

복분자 종자 추출물의 항산화 및 항염증 효과

황진우 · 강현 · 이성규

Antioxidant and anti-inflammatory effects of seed ethanol extracts of *Rubus coreanus* miquel

Jin-Woo Hwang · Hyun Kang · Sung-Gyu Lee

Received: 27 June 2022 / Revised: 28 June 2022 / Accepted: 28 June 2022

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study investigated the antioxidant and anti-inflammatory effects of seed ethanol extracts from *Rubus coreanus* Miquel (SERC). To investigate the antioxidant activity, total polyphenol and flavonoid content, ABTS and DPPH radical scavenging activity, and reducing power were measured. The total polyphenol and flavonoid contents in seed ethanol extracts of *R. coreanus* Miq. were 4.09 µg gallic acid equivalents (GAE)/mg and 16.25 µg quercetin equivalents (QE)/mg, respectively. DPPH and ABTS radical scavenging activity showed concentration-dependent scavenging activity, and the RC₅₀ values of SERC were 26.68 µg/mL and 39.30 µg/mL, respectively. Moreover, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed to assess the reducing power, and SERC showed 0.61 ± 0.01 mM FeSO₄ E/mg. To measure the anti-inflammatory effect, the cytotoxicity and nitric oxide (NO) production inhibitory efficacy in RAW 264.7 cells was confirmed. SERC showed a NO production inhibitory effect at 500 µg/mL without cytotoxicity. As a result of verifying the antioxidant and anti-inflammatory activity using SERC, its potential as an antioxidant and anti-inflammatory material was confirmed.

Keywords Seed of *Rubus coreanus* Miq., Ethanol extracts, Antioxidant, Anti-inflammatory, Cytotoxicity

서론

염증과 산화스트레스는 건강 및 질환에 영향을 미치는 요인으로 여러 질병이 발병하는데 관여하는 것으로 잘 알려져 있다(Lee et al. 2013a). 산화스트레스는 생체 내 에너지 생성을 위한 정상적인 대사과정에서 발생하는 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이 항산화 시스템에 의해 제거되지 못하거나 지나치게 많이 생성되면 유발되게 된다(Hwangbo et al. 2021). ROS는 superoxide radical anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등의 종류가 있으며, hydroxyl radicals이 자유 라디칼 중 가장 강한 손상을 일으킨다(Kang and Lee 2021). 산화적 스트레스의 지속적인 자극은 핵산, 지질, 단백질 및 세포막 등 세포 구조물의 손상을 일으킴으로써 조직에 비가역적인 변화를 야기하여 암, 당뇨, 고혈압 같은 만성질환과 주름, 기미, 검버섯 등의 피부질환 및 노화를 일으키거나 촉진시키는 원인 중 하나로 알려져 있다(Hwangbo et al. 2021; Jang et al. 2021).

염증은 화학, 물리적 손상 및 세균 감염 같은 다양한 외부 자극에 대한 자기 보호를 위한 신체면역방어기전으로, 외부 자극을 인지한 면역세포에서 염증반응이 일어나는 동안 interleukin (IL)-6, IL-1 β 같은 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)과 일산화질소(NO), 유도성 질소산화물 합성효소(iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 등과 같은 염증성 매개인자(pro-inflammatory mediator) 등이 생성된다(Hwangbo et al. 2021; Kim et al. 2021a). 그러나 방어기전에 의한 염증반응이 아닌 그람음성 세균(Gram negative bacteria)의 외막에 존재하는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)에 과도 노출과 같은 병리적인 원인에 의한 과도하고 지속적인 염증반응은 생체 조직 손상이나 유전자 변이 등의 여러 질병의 발병과 진행을 촉진하는 원인으로 작용한다(Hwangbo et al. 2021; Kim et al. 2021a).

J.-W. Hwang, H. Kang, S.-G. Lee (✉)
단국대학교 보건복지대학 임상병리학과
(Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University, Cheonan-si, Chungnam, 31116, Republic of Korea)
e-mail: sung-gyu@dankook.ac.kr

식물에는 항산화 및 항염증 활성을 지닌 물질을 많이 함유하고 있고, 이로부터 약리학적 효능을 지닌 소재를 탐색하여 안전한 기능성 항산화, 항염증 소재에 관한 연구가 진행되고 있다(Hwangbo et al. 2021; Jang et al. 2021).

