

## 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하의 생리활성 비교연구

최동훈<sup>1</sup> · 승오탁<sup>2</sup> · 임미혜<sup>1†</sup>

<sup>1†</sup>대전대학교 자연과학대학 뷰티건강관리학과 대학원

<sup>2</sup>중부대학교 한방건강관리학과

(2019년 3월 5일 접수: 2019년 3월 28일 수정: 2019년 3월 29일 채택)

### Comparative study of the biological activities effect of *Mentha arvensis L.* extracts from water and 80% ethanol

Dong-Hun Choi<sup>1</sup> · O-Tak Seung<sup>2</sup> · Mi-Hye Lim<sup>1†</sup>

<sup>1†</sup>Department of beauty healthcare, Graduate School, Daejeon University

<sup>2</sup>Department of Oriental Health Care, Joongbu University

(Received March 5, 2019; Revised March 28, 2019; Accepted March 29, 2019)

**요약** : 본 연구는 박하 추출물을 통해 독성검사 및 항산화, 항염증과 같은 생리활성을 평가하고자 하였다. 박하 추출은 열수 및 80% 에탄올로 추출하였으며, RAW 264.7 세포를 통해 MTT를 통해 세포 생존율을 평가하였다. 또한, LPS로 유도한 RAW 264.7 세포를 통해 활성산소(ROS), 산화질소(NO), 류코트리엔 B4(LTB<sub>4</sub>), 항염 또는 염증성 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10) 등을 ELISA 및 Luminex로 측정하였다. 그 결과, 박하 추출물은 열수 및 80% 에탄올 추출물에서 세포독성이 없었으며, 80% 에탄올 추출물의 100  $\mu$ g/ml 농도에서 활성산소의 생성을 억제하였다. 또한, NO, LTB<sub>4</sub>, 염증 또는 항염증성 사이토카인의 생성을 모든 추출물에서 농도 의존적 효능을 나타냈다. 즉, 박하 추출물은 세포 독성 없이 항산화 및 항염증 활성을 나타내는 생리학적 효능이 나타났다. 이와 같은 결과는 본 연구와 관련된 증상을 개선하기 위한 새로운 건강식품 및 치료제의 원료로 개발될 수 있다.

**주제어** : 항산화, 항염증, 생리활성, 천연 원료, 박하

**Abstract** : The purpose of this study was to investigate the biological activities such as cytotoxic, anti-oxidant and anti-inflammatory using *Mentha arvensis L.* extracts. *Mentha arvensis L.* was prepared by extracting with DW and 80% ethanol, after cell viability was assessed by MTT assay using RAW 264.7 cells. Antioxidant activities, and Anti-inflammatory activities measured through changes in the levels of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), leukotrien B4 (LTB<sub>4</sub>), and anti- or in-inflammatory cytokines(IL-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and IL-10) on LPS-induced RAW 264.7 cells. All test measured by ELISA reader and Luminex. *Mentha arvensis L.* was no cytotoxic in water and 80% ethanol extracts, and Concentration of 100

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: beautyl@dju.kr)

ug/ml of 80% ethanol extract was suppressed the productions of ROS in LPS-induced RAW 264.7 cells. Also, Productions of NO, LTB<sub>4</sub>, inflammatory or anti-inflammatory cytokines showed efficacy change that dose-independent of all extracts. In other words, *Mentha arvensis L.* showed significant biological activities showing anti-inflammatory, and anti-oxidant. These results may be developed as a raw material for new health food and therapeutics to ease the symptoms mentioned above.

