멜

라닌 생합성을 저해 활성에 대한 보고가 있었다 (Ryu *et al.*, 2007; Baek *et al.*, 2008).

현대 사회에서 그 중요도가 높아지는 분야 중의 하나가 바로 건강한 피부와 관련된 것인데, 그 중에서도 피부 미백에 관련된 연구는 tyrosinase 억제 활성, 항산화 활성, 자외선 차단 등이 주로 이루어지고 있다. 특히 각질형성세포에 존재하는 melanin의 양상에 따라 피부색이나 색소침착여부가 좌우되므로 melanin 생성과정에 관여하는 효소인 tyrosinase를 저해하는 활성이 중요하게 다뤄지고 있다 (Jung *et al.*, 1995). 인간과 같은 생체에서는 호흡과 에너지 생성 등 다양한 생명유지 활동의 결과로 다양한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데 세포 구성 성분들인 지질이나 단백질, DNA 등을 비가역적으로 파괴함으로써 암이나 각종 염증, 심혈관계 질환 등의 원인으로 작용함은 물론 피부질환이나 노화의 직간접적인 원인으로 작용하게 된다 (Videla and Fernandez 1988; Fridovich, 1989). 이러한 ROS는 염증 반응시 면역 반응으로 인해 생성이 증가되는 활성질소종

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-336-3104 (E-mail) kilee@bic.re.kr

Received 2011 October 5 / 1st Revised 2011 October 11 / 2nd Revised 2011 October 15 / Accepted 2011 October 17

(reactive nitrogen species, RNS)과 함께 생성되기도 한다 (Brune *et al.*, 2003). 염증 반응의 조절은 매우 복잡한 것으로 알려져 있으며, 염증 과정 중에는 많은 양의 nitric oxide (NO), 염증유도 cytokine류 등이 생성된다 (Byun *et al.*, 2005). 본 연구에서는 극성 등 특성이 다른 추출용매를 사용하여 제조한 싸리나무 줄기 추출물의 항산화활성과 염증반응과 관련이 있는 nitric oxide 생성 억제 활성, 그리고 세포독성 등을 비교하여 싸리나무 줄기 추출물을 활용한 항염증 관련 소재 개발의 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 추출

본 실험에 사용된 싸리나무 줄기는 2010년 6월 전라남도 나주 지역에 자생하는 싸리나무에서 분리한 것으로 수세 후 50°C에서 건조시킨 후 4°C 이하로 보관하면서 실험에 사용하였다. 건조된 싸리나무 줄기 시료를 acetone, 75% ethanol, methanol, 열수를 추출 용매로 하여 시료 중량의 10배에 해당하는 용매를 넣은 후 각 용매의 끓는점에서 2시간씩 3회 반복하여 환류추출을 실시하였다. 추출액은 여과와 농축 및 동결 건조를 실시하여 분말화 한 후 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였으며, 각 추출 용매별 추출 수율은 acetone, 75% ethanol, methanol, 열수추출물에서 각각 0.97%, 2.34%, 2.12%, 4.25%로 나타났다.

2. 세포주 배양

본 실험에 사용된 Raw 264.7 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, 서울)에서 분양 받아 사용하였다. 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 혼합한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3. 총 polyphenol 함량 측정

Folin-Denis법을 이용하여 추출물 및 분획물의 페놀성 화합물 함량을 측정하였다. Methanol에 1 mg/ml 농도로 용해시킨 시료액 80 µl와 Folin-Denis reagent 80 µl를 혼합하여 3분간 반응시킨 뒤 10% Na₂CO₃ 80 µl를 혼합하여 1시간 동안 암실에서 반응시킨 후, 상등액 120 µl를 취하여 96well plate에 옮겨 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 tannic acid를 0~500 µg/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 표준 검량선을 작성하고 페놀성 화합물의 함량을 mg/g으로 나타내었다.

4. Flavonoid 함량 측정

페놀성 화합물중 특히 여러 가지 기능성을 나타내는 것으로 알려진 flavonoid 함량을 알아보기 위해 Moreno 등의 방법을

변형하여 다음과 같이 측정하였다 (Moreno *et al.*, 2000). 1 mg/ml 농도로 methanol에 용해시킨 시료액 100 µl와 10% aluminium nitrate 20 µl, 1 M potassium acetate 20 µl, methanol 860 µl를 차례로 혼합하여 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin을 0~500 µg/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 표준 검량선을 작성하고 총 flavonoid 함량을 mg/g으로 나타내었다.

