

초석잠 추출물의 항산화, 항균 및 항염 활성

이정호*

(재)순창건강장수연구소, 연구원

Antioxidant, Antibacterial and Anti-inflammatory Effects of *Stachys sieboldii* Extract

Jeong Ho Lee*

Researcher, Sunchang Research Institute of Health and Longevity, Sunchang 56015, Korea

Abstract - This study was conducted to evaluate antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and digestive enzyme activity in water extract (SAW) and 60% ethanol extract (SAE) from *Stachys sieboldii*. As the treatment concentration of each extract *S. sieboldii* extract increased, antibacterial and antioxidant activity increased. The total polyphenol and total flavonoid contents of SAW were 106.25 ± 0.94 mgGAE/g, 24.4 ± 0.24 mgQE/g and SAE were 124.61 ± 1.11 mgGAE/g, 45.2 ± 3.52 mgQE/g, respectively. The 400 μ g/mL of SAW and SAE performed more than 53% protective effects against oxidative stress in HepG2 cell lines. All extracts were not showed cytotoxicity to RAW 264.7 cell line at 100 μ g/mL. NO production was reduced to $44.3 \pm 1.4\%$ for SAW and $45.1 \pm 1.0\%$ for SAE at a concentration of 100 μ g/mL. The production of inflammatory cytokines each TNF- α , IL-1 β , and IL-6 was inhibited in a concentration-dependent. *S. sieboldii* extract did not showed Caco-2 cells cytotoxicity and inhibited NO production in concentration-dependent. As the concentration of the *S. sieboldii* extract increased of α -amylase and protease enzymes activity, which are digestive enzyme. As a result of the experiment, it is judged that it can be used as basic data for the development of health food using *S. sieboldii*.

Key words - Antiinflammatory, Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxicity, *Stachys sieboldii*

서 언

경제성장과 국민의 생활수준이 향상됨에 따라 식생활 및 식품관이 변화하여 고혈압, 당뇨병, 심혈관계 질환 등의 성인병이 증가하고 있다. 이들 질환은 체내에서 생성되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)와 매우 밀접한 관계가 있다. 체내 활성산소인 hydroxy radical, hydrogen peroxide, superoxide anion radical, singlet oxygen 등은 산화력이 강하여 체내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발시켜 지질과산화물을 유도하고 DNA, 단백질, 세포막 등을 손상시킨다. 산화는 성장 및 생명유지에 필요한 에너지를 생성하는 과정이지만 활성산소를 생성한다(Aiyegoro and Okoh, 2010; Kim *et al.*, 2009; Sim *et al.*, 2017). 체내에 활성산소가 발생하면 항산화 효소인 super-

oxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다. 하지만 항산화 방어체계가 비정상적으로 작동하거나 산화적 스트레스를 억제시키지 못하면 인체 노화와 각종질환을 유발시킨다. 항산화 활성 물질인 phenolic compound, flavone유도체, tocopherol류, ascorbic acid, carotenoids, glutathione, 아미노산 등은 열 안정성이 낮고, 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 등은 세포대사, 체내 에너지 생산 및 호흡작용을 방해하며, 암을 유발하는 등의 독성과 부작용이 있다(Doh *et al.*, 2011; Je, 2015; Lee, 2007; Soory, 2009). 염증반응(inflammatory response)은 감염, 화학물질 등 외부의 자극으로부터 인체 손상 방어와 손상된 조직을 회복시키는 인체 면역반응이다. 염증은 활성화된 대식세포(macrophage)에서 분비되는 염증매개체(inflammatory mediators)와 사이토카인(cytokines)에 의해서 조절된다(Cho *et al.*, 2009; Guzik *et al.*,

*교신저자: E-mail wooju0717@hanmail.net

Tel. +82-63-653-8710

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

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.

2003; Kim *et al.*, 2021). 체내에 염증반응이 발생하면 lipopoly-saccharide (LPS), reactive nitrogen species (RNS), cytokine 등에 의하여 염증반응이 활성화되어 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) 등의 염증인자와 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 등의 염증성 사이토카인을 생성한다. NO는 RNS의 일종으로 iNOS 단백질에 의해 조절되고, O₂⁻와 반응하여 peroxynitrite를 생성한다. Peroxynitrite는 지질과 단백질의 과산화를 유도시켜 세포독성을 일으킨다(Cho *et al.*, 2009; Lee and Kang, 2018; Park *et al.*, 2011). 대식세포는 체내 모든 조직에 존재하는 것으로 면역기능과 항상성을 유지시켜 신체를 보호하며, 염증 매개 물질을 분비하여 바이러스, 세균 등의 유해물질을 외부로 배출시킨다(Park *et al.*, 2016; Radi *et al.*, 1991). 염증반응이 지속적으로 발생하면 대식세포가 과도하게 반응하여 염증매개 물질인 NO의 생성이 많아져 세포독성, 염증 반응의 항진, 혈관 확장, 상처 치유 억제, 신경조직, 종양, 자가면역질환, 당뇨, 동맥경화, 암, 관절염, 염증성 장 질환 등을 일으킨다(Chiou *et al.*, 2001; Min and Park, 2009; Park *et al.*, 2016). LPS로 RAW 264.7 세포를 자극하면 L-1 β , IL-6, TNF- α 등의 사이토카인의 발현을 증가시킨다. 발현된 사이토카인은 대식세포를 활성화시켜 염증반응을 일으키는 매개체로 작용한다. 따라서 사이토카인의 억제는 항염증 효능의 지표라 할 수 있다. 천연자원인 식물, 동물, 해양식물 등에 함유된 polyphenol, flavonoid, tannin 등의 phytochemicals는 식물의 2차 대사산물로서 독성이 거의 없고, 각종 질병의 예방과 치료 및 건강증진에 효과가 있다(Kim, 2020; Salagami *et al.*, 2007). 초석잠(*Stachys sieboldii*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 1년생 초본식물로서 여름에 잎이 무성하고 겨울에는 뿌리가 누에 모양을 하고 있다. 중국, 대만, 일본, 러시아 등에서 주로 재배되고 있으며, 다양한 기능이 입증되면서 우리나라에서도 재배면적이 증가하고 있다. 초석잠은 면역효과, 자가면역질환 억제, 기억력 증진, 뇌경색 및 노인성 치매 예방, 소화기관 강화, 항산화, 항암, 항균, 항알러지, 배변작용, hyarulonidase 억제, acetylcholinesterase 및 monoamine oxidase 활성 억제 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 한의학적 효능은 독이 없고 어혈과 적혈을 없애고, 기를 안정시켜 신체를 조화시키며, 간을 좋게 하여 황달을 낫게 하고, 사지무력, 마비, 골절통, 관절염, 신경통, 감기와 기침 치료, 자양강장에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Hwang *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2002). 성분은 stachyose, phenylethanoid glycosides, flavonoid, iridoids,

fatty acid, caffeic acid, n-methoxybaicalein, palustrine, palustinoside 등을 함유하고 있다(Hwang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017).