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽관목으로 한국, 일본, 중국 등 아시아에 자생하고 있으며(Yu et al. 2019), 우리나라에는 중부 이남 지역의 산기슭 양지에 자생하는 식물로, 2~3 m 정도로 자라며, 갈고리 모양의 가시와 줄기가 흰 분으로 덮인 것을 특징으로 한다. 복분자는 5~6월에 꽃이 피고 7~8월에 열매가 성숙되는데 이 과정에서 열매가 붉게 익다가 완숙되면 흑색 빛을 띤다. 이때 미성숙된 열매를 건조한 것을 복분자라고 하며(Jeon et al. 2015; Kim and Shin 2011; Kim et al. 2011), 동의보감에 따르면 한방에서 청량, 보제(補劑), 지갈(止渴), 강장약 등의 약재로 쓰인다. 복분자는 페놀성분, 안토시아닌, 탄닌, 트리테펜 배당체 등의 생리활성 물질을 함유하고 있으며(Choi et al. 2012), 성숙 단계별(Cha et al. 2007), 추출 방법에 따라 생리활성 성분의 함량 변화가 발생한다(Cho et al. 2005). 복분자의 생리활성에 관한 최근 연구는 항산화(Lee and Do 2000; Yoon et al. 2003), 항염증 활성(Yang et al. 2007), 항균 활성(Yu et al. 2019) 항암 및 항스트레스(Kim et al. 2006), 항노화 및 주름개선(Kim et al. 2008), 면역 활성 증진(Kim et al. 2005), 콜레스테롤 개선 효과(Lee et al. 2014; Lee et al. 2013b) 등에 관한 연구가 이루어져 있다.

본 연구에서는 항산화, 항염증 효능이 잘 알려진 복분자의 종자를 사용하여 에탄올 추출물을 제조하고 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량을 검정하고 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 FRAP 활성 측정을 통한 항산화력을 검정하고, NO 생성 억제 활성을 측정하여 항염증 활성을 검정하여 기능성 항산화, 항염증 소재로서의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

Aluminium nitrate, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Folin 시약, Na₂CO₃, gallic acid, potassium acetate, quercetin, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), potassium persulfate, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Iron(II) sulfate heptahydrate (FeSO₄), sodium nitrate, sulfanilamide, naphthylethylenediamine, phosphoric acid, LPS, Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazol-ium Bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 사용된 시약으로 fetal bovine serum (FBS), penicillin과 Dulbecco's modified Eagle's minimum (DMEM) 배지는 Gibco

BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

복분자 종자 추출물의 제조

본 연구는 전북 고창에서 복분자 종자를 구매하여 추출물 제조 시료로 사용하였다. dry oven에서 건조한 복분자 종자를 분쇄기를 이용하여 분말화 한 후, 분말화된 복분자 종자 100 g에 시료 : 70%의 에탄올 = 1:10이 되게 에탄올을 첨가하여 실온에서 24시간 추출하는 과정을 3회 반복하였다. 추출액은 Whatman No. 3 filter paper (Whatman Ltd, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 여과한 후 50°C에서 감압농축기(Rotavapor R-100, Buchi, Flawil, Switzerland)를 사용하여 감압 농축을 진행하였다. 농축된 추출물은 동결건조기(Freeze drying, Vision, Daejeon, Korea)에서 동결 건조한 후 분말화하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 연구에 사용하였다.

복분자 종자 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

복분자 종자 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis (Folin and Denis 1912)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별로 희석된 복분자 종자 추출물 용액을 50%로 희석된 Folin 시약과 1:1로 혼합 후 혼합액을 3분간 반응시킨다. 혼합액에 10% Na₂CO₃를 같은 양으로 추가하고 반응이 잘 이루어지도록 1시간 동안 반응시킨 후 Microplate Spectrophotometer (xMARK, BIO-RAD Co., California, USA) 장비를 사용하여 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 농도별 gallic acid 같은 방법으로 측정하여 표준곡선을 작성하여 복분자 종자 추출물의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

추출물의 총 플라보노이드 함량은 Nieva et al. (2000)의 방법을 변경하여 측정하였다. 농도별로 희석한 복분자 종자 추출물 20 µL와 80% 에탄올 172 µL을 혼합한 혼합액에 10% aluminium nitrate 4 µL 와 1 M potassium acetate 4 µL을 각각 추가하여 40분간 실온에서 반응시킨 후 415 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 quercetin을 사용한 표준곡선을 작성하여 복분자 종자 추출물의 총 플라보노이드 함량의 함량을 구하였다.