5. DPPH radical 소거능 측정

추출물과 분획물의 항산화활성을 비교하기 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 사용하여 radical 소거능을 측정하였다 (Blois, 1958). Methanol에 농도별로 용해시킨 각 시료액 20 µl와 200 µM DPPH 용액 180 µl를 혼합하여 15분간 암실에서 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank의 흡광도를 기준으로 소거능을 산출한 후 50%의 DPPH radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도 (SC₅₀) 계산하였으며, positive control로 ascorbic acid (vitamin C)를 사용하였다.

6. Nitric oxide 소거능 측정

Nitric oxide 소거능은 Marcocci 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다 (Marcocci *et al.*, 1994). 10 mM sodium nitroferricyanide (III) dihydrate 50 µl와 증류수에 일정농도로 용해시킨 시료액 30 µl를 혼합한 후 25°C에서 150분 동안 반응시켰다. 1% sulfanilamide (in 30% acetic acid) 60 µl를 혼합하고 5분후 다시 0.1% N-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (in 60% acetic acid) 60 µl를 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank의 흡광도를 기준으로 소거능을 산출한 후 50%의 nitric oxide를 소거하는데 필요한 시료의 농도 (SC₅₀) 계산하였으며, positive control로 ascorbic acid (vitamin C)를 사용하였다.

7. Nitrite Oxide 생성 억제 활성 측정

Raw 264.7 세포를 96-well plate에 1 × 10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 농도별 시료액과 lipopolysaccharide (LPS)를 혼합하여 24시간 동안 배양하였다. 이때 LPS는 최종 농도가 2 µg/ml가 되도록 하였다. 세포 배양액을 각 well에서 50 µl씩 회수하여 새로운 96-well plate에 옮기고 50 µl의 1% sulfanilamide (in 5% H₃PO₄)를 첨가한 다음 10분간 혼합한 후, 다시 50 µl의 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (in H₂O)를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켜 micro-plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료액 대신 PBS를 가하여 측정하였으며, 표준물질로 sodium nitrite를 농도별로 조제하여 동일한 방법으로 측정된 흡광도를 바탕으로 작성한 검량선을

이용하여 NO 생성량을 산출하였다 (Ding *et al.*, 1988).

8. MTT assay에 의한 세포독성 측정

Nitric oxide 생성 저해 활성 측정에 필요한 세포 배양액 회수 후 남은 배지 및 세포에 곧바로 PBS에 5 mg/ml의 농도로 용해시켜 제조한 MTT용액을 각 well에 10 µl씩 가하고, 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 4시간 동안 반응시켜 MTT가 환원되도록 하였다. 배지를 제거한 후, 각 well에 100 µl의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료액 대신 PBS를 사용한 blank의 흡광도를 기준으로 세포 생존율 산출하였다 (Shin *et al.*, 2003).

9. 통계분석

모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차 (mean ± SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행하였으며, 유의성은 신뢰구간 p < 0.05에서 의미를 부여하였다.

결과 및 고찰

1. 총 polyphenol 및 flavonoid 함량

각 용매별 찌리 줄기 추출물들의 총 polyphenol과 flavonoid 함량을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. Polyphenol 함량에서 용매별 추출물 중 methanol 추출물이 216.5 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, acetone과 75% ethanol 추출물, 그리고 열수 추출물 순으로 나타났다. 추출용매별로 유의한 차이는 있었으나 전반적으로 나타난 polyphenol 함량은 같은 과에 속하는 황기와 같은 약용 작물 추출물의 함량보다는 높은 수준임을 알 수 있다 (Yin *et al.*, 2009). Flavonoid 함량에서는 acetone 추출물이 40.6 mg/g으로 다른 추출물에 비해 2배 이상의 높은 함량을 나타내었으며, 다음으로는 methanol 추출물에서 15.1 mg/g의 함량을 나타내었다. 식물에 존재하는 polyphenol은 대표적인 2차 대사산물로 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, flavonoid는 polyphenol의 종류로서 flavone (C₆-C₃-C₆) 및 변형된 구조를 가지고 있어서 항산화, 항암, 항균 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Liu, 2004; Manach *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2006).

2. DPPH radical 소거능

각 용매별 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위해 실시한 DPPH radical 소거능 측정에서 50%의 DPPH radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도를 산출한 SC₅₀ 값을 Table 2에 나타내었다. 75% ethanol 추출물의 SC₅₀ 값이 0.69 mg/ml로

Table 1. Total phenolic compound and flavonoid content of extracts from stem of *Lespedeza bicolor*.