최근 coronavirus disease 2019 (COVID-19), severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), middle eastern respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) 등 새로운 질병이 출현함에 따라 면역증진, 항암, 항산화, 항염 등에 효능을 갖는 천연자원에 대한 관심이 증가되고 있으며, 이와 관련된 생리활성 및 기능성 물질에 대한 연구가 증가하고 있다(Cha and Kim, 2008; Jun *et al.*, 2014). 또한 건강과 웰빙에 대한 관심이 높은 현대인들로 인하여 항산화, 항암, 항염, 면역 증진 등 건강에 유익한 천연자원 및 건강식품에 대한 수요가 증가하고 있다. 이에 따라 인체에 부작용이 없는 천연자원을 이용한 건강기능식품의 개발이 증가하고 있으며, 관련 산업과 시장이 성장하고 있다(Cha and Kim, 2008; Jun *et al.*, 2014). 전북 순창은 지형적 특성상 초석잠 재배에 적합한 지역으로 재배 면적이 증가하고 있다. 따라서 순창에서 생산된 초석잠에 대한 항산화, 항염, 항균 및 소화효소 활성을 측정하여 건강식품 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 추출물 제조

본 연구에 사용된 시료는 2019년 전북 순창에서 생산된 초석잠으로 순창군농특산물직판장에서 구입한 후 동결건조기(LP20, IIShinBioBase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 건조시켰다. 완전히 건조된 초석잠은 분쇄기(HR3752/00, Philips, Amsterdam, Nederland)를 이용하여 분쇄하고 100 mesh 체로 걸러 균질화한 후 추출에 사용하였다. 추출은 시료와 추출 용매(증류수, 60% 에탄올)를 1:5 비율로 혼합하여 증류수는 100°C, 5시간과 60% 에탄올은 40°C, 2시간 조건에서 추출하였으며, 추출 후 원심분리기(Super-22K, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm, 15분간 원심분리시켜 고형물을 완전히 제거하고, 동결건조를 통해 물 추출물(SAW, 5.40 g, 수율 27.0%)과 60% 에탄올 추출물(SAE, 7.09 g, 수율 35.5%)을 제조하여 실험에 사용하였다.

재료 및 시약

2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS), Folin-

Ciocalteu's phenol reagent, ascorbic acid, gallic acid, quercetin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), potassium persulfate ($K_2S_2O_8$), amoxicillin, lipopolysaccharide (LPS), sulfanilamide, n-ethylendiamine dihydrochloride, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), MEM medium, 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사 제품, LB Broth, Miller (Luria-Bertani), brucella broth는 Difco (Detroit, MI, USA)사 제품, Fetal bovine serum (FBS)는 HyClone (Pittsburgh, PA, USA)사 제품, Dulbecco's modified essential medium (DMEM)은 Welgene (Korea)사 제품, penicillin-streptomycin (PS)은 HyClone (Pittsburgh, PA, USA)사 제품, mouse TNF ELISA set은 BD Biosciences (San Diego, CA., USA)사 제품, Hank's balanced salt solution (HBSS)는 HyClone (Pittsburgh, PA, USA)사 제품을 사용하였다.

항산화 활성

DPPH 라디칼 소거능은 Wang *et al.* (2005)의 실험방법을 일부 변형하여 측정하였다. 312.5-10,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 조제된 시료 40 μL 와 0.2 mM DPPH 용액 180 μL 를 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Infinite M200 Pro, Zurich, Switzerland)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래 식을 활용하여 산출하고 라디칼을 50% 감소시키는 IC (Inhibitory Concentration)₅₀ 값으로 표시하였으며, 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging 활성 (\%)} = 1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}} \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능은 Berg *et al.* (1999)의 실험방법을 일부 변형하여 측정하였다. 반응용액은 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 12시간 동안 반응시켜 흡광도가 734 nm 파장에서 1.0이 되도록 조정하여 사용하였다. 농도별로 조제된 시료 10 μL 와 ABTS 반응용액 190 μL 를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 아래 식을 활용하여 산출하고 라디칼을 50% 감소시키는 IC₅₀값으로 표시하였으며, 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용

하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging 활성 (\%)} = 1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}} \times 100$$

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 실험방법을 일부 변형하여 측정하였다(Singleton and Rossi, 1965). 농도별로 조성된 시료 1 mL에 1 N Folin-Ciocalteu's reagent 용액 0.5 mL와 5% Na_2CO_3 용액 1 mL를 첨가하여 압소에서 1시간 동안 반응시킨 후 분광광도계 (Agilent 8453, Agilent, CA, USA)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 분석하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid의 표준곡선(25-200 $\mu\text{L/mL}$, 회귀식 $y = 0.0055x - 0.0318$, $R^2 = 0.9969$)을 활용하여 측정하였으며, mg gallic acid equivalent(GAE)/g으로 총 폴리페놀 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Moreno *et al.* (2000)의 실험방법으로 측정하였다. 시료 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 용액 0.1 mL, 1 M potassium acetate 용액 0.1 mL, ethanol 4.3 mL 첨가하여 실온에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 분석하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 표준곡선(20-100 $\mu\text{L/mL}$, 회귀식 $y = 0.0014x + 0.0011$, $R^2 = 0.9989$)을 활용하여 측정하였으며, 총 플라보노이드 함량을 mg quercetin(QE)/g으로 나타내었다.

인간 간암 세포주(HepG2 cell) 내 항산화 활성

Cellular antioxidant activity (CAA) 분석은 Liu and Huang (2015)의 실험방법을 응용하여 측정하였다. HepG2 세포를 96 well plate에 5×10^5 cells/mL 농도로 분주하고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 후 HBSS 이용하여 세척하였다. 그 후 시료를 농도별로 조제한 MEM 배지 100 μL 와 25 μM DCFH-DA를 각 well에 1시간 동안 처리하였다. 처리된 세포는 HBSS를 이용하여 세척 후 100 μL AAPH 용액을 첨가하여 1시간 동안 10분 간격으로 emission 538 nm, excitation 485 nm에서 형광 측정하였다.

세포독성

대식세포주 RAW 264.7 세포와 결장직장암세포주 Caco-2 세포에 대한 독성을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^5

cells/well의 농도로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다. 배양된 세포에 농도별로 조절된 시료를 처리하고 24시간 동안 배양한 후 0.5 mg/mL의 MTT 용액으로 4시간 동안 반응시킨 뒤 상등액을 제거하였다. 생성된 formazan은 DMSO 100 µL를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Alley *et al.*, 1988; Boligon *et al.*, 2014). Caco-2 세포를 96 well plate에 2.5×10⁵ cells/well의 농도로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 상기와 동일한 방법으로 측정하였다(Shon *et al.*, 2010; Walia and Chen, 2020).

NO 생성 저해

RAW 264.7 세포를 이용한 NO 생성 저해는 Green *et al.* (1982)의 실험방법을 응용하여 측정하였다. 배양된 RAW 264.7 세포주에 농도별로 조절된 시료를 2시간 동안 전처리하고 NO의 생성 유도를 위하여 LPS를 1 µg/mL 처리한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 배양액에 griess 시약(0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1)을 처리하여 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrate의 표준곡선을 활용하여 NO의 함량을 계산하고 NO 생성 저해를 평가하였다. 인간 결장직장암 세포주인 Caco-2 세포주로부터 생성된 NO의 양은 Romier-Crouzet *et al.* (2009)의 실험방법을 응용하여 측정하였다. Caco-2 세포를 2.5×10⁵ cells/mL의 농도로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 상기와 동일한 방법으로 측정하였다.