복분자 종자 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 측정

복분자 종자 추출물의 자유 라디칼 소거 활성은 Blois (1958)의 방법을 변경하여 측정하였다. 메탄올을 사용하여 농도별로 희석한 추출물 160 µL를 초기값 흡광도를 알기위해 517 nm에서 측정 후 메탄올에 용해한 0.15 mM DPPH 용액 40 µL를 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 517 nm에서 반응 후 흡광도를 측정하였다. 다음 식은 DPPH 라디칼 소거 활성을 계산한 식으로, 대조군으로 메탄올을 사용하였다.

DPPH의 radical scavenging activity (%) = $[100 - (S/C \times 100)]$
 S: 추출물 반응 후 흡광도 - 추출물 반응 전 흡광도
 C: 대조군 반응 후 흡광도 - 대조군 반응 전 흡광도

복분자 종자 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS⁺ cation decolorization assay 방법을 응용하여 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성 측정을 수행하였다(Re et al. 1999). ABTS 라디칼 용액은 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 제조하여 같은 양을 혼합하여 24시간 동안 실온 인 암실에서 반응시켜 ABTS⁺을 생성시킨 후 732 nm에서 흡광도 수치가 0.70 (± 0.02)이 되게 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)로 제조하였다. 제조된 ABTS 라디칼 용액 180 μL에 농도별 추출물 20 μL를 가하여 1분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

복분자 종자 추출물의 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

복분자 종자 추출물의 FRAP법을 사용한 환원력 평가는 Benzie와 Strain의 방법(1996)을 응용하여 측정하였다. FRAP 시약은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 제조하였다. 추출물 10 μL와 200 μL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 농도별 FeSO₄를 표준물질로 표준곡선을 작성하고 mM FeSO₄ equivalent/mg extract로 표시하였다.

세포주 배양

본 연구에는 RAW 264.7 세포주를 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% FBS, 100 units/mL penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37°C 배양기에서 1~2일에 한 번씩 배양해주었다.

세포 생존율 측정

배양 세포주인 RAW 264.7 세포의 농도별 복분자 종자 추출물에 대한 세포의 생존율을 확인하기 위하여 MTT 시약을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 5X10⁴ cells/well의 세포를 100 μL씩 분주하여 24시간 동안 배양기에서 배양 후, 무혈청 배지로 교환한 후 추출물을 각 농도에 따라 처리한 후 24시간 뒤에 MTT 농도가 0.2 mg/mL이 되도록 첨가한 후 3시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 그 후 상등액을 제거하고 DMSO를 100 μL씩 분주하여 formazone된 세포를 용해시킨 후 Microplate Spectrophotometer를 사용하여 550

nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

NO 생성 저해 효과 측정

복분자 종자 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위해 Griess reagent를 이용한 NO 생성량 측정법을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 5 × 10⁴ cells/well 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후, 추출물과 LPS (100 ng/mL)가 용해되어 있는 무혈청 배지를 처리한 후 24시간 배양하였다. 96 well plate에 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 μL를 각각 추가한 후 실온에서 15분간 반응시킨 후 Microplate Spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은 sodium nitrate를 이용하여 표준곡선을 작성하여 NO의 함량을 계산하였다.

통계학적 분석

대조군과 추출물 처리군의 결과에 대한 통계처리는 Student's t-test로 비교하였으며, 통계처리 후 P값이 0.05 미만일 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

총 폴리페놀 화합물과 총 플라보노이드 함량

복분자 종자 추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. 복분자 종자 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정 결과는 4.09 μg GAE/mg 이었으며, 복분자 종자 추출물의 총 플라보노이드 함량은 16.25 μg QE/mg을 보여주었다.

라디칼 소거 활성

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 통하여 복분자 종자 추

Table 1 Contents of total polyphenols and flavonoids of seed ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq.

Total polyphenols (μg GAE ¹ /mg)	Total flavonoids (μg QE ² /mg)
4.090.22	16.251.21

¹Total phenolic content is expressed as μg/mg gallic acid equivalent.

²Total flavonoid content is expressed as μg/mg quercetin equivalent.