Extracts	Total polyphenol (mg/g TAE [†])	Flavonoid (mg/g RE [‡])
ALB	192.6±9.5 ^B	40.6±0.6 ^{*,A**}
ELB	172.9±2.7 ^C	7.2±0.8 ^C
MLB	216.5±5.6 ^A	15.1±0.0 ^B
WLB	149.5±8.4 ^D	2.3±0.6 ^D

[†]TAE : tannic acid equivalent. [‡]RE : rutin equivalent. ALB; acetone extract of *L. bicolor*, ELB; ethanol extract of *L. bicolor*, MLB; methanol extract of *L. bicolor*, WLB; hot water extract of *L. bicolor*. *Values are mean±SD (n = 3). **Different superscript letters in the same line show significant differences at p < 0.05 by one-way ANOVA.

Table 2. SC₅₀ values in DPPH radical scavenging ability of extracts from stem of *Lespedeza bicolor*.

Extracts	SC ₅₀ (mg/ml) [†]	Relative activity (%) [‡]
ALB	0.91±0.03 ^{C*}	25.27
ELB	0.69±0.04 ^B	33.33
MLB	0.89±0.08 ^C	25.84
WLB	1.62±0.07 ^D	14.20
Ascorbic acid	0.23±0.02 ^A	100.00

[†]SC₅₀: concentration of each samples for scavenging 50% of radical. [‡]Relative activity: ratio of SC₅₀ value compared to positive control (ascorbic acid). ALB; acetone extract of *L. bicolor*, ELB; ethanol extract of *L. bicolor*, MLB; methanol extract of *L. bicolor*, WLB; hot water extract of *L. bicolor*. Ascorbic acid was used as a positive control. Values are mean±SD (n = 3) with out relative activity. *Different superscript letters in the same line show significant differences at p < 0.05 by one-way ANOVA.

가장 뛰어난 DPPH radical 소거능을 나타냈는데 이는 positive control로 사용된 ascorbic acid의 SC₅₀ 값을 기준으로 산출한 relative activity로서 33.33% 수준으로 나타났다. 다음으로는 acetone 추출물과 methanol 추출물의 활성이 통계적으로 동일한 수준으로 나타났으며, 열수 추출물의 활성이 가장 낮은 것으로 확인되었다. 일반적으로 DPPH radical 소거능과 같은 항산화 활성이 polyphenol 함량과 밀접한 관련이 있다는 기존의 연구들에서 제시한 결과와는 다르게 용매별 찌리 추출물의 결과는 polyphenol 함량과는 다른 양상을 보여주므로 polyphenol이 아닌 다른 활성 물질에 의해 항산화 활성이 보여졌음을 유추해 볼 수 있기에 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다 (Eom *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010; Im and Lee, 2011).

3. Nitric oxide 소거능

Nitric oxide (NO)는 염증 반응시 면역 반응으로 인해 생성이 증가되는 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)의 하나로 적정 농도로 존재할 때에는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역기능 등의 역할을 하는 물질이지만, 과

Table 3. SC₅₀ values in nitric oxide scavenging ability of extracts from stem of *Lespedeza bicolor*.

Extracts	SC ₅₀ (mg/ml) [†]	Relative activity (%) [‡]
ALB	0.72±0.03 ^{B*}	51.63
ELB	1.52±0.07 ^D	24.45
MLB	1.24±0.05 ^C	30.02
WLB	3.28±0.15 ^E	11.33
Ascorbic acid	0.37±0.05 ^A	100.00

[†]SC₅₀: concentration of each samples for scavenging 50% of radical.
[‡]Relative activity: ratio of SC₅₀ value compared to positive control(ascorbic acid). ALB; acetone extract of *L. bicolor*, ELB; ethanol extract of *L. bicolor*, MLB; methanol extract of *L. bicolor*, WLB; hot water extract of *L. bicolor*. Ascorbic acid was used as a positive control. Values are mean±SD (n = 3) with out relative activity.
^{*}Different superscript letters in the same line show significant differences at p < 0.05 by one-way ANOVA.