염증성 cytokine(TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성

상기와 같은 조건에서 24시간 배양된 RAW 264.7 세포에 농도별로 조절한 시료를 2시간 동안 전처리한 후 LPS를 처리하여 염증을 유발한 배양 상층액을 수거하여 실험에 사용하였다. 염증성 사이토카인은 ELISA kit (ELISA MAX™ Deluxe Set, BioLegend, San Diego, USA)를 이용하여 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성량을 manufacturer's instruction에 따라 측정하였다(Green *et al.*, 1982; Jo *et al.*, 2019; Romier-Crouzet *et al.*, 2009).

항균활성

L. monocytogenes, *S. typhimurium*와 *H. pylori*에 대한 최소성장억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도(Minimum bactericidal concentration, MBC)은

broth microdilution method를 응용하여 측정하였다. *L. monocytogenes*와 *S. typhimurium*에 대한 시료의 항균활성을 측정하기 위하여 농도별로 조절한 시료가 첨가된 LB broth에 negative control과 균주 처리군을 나누어 각각의 균을 균일하게 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 균주의 성장 변화를 토대로 MIC를 측정하였다. 미생물에 대한 시료의 살균작용을 확인하고 항균활성의 역가를 검토하기 위하여 생균수 측정법으로 MBC를 결정하였다. 각 균주는 배양조건에 맞도록 배양한 균주배양액에 시료를 MIC보다 높은 농도인 400 mg/mL까지 첨가하고, LB agar 배지에 도포한 후 24시간 배양시켜 생균수를 측정하여 사멸된 균수가 99.9%가 넘는 최소농도를 MBC으로 결정하였다. *H. pylori*에 대한 항균활성을 측정하기 위해 농도별로 조절된 시료가 첨가된 brucella broth 배지를 균일하게 분주한 후 균주를 0.5×10⁷ CFU/mL씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 균주의 성장 변화 및 사멸 정도를 상기와 같은 방법으로 확인하여 MIC와 MBC 농도를 결정하였다(Jo *et al.*, 2019; Lehrer *et al.*, 1991; Takarada *et al.*, 2004).

소화효소 활성

α-Amylase 효소활성은 Bernfeld (1955)의 실험방법을 변형하여 측정하였다. 1.0% (w/v) soluble starch solution (20 mM sodium phosphate buffer에 6.7 mM sodium chloride, pH 6.9) 250 µL와 시료액 500 µL를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 96 mM dinitrosalicylic acid (DNS) solution을 0.5 µL를 첨가하여 100°C에서 5분 동안 반응시킨 뒤 4°C에서 3분간 냉각한 후 UV-spectrophotometer (Specord 200 Plus, Analytik-jena Co., Konrad, Germany)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 0.2% (w/v) maltose을 이용해 작성하였으며, 효소 활성도(unit definition)는 상기 반응 조건(37°C, pH 6.9)에서 starch로부터 1분 동안에 생성되는 1.0 µg의 maltose 양을 1 unit로 정의하였다. Protease 효소활성은 Kim *et al.* (2011)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.65% (w/v) casein buffer (casein 6.5 g/mL, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5) 1.25 mL와 시료액 0.5 mL 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 110 mM trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응 시료는 37°C에서 30분 동안 정치시킨 뒤 잔류하는 침전물을 0.45 µm syringe filter를 이용하여 여과하였다. 여과액 2 mL에 500 mM sodium carbonate solution 5 mL와 0.5 M Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL을 혼합

한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 UV-spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 L-tyrosine을 상기와 동일한 방법으로 분석하여 작성하였으며, 1 unit는 1분 동안 tyrosine 1 µg을 유리시키는 양을 환산하여 계산하였다.

통계처리

모든 실험의 통계처리는 Sigma plot (sigma plot for window version 10.0, USA) program을 이용하여 각 측정 군의 평균 ± 표준편차를 산출하였으며, t-test를 사용하여 유의성을 p < 0.05 수준에서 검증하였다. 유의적 차이가 있는 경우 one-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test)를 실시하였다.

결 과

항산화 활성

초석잠 추출물을 312.5-10,000 µg/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다(Table 1). DPPH 라디칼 소거능(IC₅₀)은 SAW는 5.26 ± 0.05 mg/mL, SAE는 4.34 ± 0.04 mg/mL로 나타났다. 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid는 0.19 ± 0.00 mg/mL로 분석되었다. DPPH 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 시료의 농도인 IC₅₀값과 positive control로 사용된 L-ascorbic acid의 IC₅₀값을 기준으로 relative activity를 비교한 결과, SAW는 3.61%, SAE는 4.38% 수준의 DPPH 라디칼 소거능이 나타났다. ABTS 라디칼 소거능(IC₅₀)은 SAW는 6.44 ± 0.06 mg/mL, SAE는 5.05 ± 0.06 mg/mL로 나타났다. 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid은 0.10 ± 0.00 mg/mL로 측정되었다. ABTS 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 시료의 농도인 IC₅₀값과 positive control로 사용된 L-ascorbic

acid의 IC₅₀값을 기준으로 relative activity를 비교한 결과, SAW는 1.56%, SAE는 1.98%로 나타났다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

초석잠 각 추출물에 대한 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정하였다(Table 2). 총 폴리페놀 함량은 SAW는 106.25 ± 0.94 mgGAE/g, SAE는 124.61 ± 1.11 mgGAE/g으로 분석되었다. 총 플라보노이드 함량은 SAW는 24.4 ± 0.24 mgQE/g, SAE는 45.2 ± 3.52 mgQE/g으로 분석되었다.

인간 간암 세포주(HepG2 cell) 내 항산화 활성

Cellular antioxidant activity (CAA) assay를 통해 초석잠 추출물의 HepG2 세포 내 항산화 활성을 측정하였다. 초석잠 각 추출물(0-400 µg/mL)과 DCFH-DA probe를 동시에 처리하고 1시간 배양한 후 600 µM의 AAPH를 100 µL 처리하여 ROS 소거 활성을 측정하였다(Table 3). SAW는 AAPH 처리군 대비 100, 200, 300, 400 µg/mL의 농도에서 각각 65.1 ± 1.8, 58.4 ± 0.5,

Table 2. Total polyphenol and flavonoid content of *Stachys sieboldii* extract

Sample	Total polyphenol (mgGAE ^z /g)	Total flavonoid (mgQE ^y /g)
SAW ^x	106.25 ± 0.94	24.4 ± 0.24
SAE ^w	124.61 ± 1.11	45.2 ± 3.52

^zGallic acid equivalent.

^yQuercetin equivalent.

^xSAW: *S. sieboldii* water extract, ^wSAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

Table 1. Measurement of IC₅₀ value for antioxidant activity of *Stachys sieboldii* extract

Sample	DPPH radical		ABTS radical	
	IC ₅₀ ^z (mg/mL)	Relative activity(%) ^y	IC ₅₀ ^z (mg/mL)	Relative activity(%) ^y
SAW ^x	5.26 ± 0.05	3.61	6.44 ± 0.06	1.56
SAE ^w	4.34 ± 0.04	4.38	5.05 ± 0.06	1.98
AA ^v	0.19 ± 0.00	100.00	0.10 ± 0.00	100.00

^zIC₅₀: value in the concentration (mg/mL) of sample required for 50% inhibition.

^yRelative activity: a ratio of IC₅₀ value compared to positive control (ascorbic acid).

^xSAW: *S. sieboldii* water extract, ^wSAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract, ^vAA: L-Ascorbic acid. L-Ascorbic acid was used as a positive control.