**Keywords :** anti-oxidant, anti-inflammatory, biological activities, herbal raw material, *Mentha arvensis L.*

## 1. 서론

천연물은 문헌과 논문 등에 기재된 효능을 바탕으로 임상, 교육, 연구 현장에서 중요한 자료로 활용되며 이를 바탕으로 한 현대적인 탐구가 활발하게 진행되고 있다[1]. 특히, 전 세계적으로 천연물을 활용한 시장이 확대됨에 따라 국내에서도 세계 시장에 진입하고자 건강기능식품과 식의약품, 화장품 등과 같은 분야에서 이와 같은 기초적 자료를 바탕으로 안전성과 효능이 입증된 천연물을 선택함으로써 개발 과정에서 원료 소재의 선별 기간을 단축하고 있다. 또한, 기존 문헌에 제시된 효능과 더불어 항암, 항염증, 항산화 등의 효능을 근거로 하여 신규 효능을 탐색하거나 특정 성분 분석의 분리·공정을 통해 효능을 극대화하는 연구 역시 활발하게 진행되고 있으나 아직도 문헌적 근거에 입각한 새로운 소재의 과학적 검증이 필요한 소재들이 많은 실정이다.

박하는 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 다년생 식물로 한국, 중국, 시베리아 습지에 자생하며[2], 박하의 기원에 대해 한국에서는 *Mentha arvensis L.*로, 중국에서는 *M. haploxylys Briq.*로 규정하고 있어 한국과 중국 간의 기원 종 차이가 존재하는 천연물 중 하나이다[3,4]. 문헌에서 박하의 효능으로는 감기로 인한 발열, 두통, 땀이 나지 않는 증상에 사용하고 충혈, 인후염, 편도선염, 피부가려움증, 간 질환, 복통, 설사 구토 등의 효능이 있으며[5], 약리 작용으로는 해열, 소염, 담즙분비 촉진 및 위장 평활근 억제, 호흡 기도의 점액분비 증가, 중추신경 흥분, 자궁수축 등이 기재된 천연물이다[5]. 그러나 박하의 다양한 효능에 비해 진행된 연구는 항산화, 항암, 항알레르기, 항균 등이 보고되었으나[6-9], 인후염과 편도선염 등의 효능에 입각한 항염증 연구를 비롯하

여 활성산소(Reactive oxygen species, ROS) 저해와 같은 항산화 효능 연구는 진행된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 국내산 박하로 식의약품과 화장품 등 다양한 분야에서 활용도가 높은 열수 및 80% 에탄올 추출을 진행한 추출물을 통해 세포독성 및 활성산소, 항염증 등 국내에서 검증되지 않은 매개체의 효능 비교를 진행함으로써 박하에 대한 과학적인 효능 검증과 동시에 여러 분야에 신규 소재로서의 활용이 가능하도록 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시료

국내산 박하 (*Mentha arvensis L.*)를 경동시장(Korea)에서 구매하여 불순물 제거를 위해 수세한 후 25°C에서 24시간 건조하였다. 건조된 박하를 40 mesh 크기로 분쇄한 후 -80°C에서 저장하면서 실험에 이용하였다.

### 2.2. 시약 및 기기

시약은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS : Welgene Co., Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., UK), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), CCK-8 (Dojindo, U.S.A), Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co.,

U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS : Sigma Co., U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH : Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), ethanol (Merck Co., Germany), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck Co., Germany), gallic acid (Sigma Co., U.S.A.), quercetin (Sigma Co., U.S.A.), sodium carbonate (Sigma Co., U.S.A.), aluminum nitrate nonahydrate (Sigma Co., U.S.A.), potassium acetate solution (Sigma Co., U.S.A.) 등을 사용하였다. 또한, 기기는 감압 농축기 (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.), 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

### 2.3. 박하 추출물 제조

박하 50 g에 증류수와 80% 에탄올 각각 1 L 씩 넣고 3시간 동안 환류 추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 증류수 분말 4.7 g (수득율 9.4%)과 에탄올 분말 5.3 g (수득율 10.6%)을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

### 2.4. 세포 배양

한국세포주은행 (Korea)에서 구매한 RAW 264.7 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml에 넣어 부유시키고 세포배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

### 2.5. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다.

이후 새로운 배양액으로 교체한 후 증류수 및 80% 에탄올의 박하 추출물을 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 µl의 CCK-8 solution을 첨가하여 세포배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정한 후 시료를 첨가하지 않은 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

## 2.6. Reactive oxygen species(ROS)

### 저해 효능 측정

12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10<sup>5</sup> cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 증류수 및 80% 에탄올의 박하 추출물 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도에 LPS를 1 µg/ml의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA를 10 µM씩 처리하여 15분 동안 세포 배양기에서 반응시켰다. 염색 후 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 PBS 400 µl를 부유시켜 Flow cytometer를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였으며, 배양액에 LPS만을 처리한 대조군을 기준으로 활성산소저해 효능을 백분율로 표시하였다.