³Each value is expressed as mean±S.D.(n=3)

Table 2 DPPH and ABTS radical scavenging activities of seed ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq.

Sample		Radical scavenging activity (%)	
Name	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH radical	ABTS radical
Rubus coreanus Miq. seed.	5	6.80 \pm 1.54	-
	7.5	10.36 \pm 1.54	5.87 \pm 3.02
	10	18.05 \pm 0.51	6.35 \pm 7.54
	25	52.07 \pm 3.20	34.60 \pm 1.48
	50	93.49 \pm 6.42	64.34 \pm 8.41
	RC50	26.68 \pm 1.34	39.30 \pm 4.22
	Ascorbic acid	0.25	1.18 \pm 8.25
0.5		10.06 \pm 6.72	-
0.75		18.93 \pm 6.23	-
1		35.50 \pm 8.93	7.69 \pm 0.52
2.5		94.08 \pm 1.36	14.68 \pm 1.30
5		-	56.70 \pm 1.57
7.5		-	89.64 \pm 0.27
10		-	93.17 \pm 0.08
RC50		1.42 \pm 0.12	4.98 \pm 0.05

¹Each value is expressed as mean \pm S.D.(n=3)

Table 3 Reducing power of seed ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq.

FRAP value (mM FeSO ₄ E ¹ /mg)
0.610.01

¹FRAP value is expressed as mM/mg FeSO₄ equivalent.

²Each value is expressed as mean \pm S.D.(n=3)

출물의 항산화 활성을 확인하였다. 추출물의 농도별 ABTS, DPPH 라디칼 저해능을 백분율로 나타낸 결과를 Table 2에 나타내었다. 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 농도의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 50% 억제 농도인 RC₅₀ 값은 26.68 \pm 1.34 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 복분자 종자 추출물의 ABTS 라디칼 소거능도 농도 의존적인 ABTS 라디칼 소거 활성을 보여주었고 39.30 \pm 4.22 $\mu\text{g/mL}$ 의 RC₅₀값을 보여주었다.

FRAP에 의한 환원력 측정

항산화력을 평가하는 방법 중 하나인 FRAP법을 사용하여 복분자 종자 에탄올 추출물의 환원력을 평가한 결과 0.61 \pm 0.01 mM FeSO₄ E/mg의 값을 나타내었다(Table 3).

세포생존율

복분자 종자 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에서의 세포생존율 측정을 수행하였다(Fig. 1).

MTT assay를 활용하여 RAW 264.7 세포에서 생존율을 확인한 결과, 10~500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 85% 이상의 세포 생존율을 보여 주어 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다.

복분자 종자 추출물의 NO 생성 억제 활성 측정

복분자 종자 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위하여 염증 반응 유발 물질인 NO의 생성량을 NO assay를 진행하여 확인하였다(Fig. 2). NO assay를 수행하여 복분자 종자 추출물의 항염증 활성을 확인한 결과, LPS 처리군에서 22.21 nM까지 증가한 NO 생성량이 복분자 종자 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 군에서 13.16 nM로 약 40% 감소하였다.

고 찰

복분자 종자와 같은 식물성 천연소재 중에 존재하는 폴리페놀 화합물은 2차 대사산물로 다양한 구조와 분자량을 가지며, hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물의 특징으로 인해 단백질과 같은 큰 분자들과 결합하는 성질이 있고 항산화 활성 외에 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kang and Lee 2021; Lee and Kim 2020). 특히, 플라보노이드는 폴리페놀의 한 그룹으로서 노란색 또는 담황색을 나타내는 색소 화합물로 식물과 채소류 등에 함유되어 있으며, 항염증, 항산화 및 항알레르기 등 다양한 생화학적, 약리학적 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다(Hertog et al. 1993; Kim et al. 2014). 플라보노이드는 flavanones, flavonols, flavones,

