



이학석사 학위논문

갈근의 항염증 및 항산화 활성성분



식품생명과학과

진성은

이학석사 학위논문

갈근의 항산화 및 항염증 활성성분

지도교수 최재수



식품생명과학과

진성은

진성은의 이학석사 학위논문을 인준함.

2011년 2월 23일



주	심	이학박사	류 은 순	(인)
위	원	의학박사	변 대 석	(인)
위	원	약학박사	최 재 수	(인)

목 차

LIST OF SCHEMES	i
LIST OF TABLES	ii
LIST OF FIGURES	iii
ABBREVIATIONS	iv
LIST OF SYMBOLS	V
ABSTRACT	1
I. 서론	4
Ⅱ. 실험 재료 및 방법	8
1. 재료	8
2. 시약 및 기기	8
2-1. 시약	8
2-2. 7]7]	9
2-3. 실험 세포주	10
2-4. 실험 동물	10
3. 실험 방법	10
3-1. 추출 및 분획	10
3-2. RAW 264.7 세포주의 배양	12
3-3. 활성성분 분리	12
3-3-1. <i>n</i> -Hexane 분획물의 성분 분리	12
3-3-1-1. <i>n</i> -Hexane 분획물 유래 성분의 분광학적 특성	14

3-3-2. EtOAc 분획물의 성분 분리	18
3-3-2-1. EtOAc 분획물 유래 성분의 분광학적 특성	20
3-3-3. <i>n</i> -BuOH 분획물의 성분 분리	23
3-3-3-1. n-BuOH 분획물 유래 성분의 분광학적 특성	25
3-4. RAW 264.7 세포에서의 항염증 활성	30
3-4-1. 세포독성 측정	30
3-4-2. LPS로 유도된 NO 측정	30
3-4-3. Western blot을 통한 iNOS 및 COX-2 발현 분석	31
3-4-4. t-BHP로 유도된 세포내의 ROS 측정	31
3-5. In vivo에서의 항염증 활성	34
3-5-1. 마우스에서 λ-CGN으로 유도된 발 부종 억제 활성	34
3-6. 항산화 활성	35
3-6-1. DPPH radical 소거 활성	35
3-6-2. ONOO ⁻ 소거 활성	38
3-6-3. NO· 소거 활성	41
3-6-4. Xanthine oxidase (·O2 ⁻) 소거 활성	43
3-6-5. Total ROS 소거 활성	43
3-6-6. ONOO ⁻ 에 의한 tyrosine nitration 억제 활성	44
Ⅲ. 결과	45
1. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 평가	45
1-1. 갈근 MeOH 추출물 및 각 분획물들의 RAW 264.7 세포에 대한	세포
독성 평가	45
1-2. 갈근에서 분리된 화합물들의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 3	평가
	49
2. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 효과	54

2-1. 갈근의 MeOH 추출물 및 각 분획물들이 RAW 264.7 세포에서 LPS로

유도된 NO 생성에 미치는 효과 54
2-2. 갈근에서 분리된 화합물들이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO
생성에 미치는 효과 55
3. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향
56
3-1. Lupenone과 lupeol이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및
COX-2 발현에 미치는 영향 57
4. RAW 264.7 세포에서 <i>t</i> -BHP로 유도된 ROS 생성에 미치는 효과 60
5. In vivo에서의 항염증 활성 62
5-1. 마우스에서 λ-CGN으로 유도된 뒷발 부종에 대한 lupenone과
Lupeol의 억제 활성 62
6. 갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 항산화 활성 64
6-1. 갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 DPPH radical 소거 활성
64
6-2. 갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 ONOO ⁻ 소거 활성 64
6-3. n-BuOH 분획물에서 분리된 puerarin derivatives의 항산화 활성 67
6-4. n-BuOH 분획물에서 분리된 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin의
ONOO ⁻ 에 의한 tyrosine nitration 억제 활성 69
IV. 고찰 71
V.요약 77
VI. 참고문헌 79