## 2.7. 항염증 효능 측정

염증 관련 매개체 측정을 위한 시료를 확보하기 위해 12 or 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 1.5×10<sup>5</sup> cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 증류수 및 80% 에탄올의 박하 추출물 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도에 LPS를 1 µg/ml의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 시료를 다음과 같은 방법에 따라 각각 활용하였다.

### 2.7.1. Nitric oxide(NO) 생성량

96 well plate에 배양한 시료를 nitric oxide detection kit의 구성 물질인 N1 buffer 50 µl를 각 well에 처리하고 10분간 상온에서 반응시키고 N2 buffer 50 µl를 추가하여 10분간 다시 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 배양액에 LPS만을 처리한 대조군을 기준으

로 NO 생성 저해 효능을 백분율로 표시하였다.

### 2.7.2. Leukotrien B4(LTB<sub>4</sub>) 생성량

12 well plate에 배양한 시료를 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상등액과 LTB<sub>4</sub> kit의 standard를 96 well plate에 50  $\mu$ l씩 분주하고 primary antibody solution 50  $\mu$ l를 넣어 1시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, LTB<sub>4</sub> conjugate 50  $\mu$ l를 넣고 다시 3시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 그 다음 wash buffer 400  $\mu$ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 substrate solution 200  $\mu$ l를 첨가하고 상온에서 30분 동안 빛을 차단한 채 반응시켰다. 마지막으로 stop solution 100  $\mu$ l를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 배양액에 LPS만을 처리한 대조군을 기준으로 LTB<sub>4</sub> 생성 저해 효능을 백분율로 표시하였다.

### 2.7.3. 염중 및 항염중 사이토카인(cytokine) 생성량

12 well plate에 배양한 시료를 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상등액과 cytokine kit의 스탠다드를 96 well plate에 25  $\mu$ l씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25  $\mu$ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 세척 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 25  $\mu$ l의 detection antibody을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시키고 추가로 25  $\mu$ l의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 세척하였다. 세척 후 PBS를 150  $\mu$ l를 넣고 5분 간 반응 시킨 후 Luminex를 이용하여 cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  생성량을 동시에 측정하였다.

### 2.8. 통계처리

모든 실험결과는 3회 반복 측정하였으며 평균 값 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ S.D)로 표시하였다. 대조군 대비 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05).

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 세포독성

인체의 생체방어 및 면역에 대한 매커니즘은 매우 복잡하고 다양한 세포들이 관여하는 것으로 알려져 있다[10]. 생체방어 기전 중 바이러스가 생체 내로 침입하였을 때 가장 먼저 반응하는 면역세포는 단핵구 (monocyte), 호중구 (neutrophil) 및 대식세포 (macrophage) 등이 있고, 이들은 선천면역체계의 중추적인 역할을 담당한다[11]. 이 중 대식세포 (macrophage)는 점막을 가지고 있는 상피세포 장벽 이후 생체방어 시스템에 있어 최초로 병원체에 대응하는 면역세포로서 항원의 감시 및 이동, 식균작용 등에 매우 중요한 역할을 담당한다[12]. 또한, 후천면역계를 담당하는 T 세포와 반응하여 T 세포의 활성을 조절하는 역할을 수행하므로 선천면역뿐만 아니라 후천 면역계에서도 중요한 역할을 수행하는 대식세포를 활용한 세포 생존을 평가는 연구자가 손쉽게 다룰 수 있어 실험이 용이하고 대식세포의 사멸은 인체에 악영향을 나타내기 위해 시료의 연구 농도 선정에 많이 활용되고 있다[12].

본 연구에서 박하 추출물에 대한 세포 생존율을 측정된 결과, 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물 모두 모든 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 안전한 것으로 확인되었다(Fig. 1). 따라서 이후의 연구는 독성이 나타나지 않은 범위에서 진행하였다.