량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다 (Chung *et al.*, 2001). 싸리의 용매별 추출물들의 NO 소거능을 측정 한 결과 50%의 NO를 소거하는데 필요한 시료의 농도를 산출한 SC₅₀ 값을 Table 3에 나타내었다. Acetone 추출물의 SC₅₀ 값이 0.72 mg/ml로 추출물들 중 가장 높은 활성을 보였고 methanol 추출물과 75% ethanol 추출물이 각각 1.24 mg/ml 과 1.52 mg/ml로 나타났으며, 열수 추출물은 3.28 mg/ml로 가장 낮은 활성을 나타냈다. 특히 acetone 추출물의 NO 소거능은 positive control로 사용된 ascorbic acid의 소거능을 기준으로 산출한 relative activity로는 51.63%에 해당하는 것으로 나타났다. 또한 Table 1의 polyphenol 함량과의 연관성이 낮았던 Table 2의 DPPH radical 소거능 결과와는 다르게 polyphenol 과 flavonoid 함량과 연관성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

4. Nitric oxide 생성 억제 활성과 세포독성

LPS는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 독소로서 Raw 264.7 세포와 같은 macrophage에 작용하여 tumor necrosis factor-α (TNF-α)나 interleukin-6 (IL-6) 등과 같은 여러 가지 inflammatory cytokine의 발현과 함께 nitric oxide (NO)의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2004). Raw 264.7 세포를 대상으로 실시한 NO 생성 억제 활성 측정에서 전반적으로 모든 추출물이 농도의존적인 NO 생성 억제 활성을 보였으며, 추출 용매별 싸리 줄기 추출물 중 acetone과 methanol 추출물의 NO 생성 억제 활성이 다른 추출물보다 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1). 특히 acetone 추출물의 경우, 130 µg/ml 농도에서는 LPS를 처리하지 않은 control군과 동일한 수준의 nitric oxide 생성량을 보였다. 한편, LPS로 염증반응을 유발시킨 상태에서 추출 용매별 싸리 줄기 추출물의 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과

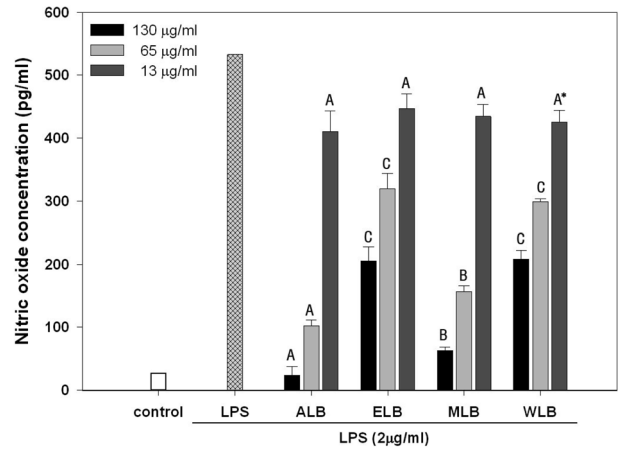


Fig. 1. Nitric oxide scavenging ability of extracts from stem of *Lespedeza bicolor* (n = 3). ALB; acetone extract of *L. bicolor*, ELB; ethanol extract of *L. bicolor*, MLB; methanol extract of *L. bicolor*, WLB; hot water extract of *L. bicolor*. Ascorbic acid was used as a positive control. *Different superscript letters in the same concentration show significant differences at p < 0.05 by one-way ANOVA.

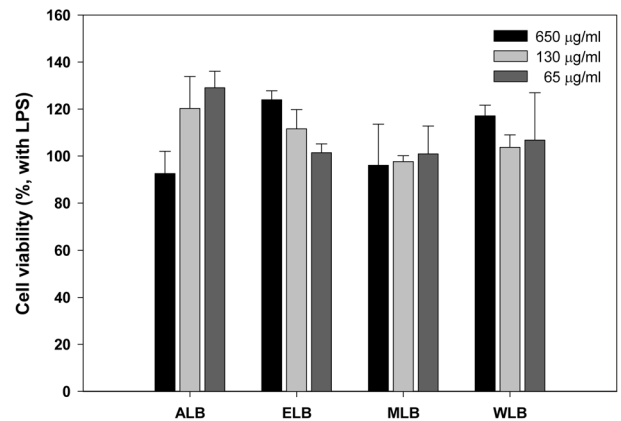


Fig. 2. Raw 264.7 cell viability of extracts from stem of *Lespedeza bicolor* (n = 3). ALB; acetone extract of *L. bicolor*, ELB; ethanol extract of *L. bicolor*, MLB; methanol extract of *L. bicolor*, WLB; hot water extract of *L. bicolor*.