LIST OF SCHEMES

Scheme

Page

Scheme 1.	Procedure of extraction and fractionation of <i>P. lobata</i> roots	11
Scheme 2.	Isolation of compounds from the <i>n</i> -hexane fraction of <i>P</i> . <i>lobata</i> roots	
		13
Scheme 3.	Isolation of compounds from the EtOAc fraction of <i>P. lobata</i> roots	
		19
Scheme 4.	Isolation of compounds from the <i>n</i> -BuOH fraction of <i>P. lobata</i> roots	
		24



LIST OF TABLES

Table

Page

Table 1. Effects of lupenone and lupeol on λ -CGN-induced paw edema in mice	63
Table 2. DPPH radical and ONOO ⁻ scavenging activities of theMeOH extract and	its
various solvent soluble fractions of <i>P. lobata</i> roots	66
Table 3. Antioxidant activities of puerarin derivatives isolated from the <i>n</i> -BuOH fract	ion
of <i>P. lobata</i> roots	68



LIST OF FIGURES

Figure

Fig.	1. Chemical structures of compounds isolated from the <i>n</i> -hexane fraction 17	/
Fig.	2. Chemical structures of compounds isolated from the EtOAc fraction 22)
Fig.	3. Chemical structures of compounds isolated from the <i>n</i> -BuOH fraction 29)
Fig.	4. Assay of the inhibitory activity on the ROS generation 33	;
Fig.	5. DPPH radical scavenging action of antioxidants [ArOH] 37	7
Fig.	6. ONOO ⁻ -mediated oxidation of DHR 123 40)
Fig.	7. DAF-2T formation by reaction between NO and DAF-2 42)
Fig.	8. Effects of MeOH extract and its various solvent soluble fractions of P. lobata	l
	roots on LPS-induced nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells	-
	47	7
Fig.	. Effects of compounds isolated from P. lobata roots on LPS-induced nitrite)
	production and cell viability in RAW 264.7 cells 50)
Fig.). Effects of compounds isolated from Pueraria lobata roots on LPS-induced iNOS	5
	and COX-2 expression in RAW 264.7 cells 59)
Fig.	1. Effects of lupenone and lupeol on t-BHP-induced ROS generation in RAW 264.7	7
	cells 61	
Fig.	2. Effects of 3'-hydroxypuerarin and 3'-methoxypuerarin on the nitration of BSA by	1
	ONOO ⁻ 70)
Fig.	3. Plausible multifunctional actions of <i>P. lobata</i> roots in inflammatory pathways	-
-	76	5

ABBREVIATIONS

CH_2Cl_2	: dichloromethane (methylene chloride)
EtOAc	: ethyl acetate
n-BuOH	: <i>n</i> -butanol
H_2O	: water
¹ H-NMR	: proton nuclear magnetic resonance
¹³ C-NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
DMSO- d_6	: deuterium dimethyl sulfoxide
CDCl ₃	: deuterium chroloform
Fig.	: Figure
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
RP	: reverse phase
TLC	: thin layer chromatography
UV /	: Ultraviolet
LPS	: lipopolysaccharide
NO	: nitric oxide
iNOS	: inducible nitric oxide synthase
COX-2	: cyclooxygenase-2
t-BHP	: tert-butylhydroperoxide
ROS	: reactive oxygen species
RNS	: reactive nitrogen species
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ONOO ⁻	: peroxynitrite
$\cdot O_2^-$: superoxide anion

LIST OF SYMBOLS

- J Coupling constant (Hz)
- δ Chemical shift



Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from Pueraria lobata roots

Seong Eun Jin

Department of Food and Life Science, Graduate School, Pukyong National University

Abstract

The *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi (Leguminosae) is widely distributed in temperate regions of Far Eastern Asia including Korea, Japan, China, and India and is one of the earliest and most important edible crude herbs used in traditional Oriental medicine as a muscle relaxant, antipyretic, and antidysenteric, and for the treatment of cardiovascular diseases. It is popular for consumption in the treatment of hypertension and alcoholism with antioxidant and has shown anti-dipsotropic activities. The genus *Pueraria* contains high amounts of isoflavonoids, especially puerarin and daidzein. Isoflavonoids exhibit a wide range of biological activities; they have anti-inflammatory, antithrombotic, antihypertensive, antiarrhythmic, spasmolytic, and cancer chemopreventive properties. It is well known that the beneficial effects on health of isoflavonoids are due to their antioxidant and phytoestrogenic properties.