All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

Table 3. Cellular antioxidant activity of *Stachys sieboldii* extracted with water and 60% ethanol against oxidative stress induced by AAPH in HepG2 cell model

Sample	DCF fluorescence intensity (%)				
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	0	100	200	300	400
SAW ^z	100.0 \pm 1.8 ^x	65.1 \pm 1.8 ^w	58.4 \pm 0.5 ^v	58.3 \pm 0.8 ^v	53.2 \pm 1.8 ^u
SAE ^y	100.0 \pm 1.8 ^x	67.8 \pm 2.7 ^w	60.5 \pm 2.7 ^v	57.7 \pm 1.8 ^v	54.1 \pm 0.4 ^u

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

Different superscripts (x-u) in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 4. MTT assay on RAW 264.7 cell culture incubated for 24 h with *Stachys sieboldii* extract

Sample	RAW 264.7 Cell viability (%)					
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	25	50	75	100	125	150
SAW ^z	106.8 \pm 0.6 ^x	102.1 \pm 0.9 ^w	106.4 \pm 1.2 ^{xv}	104.8 \pm 0.6 ^v	95.7 \pm 0.2 ^u	97.0 \pm 0.2 ^u
SAE ^y	100.5 \pm 0.3 ^x	101.6 \pm 0.6 ^x	102.2 \pm 3.2 ^x	100.5 \pm 0.4 ^x	99.8 \pm 1.6 ^x	102.1 \pm 0.3 ^x

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

Different superscripts (x-u) in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 5. Nitric oxide (NO) production inhibitory activity (%) on LPS-stimulated RAW 264.7 cell culture incubated for 24 h with *Stachys sieboldii* extract

Sample	Control	LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$) + LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)			
			25	50	75	100
			SAW ^z	1.9 \pm 0.3 ^{***}	100.0 \pm 0.0	66.1 \pm 1.4 ^{***}
SAE ^y	1.9 \pm 0.3 ^{***}	100.0 \pm 0.0	64.2 \pm 1.3 ^{***}	54.3 \pm 2.3 ^{***}	50.2 \pm 0.6 ^{***}	45.1 \pm 1.0 ^{***}

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

Means with different letters above a bar are significantly different at ^{***} $p < 0.001$.

58.3 \pm 0.8, 53.2 \pm 1.8%로 ROS 생성이 감소되었다. SAE는 AAPH 처리군 대비 67.8 \pm 2.7, 60.5 \pm 2.7, 57.7 \pm 1.8, 54.1 \pm 0.4%로 ROS 생성이 감소되었다.

세포독성 및 NO 생성 저해

RAW 264.7 세포를 MTT assay 실험법으로 초석잠 각 추출물에 대한 세포독성을 측정하였다(Table 4). 초석잠 각 추출물을 농도별(25–150 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과 SAW와 SAE는 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 100% 생존율이 측정되었다. 이에 따라 독성이 나타나지 않는 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도로 설정하고,

NO 생성 저해와 염증성 사이토카인의 생성 측정 농도로 설정하였다. LPS를 이용하여 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 초석잠 각 추출물을 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 후 NO 생성 저해를 측정된 결과 각 추출물은 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였다(Table 5). 초석잠 추출물의 처리농도 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 SAW는 66.1 \pm 1.4%, 59.2 \pm 1.2%, 51.1 \pm 2.4%, 44.3 \pm 1.4%, SAE는 64.2 \pm 1.3%, 54.3 \pm 2.3%, 50.2 \pm 0.6%, 45.1 \pm 1.0%로 NO 생성이 저해되었다.

Caco-2 세포를 MTT assay 실험법으로 초석잠 추출물에 대한 세포독성을 측정하였다(Table 6). 초석잠 각 추출물 농도

Table 6. MTT assay on Caco-2 cell culture incubated for 24 h with *Stachys sieboldii* extract

Sample	Caco-2 Cell viability (%)				
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	50	100	150	200	250
SAW ^z	100.5 \pm 0.9 ^x	105.3 \pm 2.0 ^w	101.8 \pm 0.6 ^x	101.8 \pm 0.2 ^x	95.6 \pm 2.4 ^v
SAE ^y	102.7 \pm 1.2 ^x	104.5 \pm 1.4 ^x	103.8 \pm 4.2 ^x	91.8 \pm 1.3 ^w	84.7 \pm 1.5 ^v

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

Different superscripts (x-v) in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 7. Nitric oxide (NO) production inhibitory activity (%) on LPS-stimulated Caco-2 cell culture incubated for 24 h with *Stachys sieboldii* extract

Sample	Control	LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$) + LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)			
			25	50	75	100
SAW ^z	0.9 \pm 0.1 ^{***}	100.0 \pm 0.0	66.1 \pm 1.4 ^{***}	59.2 \pm 1.2 ^{***}	51.1 \pm 2.4 ^{***}	44.3 \pm 1.4 ^{***}
SAE ^y			64.2 \pm 1.3 ^{***}	54.3 \pm 2.3 ^{***}	50.2 \pm 0.6 ^{***}	45.1 \pm 1.0 ^{***}

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

Means with different letters above a bar are significantly different at ^{***} $p < 0.001$.

별(50~250 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과 SAW는 200 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 100% 세포 생존율이 측정되었으며, SAE는 150 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 100% 생존율이 측정되었다. 이에 따라 독성이 나타나지 않는 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도로 설정하고, NO 생성을 측정한 결과 각 추출물은 농도 의존적으로 NO 생성을 저해시켰다(Table 7). 초석잠 추출물의 처리농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 SAW는 44.3 \pm 1.4%, SCE는 45.1 \pm 1.0%로 NO 생성이 저해되었다.

염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성

Cytokine의 생성 억제 효능을 측정하기 위하여 LPS를 이용하여 RAW 264.7 세포에 염증을 유발시키고 초석잠 각 추출물을 처리한 후 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성을 측정하였다(Table 8). TNF- α 생성은 LPS 단독 처리군에서 11.9 \pm 0.3 ng/mL, 비처리 대조군은 2.5 \pm 0.0 ng/mL로 측정되었으며, 초석잠 각 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 SAW는 9.0 \pm 0.7 ng/mL, SAE는 10.1 \pm 0.2 ng/mL로 억제되었다. IL-6 생성은 LPS 단독 처리군에서 24.0 \pm 0.2 ng/mL, 비처리 대조군은 0.4 \pm 0.0 ng/mL로 측정되었으며, 초석잠 각 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 SAW는 14.9 \pm 0.2 ng/mL, SAE는 15.4 \pm 0.9 ng/mL로 억제되었다. IL-1 β 생성은

LPS 단독 처리군에서 75.5 \pm 4.7 pg/mL, 비처리 대조군은 24.9 \pm 3.5 pg/mL로 측정되었으며, 초석잠 각 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 SAW는 39.7 \pm 0.6 pg/mL, SCE는 40.0 \pm 2.2 pg/mL로 억제되었다. 초석잠 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성이 농도 의존적으로 억제되었다.