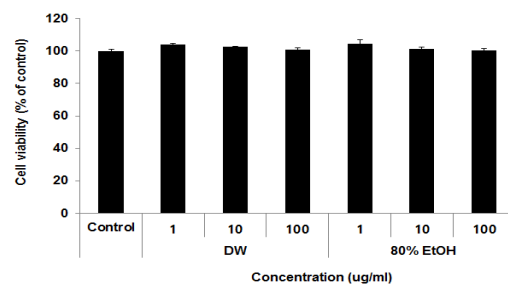


Fig. 1. Effect of *Mentha arvensis* L. extracts from DW and 80% EtOH on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml) of *Mentha arvensis* L. extracts from DW, and 80% EtOH. The cell viability in RAW 264.7 cells were measured using ELISA. The results were expressed as mean $\pm$ S.D. from three independent experiments. Control is non treated extracts.

### 3.2. 활성산소 저해 효능

대식세포는 외부에서 인체 내로 바이러스, 이물질, 병원 미생물 등이 침투할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 반응성이 높은 독성 물질인 활성산소(ROS)를 생산하게 되어 활성산소의 우선적인 기능은 살균작용과 세포 상해작용이라 할 수 있다[13]. 하지만 이와 같은 활성산소는 정상 세포에 작용하면 암, 심혈관계 질환, 등을 유발과 피부 세포 및 조직에 손상을 주도한다. 이들은 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 피부 항산화 방어망을 파괴함으로써 멜라닌 생성반응을 촉진하고 DNA 산화와 같은 인체 구성 성분을 파괴하게 된다[6]. 이로 인해 피부 염증 유발, 피부 면역기능을 저해시켜 탄력이 감소하고 주름 및 기미, 주근깨 등으로 피부 노화를 가속화 한다[10,14]. 이처럼 활성산소는 인체의 과도한 발생 부위에 따라 특정 질환을 유발할 수 있으므로 활성산소의 효과적인 생성량 감소는 질환 발병을 예방하고 발생한 질환이 개선될 수 있다.

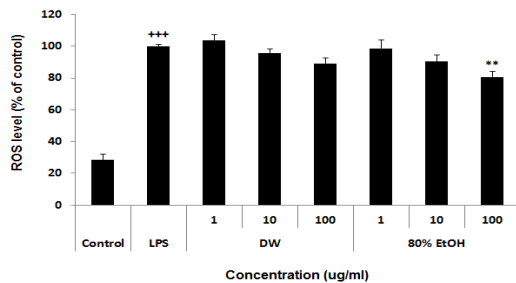


Fig. 2. Effect of *Mentha arvensis* L. extracts from DW and 80% EtOH on ROS levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *Mentha arvensis* L. extracts from DW, and 80% EtOH. The ROS levels in RAW 264.7 cells were measured using flow cytometry. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. (Significance of results, \*\* $p < 0.01$  compare to control) from three independent experiments. Control is non treated LPS; LPS is only LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

본 연구에서 박하 추출물에 대한 활성산소 생성량을 측정된 결과, 80% 에탄올 추출물의 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 과도하게 생성된 활성산소를 80% 에탄올 추출물에서 유의적으로 저해시키는 것으로 볼 때 활성산소 개선을 위한 박하의 활용 시에는 에탄올 추출이 바람직한 것으로 나타났다. 다만, 천연물이 가지고 있는 성분 추출이 상대적으로 증류수 대비 우수한 것으로 알려진 에탄올 용매의 특성에 의한 결과인지는 추후 다른 분석을 통해 검증해 볼 필요가 있다고 판단된다.