In this study, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanolic (MeOH) extract and its soluble fractions, such as the *n*-hexane, dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) and water (H₂O) from *P. lobata* roots were investigated. Intracellular anti-inflammatory capacities were determined *via* inhibitory activities of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production, as well as expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in RAW 264.7 cells. Antioxidant activities were evaluated by *in vitro* scavenging activities against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), peroxynitrite

(ONOO[¬]), nitric oxide (NO·), superoxide anion ($\cdot O_2^{-7}$), and reactive oxygen species (ROS), as well as inhibitory activities against ONOO[¬]-mediated tyrosine nitration. In the antioxidant assays, the MeOH extract exhibited scavenging activities of DPPH and ONOO[¬] with IC₅₀ values of 83.30 and 58.61 µg/ml, respectively. Among the tested fractions, the EtOAc fraction exhibited highest scavenging activities in both DPPH and ONOO[¬] assays with respective IC₅₀ values of 7.90 and 37.31 µg/ml followed by the *n*-BuOH fraction, of which corresponding respective IC₅₀ values of 41.55 and 54.69 µg/ml. Although the CH₂Cl₂ fraction showed DPPH radical scavenging activity with an IC₅₀ value of 31.05 µg/ml, it showed weak ONOO[¬] scavenging activity with an IC₅₀ value of 117.51 µg/ml. Conversely, the H₂O fraction showed no activities in both of the antioxidant assays at the concentration tested. In the anti-inflammatory assay, the MeOH extract showed inhibition of LPS-induced NO production with an IC₅₀ value of 31.80 µg/ml in RAW 264.7 cells. The *n*-hexane and EtOAc fractions exhibited higher NO inhibitory activities over other fractions with respective IC₅₀ values of 5.88 and 0.13 µg/ml, and *n*-BuOH fraction showed weak NO inhibitory activity (IC₅₀ = 101.64 µg/ml) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Although, the EtOAc fraction having numerous isoflavonoids such as daidzin, daidzein, genistin, and genistein, exhibited strong NO inhibitory activity, it is well known that isoflavonoids might attribute to inhibition of NO production, thus detailed phytochemical investigations and antiinflammatory activity studies on the *n*-hexane fraction were carried out. Repeated column chromatography of the *n*-hexane fraction was accomplished to yield lupenone, lupeol, puerarol, coumestrol, and glyceryl-1-tetracosanoate. These compounds were identified by direct comparisons of their spectral data with the reported ones. Among these compounds, lupenone and lupeol reduced NO production (IC₅₀ value = 10.81 and 64.65 μ M, respectively) as well as iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Furthermore, lupeol showed significant inhibitory activity against intracellular ROS generation by *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) (IC₅₀ = 122.48 μ M). Meanwhile, bioactivity-guided isolation of the antioxidant active the *n*- BuOH fraction resulted in the isolation of allantoin, 3'-hydroxypuerarin, 3'-methoxypuerarin, daidzein 8-*C*-apiosyl-(1 \rightarrow 6)-glucoside, daidzin, genistin, and ononin. The structural identification of these compounds was performed by spectroscopic analysis. Among them, 3'-hydroxypuerarin demonstrated marked ONOO⁻, NO· and total ROS scavenging activities (IC₅₀ = 1.36, 1.13, and 6.51 µM, respectively), and weak \cdot O₂⁻ scavenging activity (IC₅₀ = 211.66 µM). Moreover, 3'-hydroxypuerarin showed inhibitory activity of ONOO⁻-mediated tyrosine nitration. On the other hand, 3'-methoxypuerarin showed ONOO⁻ scavenging activity (IC₅₀ = 1.94 µM) and weak NO·, \cdot O₂⁻ scavenging activities (IC₅₀ = 68.43 and 247.35 µM, respectively). These results suggest that the existence of 3'-hydroxyl group in puerarin is proved to play an important role in the scavenging of ONOO⁻, NO·, and total ROS as well as inhibiting of ONOO⁻-mediated tyrosine nitration mechanism.