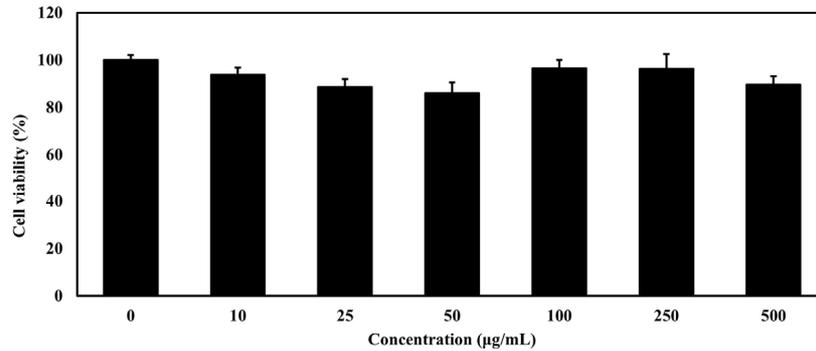


Fig. 1 Effect of seed ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. on cell viability in RAW 264.7 cells. Data are expressed as the mean±SD (n=3) of three replicates

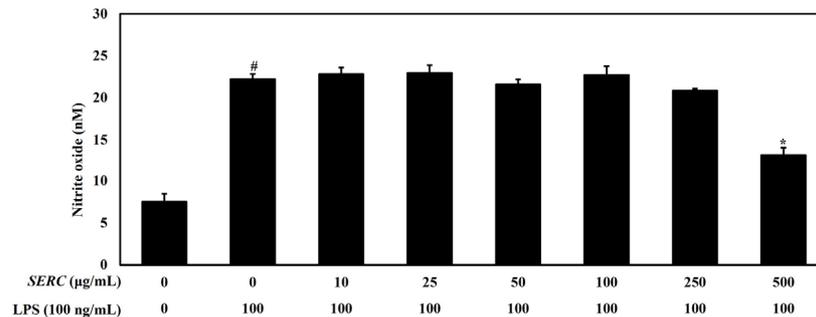


Fig. 2 Effect of seed ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. on NO production in RAW 264.7 cells stimulated by LPS. Data are expressed as the mean±SD (n=3) of three replicates. [#]p<0.05 compared to LPS-untreated group; ^{*}p<0.05 compared to LPS-treated group

flavanol 및 isoflavones로 구성되어 있으며(Hertog et al. 1992), 구조에 의해서 분류되고 특정 플라보노이드는 독성을 거의 나타내지 않으며, 항산화, 항염, 항고혈압, 항균 및 항노화 등의 다양한 생리적 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다(Choi and Ohk 2017; Rice-Evans et al. 1995). Kim et al. (2021b)의 연구 결과를 보면 14종의 국화과 식물의 종자 추출물보다 복분자 종자 추출물이 높은 플라보노이드 함량을 보여주었으며, 해국, 산수유, 코스모스 종자 추출물보다 복분자 종자 추출물이 높은 폴리페놀 함량을 보여주었다.

DPPH 라디칼은 상대적으로 안정한 라디칼로, 정색성을 상실하는 특성을 이용하여 항산화력의 정도를 검증할 수 있고(Lee and Cho 2016), ABTS를 이용한 항산화력 측정은 potassium persulfate 반응으로 생성된 ABTS 라디칼이 시료 내의 항산화 물질과의 반응으로 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 희석되는 것을 사용한 방법이다(Hwang et al. 2021). DPPH와 ABTS 시약은 합성 라디칼이지만, 물과 유기용매에 용해성이 높아서 극성 및 비극성 시료의 항산화 활성을 측정하는데 사용이 가능하다(Awika et al. 2003). 본 연구에서 복분자 종자 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성은 각각 26.68 ± 1.34 , 39.30 ± 4.22 µg/mL의 RC₅₀값으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 높은 것으로 나타났으며, 동일한 농도에서도 DPPH 라디칼 소거능이 ABTS 라디칼 소거능보다 높은 소거능을 보여주었다. 같은 농도에서 ABTS 라디칼 소거

능보다 DPPH 라디칼 소거능에서 높은 라디칼 소거활성을 나타내는 것은 기질이 결합하는 정도가 다르고, 라디칼을 소거하는 기작에서 차이점이 존재하여 같은 농도에서도 활성에서 차이가 나타나는 것으로 판단된다(Kwon and Youn 2014). Kim et al. (2021b)의 14종 국화과 식물 종자 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 결과를 보면 50% DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내는 IC₅₀값이 57.4-208.3 µg/mL로 복분자 종자 추출물의 26.68 µg/mL보다 소거 활성이 낮은 것을 확인할 수 있고, ABTS 라디칼 소거 활성은 비교해보면 국화과 식물 종자 추출물의 IC₅₀값이 26.2-94.7 µg/mL로 복분자 종자 추출물의 IC₅₀값인 39.3 µg/mL보다 유사하거나 낮은 소거 활성을 보여주는 것을 확인할 수 있다.