### 3.3. 항염증 효능

#### 3.3.1. NO 생성량

면역 반응에 비해 면역 관용 기작이 강해질 경우, 인체 면역계는 암, 외부 바이러스, 병원균 등의 침입이 용이하여 바이러스 및 세균성 질환을 발생시키며, 이와 반대로 면역 반응성이 면역 관용 기능보다 강해질 경우는 류마티스관절염과 같은 자가 면역질환, 강력한 이식 거부 반응 및 알레르기과 같은 염증성 질환을 초래하게 되므로 면역과 염증은 서로 밀접한 관계에 있다고 할 수 있다[15]. 특히 염증반응은 상처와 외부 이물질의 침입 시 생체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 선천성 면역 (innate immunity) 반응이라고 알려져 면역과 염증의 관계를 더욱 뒷받침 해주고 있다[16]. 이러한 면역과 염증반응에 동시에 관여하는 대표적인 물질인 일산화질소(NO)는 혈액 응고와 혈압 조절, 암세포에 대한 면역 효능이 있으나, 활성산소와 마찬가지로 과도하게 생성되면 인체에 세포손상과 염증반응을 통해 파킨슨, 알츠하이머, 관절염 등과 같은 퇴행성 질환의 주된 원인으로 작용하게 된다[17,18].

본 연구에서 박하 추출물에 대한 NO 생성량을 측정된 결과, 열수 추출물의 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서, 80% 에탄올 추출물은 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 NO와 ROS 간의 상관관계를 보았을 때, 앞선 활성산소 생성량 저해 효능과 마찬가지로 에탄올 추출물이 효과적으로 활용될 수 있다는 견해를 뒷받침하고 있다.

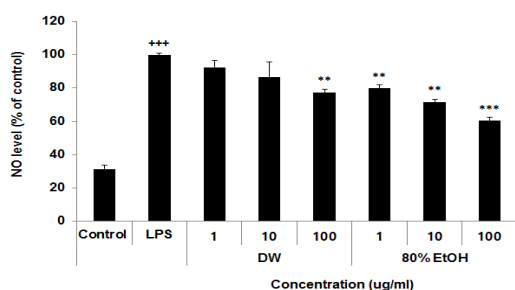


Fig. 3. Effect of *Mentha arvensis L.* extracts from DW and 80% EtOH on NO levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *Mentha arvensis L.* extracts from DW, and 80% EtOH. The NO levels in RAW 264.7 cells were measured using ELISA. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. (Significance of results, \*\* $p < 0.01$  compare to control) from three independent experiments. Control is non treated LPS; LPS is only LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3.3.2. LTB<sub>4</sub> 생성량

LTB<sub>4</sub>(leukotrien B<sub>4</sub>)는 LPS(Lipopolysaccharides)의 활성화에 따른 주된 산물로 염증반응 시 호산구와 호중구에 대하여 강력한 유주성 특성을 갖는 성분으로 알려져 있으며, 세포의 화학 주성에 필요한 다양한 인자들과 세포부착 인자의 발현에 영향을 주어 치주염, 관절염 및 다수의 염증성 질환에 핵심적 기능을 하는 인자이다[19]. 이로 인해 LTB<sub>4</sub>의 과도한 생산은 염증성 질환의 악화를 통해 면역세포인 백혈구 수의 증가, 면역복합체의 농도 증가 등과 상관관계를 나타내는 인자로 알려져 염증반응에서 LTB<sub>4</sub>의 생성량을 저해하는 천연물은 다양한 염증성 질환에 대한 치료제의 원료 소재이다.

본 연구에서 박하 추출물에 대한 LTB<sub>4</sub> 생성량을 측정된 결과, 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물의 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 박하 추출물은 염증성 질환에 대한 대안으로 활용될 수 있으며, 더 나아가 백혈구를 조절과 연관되는 LTB<sub>4</sub> 생성량에 대한 효과는 면역 세포 조절을 통해 급성기, 만성기 염증 질환

에 대해서도 활용도가 높다고 판단된다.