항균활성

초석잠 추출물이 *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *H. pylori*의 생육을 억제시키는 최소성장억제농도(MIC)는 각 균의 생장이 검출되지 않는 농도로 설정하였고, 최소살균농도(MBC)는 초석잠 각 추출물을 400 mg/mL까지 첨가하고 24시간 배양한 후 사멸된 균수가 99.9% 이상의 최소농도를 측정하였다(Table 9). *L. monocytogenes*의 MIC는 SAW와 SAE 모두에서 100 mg/mL로 측정되었으며, MBC는 SAW는 325 mg/mL, SAE는 275 mg/mL로 측정되었다. *S. typhimurium*의 MIC는 SAW에서 125 mg/mL, SAE는 75 mg/mL로 측정되었으며, MBC는 SAW에서 325 mg/mL, SAE는 225 mg/mL로 측정되었다. *H. pylori*에 대한 활성은 MIC는 SAW에서 125 mg/mL, SAE는 150 mg/mL로 측정되었으며, MBC는 SAW와 SAE에서 400 mg/mL로 측정되었다.

Table 8. Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) production on LPS-stimulated RAW 264.7 cell culture incubated for 24 h with *Stachys sieboldii* extract

	Sample	Control	LPS (1 μ g/mL)	Concentration (μ g/mL) + LPS (1 μ g/mL)			
				25	50	75	100
TNF- α (ng/mL)	SAW ^z	2.5 \pm 0.0 ^{***}	11.9 \pm 0.3	11.0 \pm 1.6	9.6 \pm 0.2 ^{**}	9.4 \pm 0.3 ^{**}	9.0 \pm 0.7 ^{***}
	SAE ^y			11.2 \pm 0.1 ^{***}	10.6 \pm 0.1 ^{***}	10.6 \pm 0.3 ^{***}	10.1 \pm 0.2 ^{***}
IL-6 (ng/mL)	SAW ^z	0.4 \pm 0.0 ^{***}	24.0 \pm 0.2	22.1 \pm 0.3 ^{***}	18.7 \pm 0.8 ^{***}	16.7 \pm 1.2 ^{***}	14.9 \pm 0.2 ^{***}
	SAE ^y			20.3 \pm 0.1 ^{***}	17.0 \pm 0.2 ^{***}	15.8 \pm 0.6 ^{***}	15.4 \pm 0.9 ^{***}
IL-1 β (pg/mL)	SAW ^z	24.9 \pm 3.5 ^{***}	75.5 \pm 4.7	55.4 \pm 3.6 ^{***}	50.4 \pm 1.7 ^{***}	44.9 \pm 2.1 ^{***}	39.7 \pm 0.6 ^{***}
	SAE ^y			62.2 \pm 2.9 ^{***}	48.6 \pm 2.1 ^{***}	47.8 \pm 3.0 ^{***}	40.0 \pm 2.2 ^{***}

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.
 All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.
 Means with different letters above a bar are significantly different at ***p < 0.001, **p < 0.005.

Table 9. MIC and MBC of *Stachys sieboldii* extract against *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* and *H. pylori*

Bacterial	Sample	Concentration (mg/mL)								MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
		25	50	75	100	125	150	175	200		
<i>L. monocytogenes</i>	SAW ^z	+	+	+	-	-	-	-	-	100	325
	SAE ^y	+	+	+	-	-	-	-	-	100	275
<i>S. typhimurium</i>	SAW ^z	+	+	+	+	-	-	-	-	125	325
	SAE ^y	+	+	-	-	-	-	-	-	75	225
<i>H. pylori</i>	SAW ^z	+	+	+	+	-	-	-	-	125	400
	SAE ^y	+	+	+	+	+	-	-	-	150	400

+: Growth, -: Growth inhibition
^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE; *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

Table 10. Evaluation of digestive enzyme activity through α -amylase activity of *Stachys sieboldii* extract

Sample	α -Amylase activity (Unit/mL)				
	Concentration (mg/mL)				
	5	10	15	20	25
SAW ^z	0.3 \pm 0.0 ^{***}	0.6 \pm 0.0 ^{***}	0.7 \pm 0.0 ^{***}	0.9 \pm 0.0 ^{***}	1.2 \pm 0.1 ^{***}
SAE ^y	0.5 \pm 0.0 ^{***}	0.7 \pm 0.0 ^{***}	0.9 \pm 0.0 ^{***}	1.1 \pm 0.0 ^{***}	1.2 \pm 0.0 ^{***}

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.
 All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.
 Means with different letters above a bar are significantly different at ***p < 0.001.

소화효소 활성

초석잠 각 추출물에 대한 소화 효소활성을 측정된 결과 초석잠 각 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 α -amylase 효소활성도 증가하였다(Table 10). SAW는 25 mg/mL 농도에서 1.2 \pm 0.1

unit/mL로 분석되었으며, 저농도인 5 mg/mL (0.3 \pm 0.0 unit/mL)보다 약 4배 높게 측정되었다. SAE는 25 μ g/mL에서 1.2 \pm 0.0 unit/mL로 분석되었으며, 저농도인 5 μ g/mL (1.3 \pm 0.0 unit/mL)보다 약 2.4배 높게 측정되었다. 초석잠 각 추출물의

Table 11. Evaluation of digestive enzyme activity through α -amylase and protease activity of *Stachys sieboldii* extract

Sample	Protease activity (Unit/mL)				
	Concentration (mg/mL)				
	20	40	60	80	100
SAW ^z	0.05 ± 0.00 ^{***}	0.07 ± 0.00 ^{***}	0.09 ± 0.00 ^{***}	0.12 ± 0.00 ^{***}	0.15 ± 0.00 ^{***}
SAE ^y	0.10 ± 0.00 ^{***}	0.17 ± 0.00 ^{***}	0.25 ± 0.00 ^{***}	0.32 ± 0.01 ^{***}	0.40 ± 0.00 ^{***}

^zSAW: *S. sieboldii* water extract, ^ySAE: *S. sieboldii* 60% ethanol extract.

All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

Means with different letters above a bar are significantly different at ^{***} p < 0.001.

침가량이 증가함에 따라 protease 효소활성도 증가하였다(Table 11). SAW는 100 mg/mL에서 0.15 ± 0.00 unit/mL로 분석되었으며, 저농도인 20 mg/mL (0.05 ± 0.00 unit/mL) 보다 약 3배 높게 측정되었다. SAE는 100 mg/mL에서 0.40 ± 0.00 unit/mL로 분석되었으며, 저농도인 20 mg/mL (0.10 ± 0.00 unit/mL) 보다 약 4배 높게 측정되었다.

고 찰

체내의 항산화 불균형은 인체를 노화시키고 성인병 등 각종 질병을 유발시킨다. 라디칼 소거능은 체내의 항산화 시스템을 정상적으로 유지시키는 인자이다. 일반적으로 천연물의 항산화 활성은 대조군과 항산화 활성을 비교하는 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능으로 측정한다(Doh *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2020a). 초석잠 각 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능(IC₅₀)이 SAW는 5.26 ± 0.05 mg/mL, SAE는 4.34 ± 0.04 mg/mL로 측정되었다. Kim *et al.* (2017)의 연구에서 초석잠 잎과 뿌리 분말 80% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능(IC₅₀) 연구에서 잎 추출물은 0.69 mg/mL, 뿌리 추출물은 1.90 mg/mL로 분석되었다고 보고된 연구결과보다는 낮은 활성이 나타났다. 이는 초석잠 추출 용매인 에탄올의 함량 차이에 의한 것으로 판단된다. Kim *et al.* (2012)의 연구에서 키토산과 잣잎, 잣껍질 추출물의 항산화 및 항균활성 연구에서 추출물간 DPPH 라디칼 소거능이 다르게 나타난 것은 총 폴리페놀 화합물 함량과 밀접한 관련이 있다고 보고되었다. 천연자원에 함유된 플라보노이드 물질에는 flavonols, flavones, flavanones, catechins, anthocyanidins 등이 있다. 일반적으로 플라보노이드는 담황색 또는 노란색을 띠고 있으며, 식물의 잎, 뿌리, 꽃 등에 유리상태로 존재하기도 하지만 대부분 rhamnose, glucose, rutiose 등의 당류와 에테르 결합한 배당체로 존재하며, 항산화, 항균, 항