These results indicate that *P. lobata* roots and its constituents may be a useful therapeutic and preventive approach to various inflammatory diseases and oxidative stress-related disease.



갈근은 콩과의 갈잎 덩굴나무로 칡 (Pueraria lobata (Willd.) Ohwi (Leguminosae))의 주피를 제거한 뿌리이다. 우리나라 전역의 산지 및 중국, 일 본, 남아메리카, 멕시코 및 미국의 일부에서 야생하는 등 온대 및 열대지방에 널리 자생하는 갈근은 오래 전부터 구황작물로 이용되어 왔고, 음주와 관련된 숙취증상을 완화하기 위해 사용되며, 고혈압, 협심증, 당뇨병 등에 약효를 갖 고 있다 (Chang and But, 1987). 주요 성분으로는 puerarin, daidzin, daidzein, genistein과 같은 soflavonoids 등이 있으며 (Shibata *et al.*, 1959), 이들의 항박테리 아, 항바이러스, 항암, 항염증 등을 포함한 다양한 생리학적 기능이 밝혀져 있 다 (Kinjo *et al.*, 1987; Ohshima *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1994).

염증은 외부로부터의 자극에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 조직 변 질, 순환장애, 그리고 조직 증식 등을 병발하는 복잡한 병변이다 (Tizard, 1986). 이러한 염증반응은 선천성 면역반응의 일부로 병원체에 특이적으로 존재하는 세포 표면의 패턴을 인식함으로부터 시작된다. 이 과정은 LPS와 같은 외부 자 극원 또는 arachidonic acid 대사체 같은 내부 자극원들을 주요 매개로 하여 macrophages, granulocytes, fibroblasts와 같은 염증성 세포의 염증부위로의 유입 과 축적을 주요 특징으로 한다 (Trowbridge and Emling, 1997). 특히 염증 부위의 활성화된 machrophages는 cytokines 뿐 아니라 arachidonic acid 대사체인 prostaglandins (PGs)과 일산화질소 (NO) 등을 다량 생성함으로써 염증 매개에 큰 역할을 한다. 염증의 발생 원인으로는 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있으나, 특히 NO를 생성하는 효소인 일산화질소 생성효소 (nitric oxide synthase, NOS)와 다양한 PGs의 생합성을 매개하는 효소인 cyclooxygenase (COX)가 염증 반응을 조절하는 중요한 매개체로 알려져 있다 (Lawrence *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 1990; Laflamme and Rivest, 2001; Willeaume *et al.*, 1996). NO는 L-arginine으로부