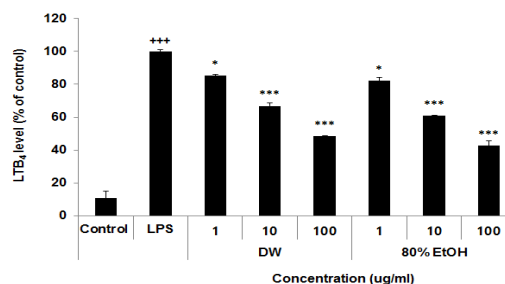


Fig. 4. Effect of *Mentha arvensis L.* extracts from DW and 80% EtOH on LTB<sub>4</sub> levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *Mentha arvensis L.* extracts from DW, and 80% EtOH. The amount of LTB<sub>4</sub> levels in supernatant was measured using ELISA. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. (Significance of results, \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  compare to control) from three independent experiments. Control is non treated LPS; LPS is only LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3.3.3. 사이토카인 생성량

NO와 마찬가지로 인체 내 면역과 염증을 동시에 관여하는 물질인 사이토카인 중 TNF- $\alpha$ 는 활성화된 단핵구(대식세포)에 의해 생산되며, 염증 및 호중구의 활성화, 단백질 합성 등의 역할을 하는 상위 사이토카인으로써[20,21], IL-1, IL-6와 같은 하위 염증 매개물질의 생성을 유발하여 염증을 전신성으로 야기시킨다[22]. TNF- $\alpha$ 에 의해 생성된 IL-1 $\beta$ 는 염증 초기 단계에 발생하는 사이토카인이며, 발열 및 연골, 활막 세포에서 PGE<sub>2</sub>, NO 등의 다른 염증 매개체를 생산하고 MMPs의 발현을 자극하여 골관절염, 피부 질환 등에 관여하는 강력한 cytokine으로 알려져 있으며[23,24], IL-6은 염증 반응시 분비되는 친염증성 cytokine으로, 대식세포, 비만세포, Th세포, 상피세포, 섬유아세포 등에서 분비되어 면역반응, 조혈, 염증을 조절한다[25]. 또한, 아토피 피부염의 주된 특징인 Immunoglobulin E(IgE)로의 전환과 류마티스관절염을 일으키는 대표적인 사이토카인이다. IL-10은 염증성 사이토카인 IL-1

$\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 반대의 경향을 보이는 항염증성 사이토카인으로 염증반응에서 B세포 생존과 증식, 항체 생산을 향상시키고 염증 전사인자인 NF- $\kappa$ B 활성을 차단하고 LPS를 억제하는 등 염증 반응 개선에 필수적인 사이토카인이다.

본 연구에서 박하 추출물에 대한 염증성 사이토카인 생성량을 측정된 결과, IL-1 $\beta$  생성량은 열수추출물과 80% 에탄올 추출물의 10, 100 ( $\mu$ g/ml) 농도에서, IL-6 생성량은 열수추출물의 10, 100 ( $\mu$ g/ml), 80% 에탄올 추출물의 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml) 모든 농도에서, TNF- $\alpha$  생성량은 열수추출물 및 80% 에탄올 추출물의 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감

소가 나타났다(Fig. 5A, B, C). 또한, IL-10 생성량은 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물의 10, 100 ( $\mu$ g/ml) 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 5D). 이와 같은 결과는 박하 추출물이 항염증성 사이토카인 IL-10 생성을 통해 염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 염증성 사이토카인을 억제함으로써 다양한 염증성 질환에 활용해 볼 수 있는 기초적 데이터를 확보하였으며, 이는 급성/만성기 염증 질환에 대한 동물실험(급성 염증, 아토피피부염, 천식, 관절염 등)에 활용함으로써 우수한 결과가 도출된다면 임상 질환에 대한 원료로 사용해 볼 수 있는 근거자료임을 나타내고 있다.