염, 항알리지, 항바이러스, 면역증강, 모세혈관 강화, 순화기 질환 등의 생리활성을 갖고 있다(Doh *et al.*, 2011; Heim *et al.*, 2002; Kawaguchi *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2017). 폴리페놀 화합물은 식물의 외부에서 내부로 침입한 물질을 방어하기 위해 생성된 물질로서 식물 세포를 생장시키고 활성화시키는 물질이다. 폴리페놀 화합물은 phenylalanine과 tyrosine으로부터 합성되는 2차 대사산물로서 hydroxyl기(-OH)가 단백질 등의 거대 분자들과 결합하여 항산화, 항암, 항염증, 항균, 면역증진 등의 생리활성을 갖는다(Kim *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2018). 따라서 천연자원에 함유된 폴리페놀 화합물의 함량은 항산화 활성의 지표라 할 수 있다. 폴리페놀 함량 측정은 폴리페놀의 산화·환원반응을 응용하여 측정하는 것으로 phosphomolybdic acid와 반응하면 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 측정한다(Doh *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017). 초석잠 각 추출물의 총 폴리페놀 함량은 SAW는 106.25 ± 0.94 mg GAE/g, SAE는 124.61 ± 1.11 mgGAE/g으로 분석되었다. Lim *et al.* (2020b)의 연구에서 대두 물 추출물의 총 폴리페놀 함량이 15.68 ± 0.11 mgGAE/g으로 분석되었다고 보고된 연구결과보다 높게 나타났다. 총 플라보노이드 함량은 SAW는 24.4 ± 0.24 mgQE/g, SAE는 45.2 ± 3.52 mgQE/g으로 분석되었다. Kim *et al.* (2017)의 연구에서 초석잠 잎과 뿌리 분말 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 236.35 mg/g과 20.44 mg/g이었으며, 총 플라보노이드 함량은 각각 101.76 mg/g과 11.51 mg/g이었다고 보고된 연구결과보다 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 높게 측정되었다. CAA assay는 DCFH-DA probe를 이용하여 측정하는 fluorometric assay로서 항산화제의 세포막 침투 정도와 세포내 AAPH으로 유도된 peroxy radical 소거 활성 정도를 측정할 수 있다(Liu and Huang, 2015). 항산화 물질을 세포에 처리하면 ROS가 소거되어 RFU 값이 감소하게 된다. 다량의 ROS는 DNA, 단백질, 세포 내 소기관 등을 손상시켜 질

병을 유발한다고 알려져 있으며, 최근 연구에서 항산화 물질을 처리하면 산화제로 유도된 ROS가 소거되어 HepG2 세포 손상을 억제한다고 보고되었다(Yang *et al.*, 2021). CAA assay를 통해 초석잠 추출물의 HepG2 세포 내 항산화 활성 측정에서 농도 의존적으로 ROS 생성을 감소시키는 것으로 측정되었다.

NO는 생합성을 촉진하여 염증을 악화시키는 물질로서 nitric oxide synthase에 의하여 생성되며, 체내 방어, 세포독성, 신경 전달, 혈액응고, 혈압조절, 암세포에 대한 면역, 혈소판 억제, 면역조절, 혈관확장 등의 역할을 하지만 합성되면 염증 반응을 일으킨다. 염증반응에 의하여 NO가 과량 생성되면 염증성 질환을 유발시키고 세포와 조직에 산화적 손상을 일으켜 유전자 변이, 신경 손상, 염증성 질환, 뇌막염, 알츠하이머병, 파킨슨병 등을 유발시킨다(Cho *et al.*, 2017; Doh *et al.*, 2011; Lee and Kim, 2009). 따라서 천연물의 NO 생성 억제는 인체의 염증성 질환을 억제시키는 지표라 할 수 있다(Kwak and Choi, 2015; Sim *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2017). *H. pylori*에 감염되면 면역세포인 대식세포는 염증세포를 발현시켜 NO를 생성하고, 위점막을 손상시킨다(Ahn, 2019; Park and Kim, 2006). LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포와 Caco-2 세포에서 초석잠 각 추출물은 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰다. 사이토카인은 면역세포에서 분비되는 단백질로서 면역세포의 증식, 활성, 분화 조절 등에 의하여 염증을 활성화 시키는 염증 매개인자이다(Chang *et al.*, 2002; Namkoong *et al.*, 2015). 대식세포는 면역반응에 관여하여 숙주의 방어와 항상성 유지, 염증반응에 관여하는 세포로서 외부 자극에 의하여 염증반응이 활성화되면 세포 손상과 부종, 열 등의 반응이 유도되고 염증성 사이토카인을 분비하여 염증반응을 활성화시킨다(Kang *et al.*, 2014; Namkoong *et al.*, 2015). 따라서 사이토카인의 억제는 염증질환을 억제시키는 지표이다(Chung *et al.*, 2001; Mannick *et al.*, 1996). 염증 매개물질이 과량 생성되면 염증반응이 활성화되고 면역반응을 과도하게 일으켜 질병을 유발시키거나 악화시킨다. 인체의 감염이나 조직이 손상되면 IL-6가 생성되어 급성 반응, 조혈 및 면역반응을 일으켜 숙주를 보호한다. 유해인자가 제거되면 IL-6의 발현이 제어되지만, 발현이 조절되지 않으면 만성염증과 자가면역질환을 유발시킨다. TNF- α 는 염증이 발생하면 대식세포에서 생성되며, 림프, 비 림프 세포, 종양 세포의 염증 유발 및 세포독성을 일으키는 사이토카인이다(Kim *et al.*, 2021; Laksmiawati *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2014). LPS를 이용하여 RAW 264.7 세포에 염증을 유발시킨 후, 초석잠 각 추출물에 대한 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성

을 측정된 결과 농도 의존적으로 억제되었다. α -Amylase는 탄수화물의 α -D-(1,4)-glucan 결합을 가수분해하는 효소로서 α -amylase 활성이 저해되면 체내의 전분이 완전히 분해되지 않아 에너지 흡수가 저해된다. Protease는 단백질을 분해하는 효소로서 펩타이드 결합을 가수분해하여 아미노산과 펩타이드 혼합물을 생성하며, 단백질의 분해와 소화 및 세포의 불필요한 단백질을 제거한다(Kang *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2008). 초석잠 각 추출물의 소화 효소활성을 측정된 결과 초석잠 각 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 α -amylase와 protease 효소활성도 증가하였다. 이와같이 초석잠은 항산화, 항염, 항균 및 소화효소 활성이 우수하여 건강식품으로 개발 가능성이 있으며, 본 연구자료는 건강식품 개발시 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