Fig. 2와 같은 세포생존율을 나타내었다. 이와 같은 세포생존율은 용매별 싸리 줄기 추출물이 세포독성에 의해 세포의 증식 자체를 억제시킴으로써 감소시키는 것인지 LPS로 유도된 NO 생성의 억제 또는 생성된 NO의 소거 등을 통하여 생성량을 감소시키는 것인지를 판단하는 중요한 근거가 된다 (Yoon *et al.*, 2010; Jeoung *et al.*, 2009). 실험이 진행된 65~650 µg/ml 농도에서 모든 추출물은 92.57~129.04%의 전반적으로 양호한 세포생존율을 가지는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 싸리나무 줄기의 acetone 추출물이 독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 NO 생성 억제 및 소거능이 뛰어난 것으로 나타났으며, 이는 추출물 중 함유되어 있는

flavonoid 함량과 관련성이 높은 것으로 판단되었다. 따라서 추가적인 연구를 통하여 활성물질의 분리와 동정 등이 이루어진다면 싸리나무의 약용작물로서의 활용 가능성을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

LITERATURE CITED

- Baek SH, Kim JH, Kim DH, Lee CY, Kim JY, Chung DK and Lee CH.** (2008). Inhibitory effect of dalbergioidin isolated from the trunk of *Lespedeza cytobotrya* on melanin biosynthesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:874-879.
- Blois MS.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200.
- Brune B, Zhou J and Von Knechten A.** (2003) Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney International Supplement*. 84:4-22.
- Byun SH, Yang CH and Kim SC.** (2005) Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. *Korean Journal of Herbology*. 20:7-16.
- Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR and Kim YM.** (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282:1075-1079.
- Ding AH, Nathan CF and Stuehr DJ.** (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*. 141:2407-2412.
- Eom HJ, Kim SM, Pyo BS and Lee KI.** (2009). Changes of physiological activity by drying temperature in leaf of *Eriobotrya japonica*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 40: 178-183.
- Fridovich I.** (1989) Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*. 264:7761-7762.
- Im DY and Lee KI.** (2011). Antioxidative and antibacterial activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:238-245.
- Jeoung 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.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ and Han DS.** (1995). Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean Journal of Food Science and Technology* 27:891-896.
- Kang SS, Yun HS and Chang IM.** (1998). Natural products sciences. Seoul National University. Seoul, Korea. p. 289.
- Lee A, Kim BN, Zhoh CK and Shin GH.** (2006a). Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Lespedeza bicolor* extracts. *Journal of Korean Society of Esthetic & Cosmeceutics*. 1:109-120.
- Lee CH.** (1993). *The pharmacology of Chinese herbs*. CRC press. New York, USA. p. 222.
- Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jang Y, Lee SH, Son JK, Baek SH and Chang HW.** (2004). Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor(NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27:617-620.
- Lee YS, Joo EY and Kim NW.** (2005). Antioxidant activity of extracts from the *Lespedeza bicolor*. *Korean Journal of Food Preservation*. 12:75-79.
- Lee YS, Joo EY and Kim NW.** (2006b). Polyphenol contents and physiological activity of the *Lespedeza bicolor* extracts. *Korean Journal of Food Preservation*. 13: 616-622.
- Liu RH.** (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*. 134:3479S-3485S.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A and Remesy C.** (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 2300S-242S.
- Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT and Packer L.** (1994). The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 201:748-755.
- Mitsuhashi H.** (1998). In illustrated medicinal plants of the world in color. Hokuryukan. Tokyo, Japan. p. 220.
- Moreno MIN, Isla MIN, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 71:109-114.
- Oh YJ, Seo HR, Choi TM and Jung DS.** (2010). Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:373-378.
- Ryu IS, Lee SJ, Lee SW, Mun YT, Woo WH, Kim YM, Lee JC and Lim KS.** (2007). Dermal bioactive properties of the ethanol extract from flowers of *Lespedeza bicolor*. *Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 20:1-9.
- Ryu SW, Jin CW, Lee HS, Lee JY, Sapkota K, Lee BG, Yu CY, Lee MK, Kim MJ and Cho DH.** (2006). Changes in total polyphenol, total flavonoid contents and antioxidant activities of *Hibiscus cannabinus* L. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 14:307-310.
- Shin KM, Park YM, Kim IT, Hong SP, Hong JP and Lee KT.** (2003). *In vitro* antiinflammatory activity of amygdalin in murine macrophage Raw264.7 cells. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 34:223-227.
- Videla LA and Fernandez V.** (1988) Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*. 21:85-92.
- Yin Y, Heo SI, Jung MJ and Wang MH.** (2009). Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 40:1-5.
- Yoon TS, Cheon MS, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Chun JM, Choo BK and Kim HK.** (2010). Evaluation of solvent extraction on the anti-inflammatory efficacy of *Glycyrrhiza uralensis*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:28-33.