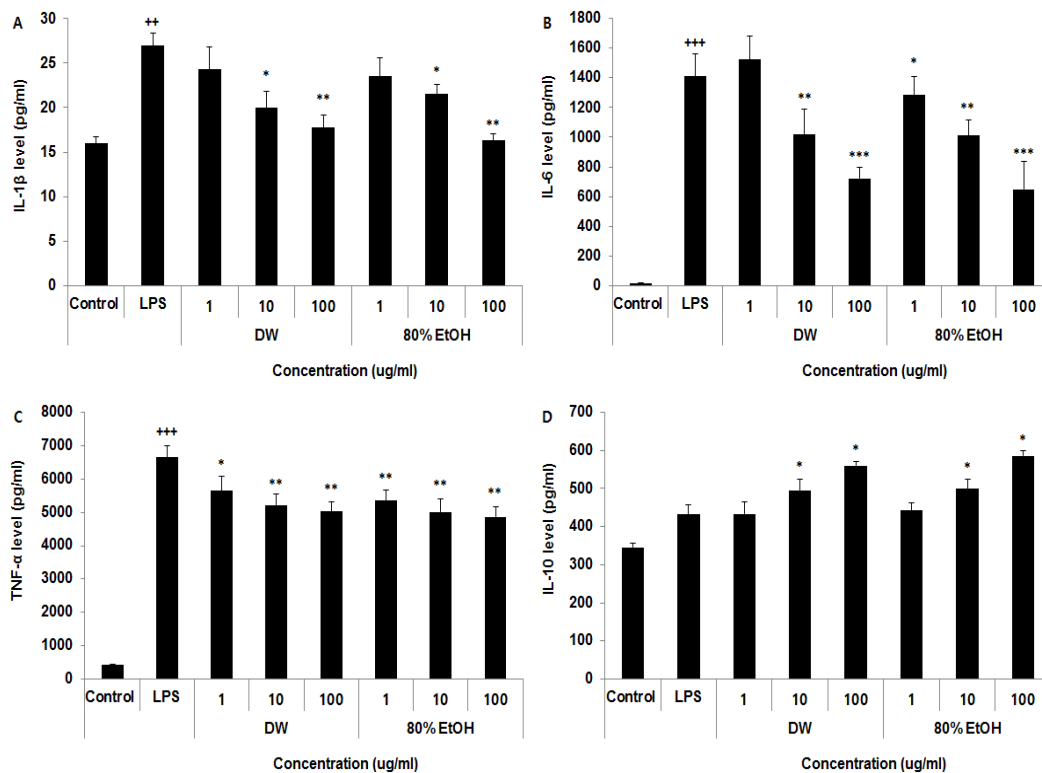


Fig. 5. Effect of *Mentha arvensis* L. extracts from DW and 80% EtOH on cytokine IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), TNF- $\alpha$  (C), and IL-10 (D) levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml) + LPS 1  $\mu$ g/ml of *Mentha arvensis* L. extracts from DW, and 80% EtOH. The amount of cytokine levels in supernatant was measured using Luminex. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. (Significance of results, \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05 compare to control) from three independent experiments. Control is non treated LPS; LPS is only LPS 1  $\mu$ g/ml.

#### 4. 결론

본 연구는 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하 추출물에 대한 세포독성 및 항산화, 항염증 등의 효능에 관한 비교를 진행한 결과는 다음과 같다.

1. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하 추출물은 RAW 264.7 세포에서 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 안전한 것으로 확인되었다.
2. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하 추출물은 LPS로 활성산소를 과생성시킨 RAW 264.7 세포에서 활성산소 생성량을 80% 에탄올 추출물 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 확인되었다.
3. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 NO 생성량을 열수 추출물은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서, 80% 에탄올 추출물은 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 확인되었다.
4. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서  $\text{LTB}_4$  생성량을 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물의 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 확인되었다.
5. 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하 추출물은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서  $\text{IL-1}\beta$  생성량은 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물의 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도에서,  $\text{IL-6}$  생성량은 열수 추출물의 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 80% 에탄올 추출물의 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 모든 농도에서,  $\text{TNF-}\alpha$  생성량은 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물의 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다. 또한,  $\text{IL-10}$  생성량은 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물의 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 증가가 나타났다.