순창군에서 재배한 초석잠을 건강식품을 개발하기 위한 기초자료를 확보하고자 초석잠 물 추출물과 60% 에탄올 추출물에 대한 항산화, 항균, 항염, 소화효소 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능(IC₅₀)은 SAW는 5.26 ± 0.05 mg/mL, SAE는 4.34 ± 0.04 mg/mL로 나타났으며, ABTS 라디칼 소거능(IC₅₀)은 SAW는 6.44 ± 0.06 mg/mL, SAE는 5.05 ± 0.06 mg/mL로 나타났다. 총 폴리페놀 함량은 SAW는 106.25 ± 0.94 mgGAE/g, SAE는 124.61 ± 1.11 mgGAE/g, 총 플라보노이드 함량은 SAW는 24.4 ± 0.24 mgQE/g, SAE는 45.2 ± 3.52 mgQE/g로 분석되었다. CAA assay를 활용한 HepG2 세포내 항산화 활성은 400 μ g/mL의 농도에서 SAW는 53.2 ± 1.8%, SAE는 54.1 ± 0.4%로 감소되었다. SAW의 MIC는 *L. monocytogenes*은 100 mg/mL, *S. typhimurium*과 *H. pylori*은 125 mg/mL로 측정되었으며, MBC는 *L. monocytogenes*과 *S. typhimurium*은 325 mg/mL, *H. pylori*은 400 mg/mL로 측정되었다. RAW 264.7 세포에서 각 추출물 모두 100 μ g/mL 이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았으며, 추출물 100 μ g/mL 농도에서 SAW는 44.3 ± 1.4%, SAE는 45.1 ± 1.0%로 NO 생성을 저하시켰다. 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성을 농도 의존적으로 억제시켰다. Caco-2 세포에서 SAW와 SAE 추출물 모두 독성이 나타나지 않았으며, 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰다. α -Amylase와 protease 효소활성은 초석잠 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 효소의 활성도 증가하였다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahn, J.Y. 2019. Effectiveness of *Helicobacter pylori* eradication before endoscopic resection. Korean J. Helicobacter Up Gastrointestinal Res. 19(4):215-219 (in Korean).
- Alley, M.C., D.A. Scudiero, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker and M.R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res. 48(3):589-601.
- Berg, R., G. Haenen, H. Berg and A. Bas. 1999. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem. 66(4):511-517.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β methods in enzymology. Methods Enzymol. 1:149-158.
- Boligon, A.A., M.M. Machado and M.L. Athaydem. 2014. Technical evaluation of antioxidant activity. Med. Chem. 4(7):1000188.
- Cha, M.H. and Y.K. Kim. 2008. Analysis of consumption values of a seaweed functional food. Korean J. Food Culture 23(4):462-468 (in Korean).
- Chang, J., L.J. Xuan, Y.M. Xu and J.S. Zhang. 2002. Cytotoxic terpenoid and immunosuppressive phenolic glycosides from the root bark of *Dictamnus dasycarpus*. Planta Med. 68(5): 425-429.
- Chiou, W.F., C.J. Chou and C.F. Chen. 2001. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 69(6):625-635.
- Cho, E.J., J.H. Lee, N.Y. Sung and E.H. Byun. 2017. Anti-inflammatory effects of *Ammonia muricata* leaf ethanol extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 46(6):681-687 (in Korean).
- Cho, W., J.W. Nam, H.J. Kang, T. Windono, E.K. Seo and K.T. Lee. 2009. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. Int. Immunopharmacol. 9(9):1049-1057.
- Chung, H.T., H.O. Pae, B.M. Choi, T.R. Billiar and Y.M. Kim. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 282(5):1075-1084.
- Doh, E.S., J.P. Chang, K.J. Kil, M.S. Choi, J.K. Yang, C.W. Yun, S.M. Jeong, Y.H. Jung and G.H. Lee. 2011. Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. Korean J. Plant Res. 24(1):30-39 (in Korean).
- Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok and S.R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 126(1):131-139.
- Guzik, T.J., R. Korbout and T. Adamek-Guzik. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J. Physiol Pharmacol. 54(4):469-487.
- Heim, K.E., A.R. Tagliaferro and D.J. Bobilya. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutritional Biochemistry 13(10):572-584.
- Hwang, J.Y., C.M. Lee and Y.C. Kim. 2015. Anti-wrinkle efficacy of *Stachys riederi* var. *japonica* ethanol extract in human dermal fibroblasts. J. Invest Cosmetol. 11(4):293-302 (in Korean).
- Je, J.Y. 2015. Chitosan-phytochemical conjugates: preparation, antioxidant, and NO inhibition in LPS-stimulated macrophages. J. Chitin Chitosan. 20(4):245-250 (in Korean).
- Jo, S.H., M.E. Kim, J.H. Cho, Y.J. Lee, J.W. Lee, Y.D. Park and J.S. Lee. 2019. Hesperetin inhibits neuroinflammation on microglia by suppressing inflammatory cytokines and MAPK pathways. Arch. Pharm. Res. 42(8):695-703.
- Jun, H.I., Y.A. Kim and Y.S. Kim. 2014. Antioxidant activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. fruits. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43(3):381-388 (in Korean).
- Kang, B.K., K.B.W.R. Kim, M.J. Kim, S.W. Bark, W.M. Pak, B.R. Kim, N.K. Ahn, Y.U. Choi and D.H. Ahn. 2014. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 Cells. Korean J. Food Sci. Technol. 46(6):729-733 (in Korean).
- Kang, J.R., M.J. Kang, J.H. Shin, J.H. Park and D.I. Kim. 2017. Antioxidant and antidiabetic activities of various solvent extracts from *Stachys sieboldii* Miq. Korean J. Food Preserv. 24(5):615-622 (in Korean).
- Kawaguchi, K., T. Mizuno, K. Aida and K. Uchino. 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. Biosci. Biotech. Biochem. 61(1):102-104.
- Kim, C.H., J.S. Park, H.S. Sohn and C.W. Chung. 2002. Determination of isoflavon, total saponin, dietary fiber, soy oligosaccharides and lecthins from commercial soy products based on the one serving size-some bioactive compounds