항산화력을 평가하는 다른 방법 중 FRAP법은 시료가 3가 철을 2가철로 환원시키는 과정에서 2가철의 청색에 대한 흡광도 수치를 측정하여 항산화력을 측정하는 방법이다. 항산화력 측정 방법 중 환원 원리를 사용한 실험법은 항산화제가 수소 원자를 제공함으로써 라디칼의 연쇄 반응을 억제시키는 것을 활용한 항산화 활성을 측정하는 방법으로 라디칼의 소거활성을 측정하는 DPPH, ABTS법과는 다른 기전의 항산화 활성을 측정 방법이다(Duh et al. 1999; Ku et al. 2009). 복분자 종자 추출물은 환원력을 측정하는 FRAP assay에서도 항산화력을 보여주어 기능성 항산화 소재로서의 가능성을 보여주었다.

NOS에 의하여 L-arginine으로부터 생성되고 높은 반응성을 가진 생체 분자인 염증 매개 인자인 NO의 과도한 생성은 염증을 유발하며, 산소와 결합으로 peroxynitrite (ONOO-)를 생성하여 세포와 조직에 산화적 손상을 일으키고 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하기 때문에 인체에 필요한 수준의 NO 농도를 유지하는 것은 매우 중요하다(Bogdan 2015; Moncada and Higgs 1993). 본 연구에서 복분자 종자 추출물 500 µg/mL 처리한 군에서 유의적으로 40% 이상의 NO 생성 억제 효능을 확인할 수 있었고 세포 독성 실험에서 동일한 농도에서 세포 독성이 없음을 확인하여 복분자 종자 추출물이 항염증 소재로서의 가능성을 보여주었다.

적 요

본 연구는 복분자 종자 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성 검증하였다. 항산화 활성을 알아보기 위하여 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능과 환원력을 측정하였다. 복분자 종자 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 4.09 µg GAE/mg와 16.25 µg QE/mg이었다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 농도 의존적 소거능을 보였고, 복분자 종자 에탄올 추출물의 RC50 값은 각각 26.68, 39.30 µg/mL이었다. 게다가 환원력을 평가하기 위해 수행된 FRAP 분석에서 복분자 종자 추출물은 0.61 ± 0.01 mM FeSO₄ E/mg의 효능을 보여주었다. 항염증 효과를 측정하기 위해 RAW 264.7 세포에서 세포독성과 산화질소(NO) 생성 억제 효능을 확인하였다. 확인 결과 500 µg/mL의 복분자 종자 추출물에서 세포 독성 없이 산화질소 생성 억제 효능을 확인할 수 있었다. 복분자 종자 추출물을 사용한 항산화 및 항염증 활성을 확인한 결과 항산화 및 항염증 물질로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

사 사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2021R1F1A1063617).

References

Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:6657-6666

Benzie IF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76

Blois MS (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200

Bogdan C (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in immunology*. 36:161-178

Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR, Kim BS (2007). Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel during maturation. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 36:683-688

Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KH (2005). Comparison of physiological activities between hotwater and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanum* F.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 34:790-796

Choi JH, Ohk SH (2017). Evaluations on Antioxidant Effect of Water Extract from Graviola Leaves. *J Korea Academia-Industrial cooperation Society*. 18(6):129-135

Choi MR, Lee MY, Kim JE, Hong JE, Jang KH, Lee JY, Chun JW, Kim TH, Shin HK, Ki EJ (2012). *Rubus coreanus* Miquel Improves on Impairment of Memory in Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41(9):1253-1258

Duh PD, Du PC, Yen GC (1999). Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*. 37(11):1055-1061

Folin O, Denis W (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 12(2):239-243

Hertog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:1242-1246

Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:1591-1599

Hwang JW, Choi JH, Kang SM, Lee SG, Kang H (2021). Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Hot Water and Ethanol Extracts from Endemic Plants in Indonesia. *Biomedical Science Letters*. 27:161-169

Hwangbo H, Jeung JS, Kim MY, Ji SY, Yoon SH, Kim TH, Kim SO, Choi YH (2021). A Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Effects Based on Analysis of Functional Components of *Cornus officinalis* Siebold & Zucc. *Journal of Life Science*. 31(3):287-297