#### References

1. J. Oh, "HF-IFF: Applying TF-IDF to Measure Symptom-Medicinal Herb Relevancy and Visualize Medicinal Herb Characteristics-Studying Formulations in Cheongkangeuigam", *The Korea Journal of Herbology*, Vol.30, No.3, pp. 63-68, (2015).
2. T. Y. Kim, "Inhibition of immunologic and nonimmunologic stimulation-mediated anaphylactic reactions by the aqueous extract of *Mentha arvensis*", *Immunopharmacology and immunotoxicology*, Vol.25, No.2, pp. 273-283, (2003).
3. National Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. p. 392-393, Park 1, (2010).
4. South Korea college of pharmacy conference. *Pharmacopoeia person and society, Korean Pharmacopoeia*. p. 1123, Shinilbooks, (2007).
5. K. H. Bae, *Medicinal plants of Korea*. p.439, Koy-Hak Publishing, (2000).
6. A. Schuhmacher, J. Reichling, P. Schnitzler, "Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro" *Phytomedicine*, Vol.10, No.6, pp. 504-510, (2003).
7. C. Tassou, K. Koutsoumanis, G. J. Nychas, "Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil", *Food Research International*, Vol.33, No.3, pp. 273-280, (2000).
8. S. E. Lee, H. S. Han, I. B. Jang, G. S. Kim, N. S. Seong, "In vivo Physiological Activity of *Mentha viridis* L. and *Mentha piperita* L.", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol.13, No.6, pp. 261-267, (2005).
9. A. Kumar, R. M. Samarth, S. Yasmeen, A. Sharma, T. Sugahara, T. Terado, H. Kimura, "Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*", *Biofactors*, Vol.22, No.14, pp. 87-91, (2004).



10. 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).
11. 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).
12. V. M. Ripoll, N. A. Meadows, L. J. Raggatt, M. K. Chang, A. R. Pettit, A. I. Cassady, D. A. Hume, "Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB", *Gene*, Vol.413, No.1, pp. 32-41, (2008).
13. H. S. Jung, Y. S. Song, K. H. No, Y. H. Jo, J. Y. Park, C. Y. Choi, T. Y. Kwon, "Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats", *Journal of Life Science*, Vol.13, No.3, pp. 333-342, (2003).
14. S. M. Park, "Effect of Natural Products on Skin Cells -Action and Suppression of Reactive Oxygen Species-", *The Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.32, No.10, pp. 77-127, (1999).
15. 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).
16. L. Ferrero-Miliani, O. H. Nielsen, P. S. Andersen, S. E. Girardin, "Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation", *Clinical & Experimental Immunology*, Vol.147, No.2, pp. 227-235, (2007).
17. H. T. Chung, H. O. Pae, B. M. Choi, T. R. Billiar, Y. M. Kim, "Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol.282, No.5, pp. 1075-1079, (2001).
18. H. S. Han, "Effect of fermented artemisiae argyi folium on human hepatoma cell line HepG2 activity", *The Korea Journal of Herbology*, Vol.28, No.3, pp. 107-113, (2013).
19. S. Laufer, "Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis", *Current opinion in rheumatology*, Vol.15, No.5, pp. 623-627, (2003).
20. A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology E-Book*. Elsevier Health Sciences, (2014).
21. K. J. Tracey, Y. Fong, D. G. Hesse, K. R. Manogue, A. T. Lee, G. C. Kuo, A. Cerami, "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia", *Nature*, Vol.330, No.6149, pp. 662-664, (1987).
22. J. S. Smolen, D. Aletaha, M. Koeller, M. H. Weisman, P. Emery, "New therapies for treatment of rheumatoid arthritis", *The Lancet*, Vol.370, No.9602, pp.1861-1874, (2007).
23. H. Hulejova, V. Barešová, Z. Klézl, M. Polanská, M. Adam, L. Šenolt, "Increased level of cytokines and matrix metallo-proteinases in osteoarthritic subchondral bone", *Cytokine*, Vol.38, No.3, pp. 151-156, (2007).
24. A. Legrand, B. Fermor, C. Fink, D. S. Pisetsky, J. B. Weinberg, T. P. Vail, F. Guilak, "Interleukin-1, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci", *Arthritis & Rheumatology*, Vol.44, No.9, pp. 2078-2083, (2001).
25. M. J. Tak, M. R. Tark, K. H. Kang, W. S. Ko, H. J. Yoon, "The Inhibitory effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells", *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*, Vol.23, No.1, pp. 118-134, (2010).