- from commercialized soy products. Korean J. Food Sci. Technol. 34(1):96-102 (in Korean).
- Kim, C.H., Y.K. Lee, J.W. Jeong, B.S. Hwang, Y.T. Jeong, Y.T. Oh, P.Y. Cho and C.H. Kang. 2021. Anti-inflammatory effects of *Hemistepta lyrata* Bunge in LPS-stimulated RAW 264.7 cells through regulation of MAPK signaling pathway. Korean J. Plant Res. 34(1):23-30 (in Korean).
- Kim, E.J., J.Y. Choi, M.R. Yu, M.Y. Kim, S.H. Lee and B.H. Lee. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants, Korean J. Food Sci. Technol. 44(3):337-342 (in Korean).
- Kim, H.S., B.O. Jung, S.B. Lee and S.J. Chung. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of *Pinus koraiensis* extracts with chitosan. J. Chitin Chitosan. 17(4):221-228 (in Korean).
- Kim, J.H. 2020. Identification and characterization of fibrinolytic compound from *Cornus officinalis* S. et Z. Korean J. Plant Res. 33(4):237-244 (in Korean).
- Kim, J.H., C.H. Jeong, G.N. Choi, J.H. Kwak, S.G. Choi and H.J. Heo. 2009. Antioxidant and neuronal cell protective effects of methanol extract from *Schizandra chinensis* using an *in vitro* system. Korean J. Food Sci. Technol. 41(6):712-716 (in Korean).
- Kim, M.H., J.H. Rho and M.J. Kim. 2011. Stabilizing and optimizing properties of crude protease extracted from Korean figs. Korean J. Food Cookery Sci. 27(3):29-37 (in Korean).
- Kim, Y.K., H.K. Son and J.J. Lee. 2017. Nutritional components and antioxidant activities of various *Stachys sieboldii* Miq parts. Korean J. Community Living Sci. 28(2):203-215 (in Korean).
- Kwak, C.S. and H.I. Choi. 2015. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract and sequential fractions of flowers of *Prunus persica* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 44(10):1439-1449 (in Korean).
- Kwon, B.S., S.K. Park, J.M. Kim, J.Y. Kang, S.H. Park, J.E. Kang, C.J. Lee, S.B. Park, S.K. Yoo, U. Lee and H.J. Heo. 2018. Antioxidant capacity and hepatoprotective effect of ethyl acetate fraction from shoot of *Aralia elata* on alcohol-induced cytotoxicity. Korean J. Food Sci. Technol. 50(2): 216-224 (in Korean).
- Laksmiawati, D.R., A.P. Prasanti, N. Larasinta, G.A. Syauta, R. Hilda, H.U. Ramadaniati, A. Widyastuti, N. Karami, M. Afni, D.D. Rihibiha, W. Widowati and H.S.W. Kusuma. 2016. Anti-inflammatory potential of gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and soursoup (*Amnona muricata* L.) extracts in LPS stimulated-macrophage cell (RAW 264.7). J. Natural Remedies 16(2):73-81.
- Lee, B.B., S.R. Park, C.S. Han, D.Y. Han, E.J. Park, H.R. Park and S.C. Lee. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37(4): 405-409.
- Lee, J.H., S.Y. Im and W.R. Lee. 2020. Protocatechuic acid content and physiological activities of *Chaenomeles sinensis* extracts prepared with different methods. Kor. J. Pharmacogn. 51(3):199-206 (in Korean).
- Lee, J.W. and Y.J. Kang. 2018. Anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* flower extract and associated MAPKs and NF- κ B pathway in RAW 264.7 cells. Korean J. Plant Res. 31(3):202-210 (in Korean).
- Lee, K.I. and S.M. Kim. 2009. Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38(3):267-273 (in Korean).
- Lee, Y.S. 2007. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. Korean J. Food Preserv. 14(1):78-86 (in Korean).
- Lehrer, R.I., M. Rosenman, S.S.S.L. Harwig, R. Jackson and P. Eisenhauer. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. J. Immunological Methods 137(2): 167-173.
- Lim, J.M., J.S. Lee and J.H. Lee. 2020a. Analysis of *Zanthoxylum schinifolium* for use in natural cosmetic material development. J. Invest Cosmetol. 16(3):183-196 (in Korean).
- _____. 2020b. Evaluation of physiological activity of soybean extract for cosmetic material development. J. Invest Cosmetol. 16(1):11-22 (in Korean).
- Liu, S. and H. Huang. 2015. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity (CAA) assay. J. Functional Foods 18:1095-1105.
- Mannick, E.E., L.E. Bravo, G. Zarama, J.L. Realpe, X.J. Zhang, B. Ruiz, E.T.H. Fonham, R. Mera, M.J.S. Millerand and P. Correa. 1996. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. Cancer Res. 56(14):3238-3243.
- Min, J.Y. and Y.K. Park. 2009. Effect of Dipsaci Radix water extract on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 mouse macrophages. Kor J. Herb. 24(4):189-195 (in

- Korean).
- Namkoong, S.S., A. Jang, E.H. Sohn, J.P. Bak, E.S. Sohn, H.J. Koo, W.J. Yoon, J.E. Kwon, Y.J. Jeong, X. Meng, H.S. Han and S.C. Kang. 2015. Comparative study of *Lisea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. Korean J. Plant Res. 28(2):145-152 (in Korean).
- Park, J.C., H.S. Han, S.B. Lee and K.T. Lee. 2016. Inhibitory effects of kaempferol-7-O- β -D-glucoside on LPS-induced NO, PGE2 and inflammatory cytokines production in RAW 264.7 macrophages. Kor. J. Pharmacogn. 47(4):295-300 (in Korean).
- Park, J.S., T.Y. Shin, D.K. Kim and J.H. Lee. 2011. The effects of Dictamnini radices cortex on the iNOS expression and proinflammatory cytokines production. Kor. J. Pharmacogn. 42(4):348-353 (in Korean).
- Park, Y.S. and Y.H. Kim. 2006. The effect of medicinal herb extract on antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant Activity. J. East Asiam Soc Diet Life. 16(2): 199-206 (in Korean).
- Radi, R.B., J.S. Beckman, K.M. Bush and B.A. Freeman. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J. Biology Chemistry 266(7): 4244-4250.
- Romier-Crouzet, B., J. Van De Walle, A. During, A. Joly, C. Rousseau, O. Henry, Y. Larondelle and Y.J. Schneider. 2009. Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. Food Chem. Toxicol. 47(6):1221-1230.
- Ryu, B.H., B.G. Park and S.K. Song. 2002. Antitumor effects of the hexane extracts of *Sieboldii Miq.* Korean J. Biotechnol. Bioeng. 17(6):520-524 (in Korean).
- Salagami, H., M. Kobayashi, C.H. Chien, H. Kanegae and M. Kavase. 2007. Selective toxicity and type of cell death induced by various natural and synthetic compounds in oral squamous cell carcinoma. *In Vivo* 21(2):311-320.
- Seo, K.H., J.Y. Park, H.J. Noh, J.Y. Lee, E.Y. Lee, J.G. Han, J.H. Kim and M.S. Cheong. 2018. Anti-inflammatory effects of various mushrooms in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Korean J. Plant Res. 31(5):478-488 (in Korean).
- Shon, D.H., M.H. Kim, Y.C. Kim and S.S. Kim. 2010. Effect of korean red ginseng on the stability of the tight junction of intestinal epithelial cells. Korean J. Food Sci. Technol. 42 (3):335-342 (in Korean).
- Sim, M.O., H.J. Lee, J.H. Jang, H.E. Lee, H.K. Jung, T.M. Kim, J.H. No, J. Jung, D.E. Jung and H.W. Cho. 2017. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai in RAW 264.7 cells. Korean J. Plant Res. 30(4):335-342 (in Korean).
- Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16:144-158.
- Soory, M. 2009. Relevance of nutritional antioxidant in metabolic syndrome, ageing and cancer: potential for therapeutic targeting. Infect Disord Drug. Targets 9(4):400-414.
- Takarada, K., R. Kimizuka, N. Takahashi, K. Honma, K. Okuda and T. Kato. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol. Immunol. 19(1):61-65.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 6(10):016295.
- Walia, N. and L. Chen. 2020. Pea protein based vitamin D nanoemulsions: fabrication, stability and *in vitro* study using Caco-2 cells. Food Chem. 305:125475.
- Wang, K.J., Y.J. Zhang and C.R. Yang. 2005. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*. J. Ethnopharmacology 96(3):483-490.
- Yang, H.S., M.J. Kim, M. Kim, P.R. Im and J.S. Choe. 2021. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of extracts from different parts of *Papaver rhoeas* L.. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 50(1):1-9 (in Korean).
- Yi, M.R., C.H. Kang and H.J. Bu. 2017. Anti-inflammatory and tyrosinase inhibition effects of amaranth (*Amaranthus* spp L.) seed extract. Korean J. Plant Res. 30(2):144-151 (in Korean).

(Received 16 July 2021 ; Revised 10 August 2021 ; Accepted 17 August 2021)