Jang MJ, Seo SJ, Lee YS (2021). Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-aging Activities of *Elaeagnus multiflora* Fruit Extracts as a Cosmetic Material. *Journal of Investigative Cosmetology*. 17(2):159-167

Jeon HL, Kwak SM, Oh SJ, Nam HS, Han DW, Song YS, Song JW, Choi KC (2015). Blood Flow Improvement Effect of Bokbunja (*Rubus coreanus*) Seed Oil in High-Fat Diet-Fed Mouse Model. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 44(8):1105-1113

Kang H, Lee SG (2021). Antioxidant Capacity of Ethanol Extracts and Fractions from *Rubus coreanus* Miq.. *Journal of Plant*

- Biotechnology. 48:264-270
- Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee HY (2005). Enhancement of immune activities of *Ephedrae* Herba and *Rubi* Fructus at low temperature extraction. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 13:81-86
- Kim HM, Kim HJ, Kong CS, Lee BH, Sim HB, Seo YG (2021a). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of the Halophyte *Cyrtomium falcatum*. Ocean and Polar Research. 43(3): 113-126
- Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ (2008). Supercritical extraction of Oriental herb: Anti-aging and anti-wrinkle effects. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 23:529-534
- Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY (2006). Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 14:206-211
- Kim JH, Lee DH, Lee MH, Jung YH, Park CH, Lee HH, Na CS (2021b). Antioxidant Activity of Asteraceae Plant Seed Extracts. Journal of Life Science. 31(6):543-549
- Kim JM, Shin M (2011). Characteristic of *Rubus coreanus* Miq. fruits at different ripening stages. Korean Journal of Food Science and Technology. 43:341-347
- Kim JY, Cho JY, Moon JK, Choi GC, Lee KD, Ham KS, Kim SJ (2014). Change of phenylpropanoic acid and flavonol contents at different growth stage of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). Food Science and Biotechnology. 23:685-691
- Kim SJ, Kim JY, Baek SH (2011). Effect of composts fermented with Korean medicinal herb wastes on physiological activity of *Rubus coreanus* Miquel (Bokbunja). Korean Journal of Plant Resources. 24:243-252
- Ku KM, Kim SK, Kang YH (2009). Antioxidant Activity and Functional Components of Corn Silk (*Zea mays* L.). Korean Journal of Plant Resources. 22(4):323-329
- Kwon YR, Youn KS (2014). Antioxidant activity and physiological properties of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves extracts with different solvents. Korean Journal of Food Preservation. 21(6):831-837
- Lee GW, Cho YH (2016). Antioxidant Activity of Leaf Extract from *Annona muricata*. Review of Korea Contents Association. 14(3):43-46
- Lee JE, Kim AJ (2020). Antioxidant Activity, Whitening and Anti-wrinkle Effects of Leaf and Seed Extracts of *Brassica juncea* L. Czern. Asian Journal of Beauty and Cosmetology. 18(3):283-295
- Lee JW, Do JH (2000). Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanus* and antioxidative activity. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 29:943-947
- Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Park JH, Lee JH, Lee TB (2014). Cholesterol improvement effects of co-treatment with black raspberry and red ginseng extracts in mice fed a high cholesterol diet. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 43:1491-1499
- Lee SE, Choi J, Lee JH, Noh HJ, Kim GS, Kim J, Chung HY, Kim SY (2013a). Screening of useful plants with anti-inflammatory and antioxidant activity. Korean Journal of Plant Resources. 26:441-449
- Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Choi HR, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Jung HK, Park JH, Lee TB (2013b). Effect of extracts of unripe black raspberry and red ginseng on cholesterol synthesis. Korean Journal of Food Science and Technology. 45:628-635
- Moncada, S. and Higgs, A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. The New England Journal of Medicine. 329: 2002-2012.
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology. 71(1-2):109-114
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 26(9-10):1231-1237
- Yang HM, Lim YS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Kim JK (2007). Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. Korean Journal of Food Science and Technology. 39:342-347
- Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH (2003). Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. Korean Journal of Food Science and Technology. 35:499-502
- Yu JS, Yu NJ, Gim SW, Lee SJ, Kwon GT, Yuk HG (2019). Antimicrobial effect of black raspberry (*Rubus occidentalis*, Bokbunja) extract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Korean Journal of Food Preservation. 26(3):360-364