터 constitutive nitric oxide (cNOS)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되는데, cNOS는 일정하게 발현되어 physiological functions을 매개하는 NO 를 낮은 수준으로 생성하는 반면, iNOS는 LPS와 cytokines 같은 자극에 의해 급격하게 유도되어 과량의 NO를 생성한다 (Liang et al., 1999). 따라서 염증 반 응에서의 NO 생성은 대부분 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다 (Huang et al., 2001). 한편 PGs은 constitutive cyclooxygenase (COX-1)과 inducible cyclooxygenase (cyclooxygenase-2, COX-2)에 의해 arachidonic acid로부터 생성된다. COX-1은 cNOS의 경우와 마찬가지로 일정하게 발현되어 physiological function을 조절하 는 반면, COX-2는 염증 자극원에 의해 macrophages, granulocytes, fibroblasts와 같 은 염증성 세포에서 유도되며 (Herscham, 1996), 역시 염증반응에서의 PGs은 대부분 COX-2에 의해 생성된다 (Reddy and Herschman, 1994). Macrophages는 백 혈구 (neutrophills), 자연살해세포 (natural killer cells)와 더불어 외부의 병원균에 대해서 host defence의 제1선에서 중요한 역할을 한다. 감염과 염증이 생성되면, L-arginine은 iNOS에 의해 NO로 생산되는데, 활성화된 macrophages는 NO와 pro-inflammatory cytokines을 분비하여 다른 면역세포와 조직에 영향을 준다 (Nathan and Xie, 1994). 그런데 이와 같은 염증반응이 과도한 경우에는 패혈성 쇼크 혹은 류마티스 관절염과 같은 염증질환의 원인이 되며, 이 과정에서 NO 와 PGs의 과도한 생성이 중요한 역할을 담당한다는 사실들이 보고되어 있다 (Higgs et al., 1984). 이에 따라, NO와 PGs의 과도한 생성과 이들의 생성에 관여 하는 효소의 발현을 억제할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 특히 식품으로부터 분리 · 정제된 성분은 비교적 독성이 적 어 의약품에 비해 장기간 섭취하여도 안전하다는 점 때문에 각종 염증질환의 치료제 및 치료보조제로 각광을 받고 있다.

Superoxide ($\cdot O_2^{-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), singlet oxygen (1O_2), alkoxyl radical ($RO \cdot$), peroxyl radical ($ROO \cdot$) 그리고 peroxynitrite ($ONOO^{-}$)와

같은 reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen species (RNS)는 macrophages 등의 염증성 세포로부터 생성된다. 이들 ROS와 RNS는 지질, 단 백질, 핵산, 그리고 DNA와 같이 우리 몸을 구성하는 성분에 손상을 주는 강 력한 산화 및 질화 요소로 작용하며, 이로 인해 염증 및 노화와 관련된 만성 질환이 야기된다 (Beckman *et al.*, 1990; Vallyathan and Shi, 1997). 그리고 ROS 및 RNS는 cyclooxygenase와 lipooxygenase에 의한 arrachidonic acid에서 염증성 매개 체로의 전환에 영향을 주며, macrophages에 의한 염증 과정 동안 free radical이 생성된다. 따라서 free radicals을 소거할 수 있는 항산화제가 염증 및 산화적 스트레스로 인한 질환을 예방하고 치료할 수 있을 것으로 기대할 수 있다 (Backhouse *et al.*, 1994).

이에 본 연구는 오래 전부터 구황작물이 이용되어 온 갈근으로부터 새로운 항염증 및 항산화 활성성분을 찾고자 하였다. 따라서 갈근을 메탄올 (MeOH) 로 추출하고 이 MeOH 추출물을 용매의 극성에 따라 계통적으로 용매 분획한 후 이들의 항염증 활성을 검증하기 위하여 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 억제 활성을 평가하였다. 또한 이들의 효과가 어 떤 성분에서 기인한 것인지 확인하기 위하여 NO 억제 활성이 가장 높은 EtOAc 분획물을 대상으로 column chromatography를 하여 anhydroglycinol, daizein, genistein, (+)-Puerarol B-2-O-glucopyranoside, 그리고 puerarin을 분리하였으며, 이 들은 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, EIMS spectra 등의 분광학적 방법을 이용하여 확인하였 다. 그러나 EtOAc 분획물에 합유된 daidzein과 genistein의 항염증 활성은 이미 알려져 있어 (Sheu *et al.*, 2001; Jun *et al.*, 2005), EtOAc 분획물 다음으로 NO 억제 활성이 높은 *n*-hexane 분획물로부터 column chromatography를 이용하여 lupenone, lupeol, puerarol, coumestrol, 그리고 glyceryl-1-tetracosanoate를 분리하였 다. 이들 중 lupenone의 항염증 활성은 아직 밝혀지지 않았으며, lupenone과 같 은 lupane-type triterpene인 lupeol은 항염증 효능에 대해 알려져 있으나 (Saleem,

6

2009), RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현, 그리고 *t*-BHP로 유도된 ROS 생성 억제에 관해서는 자세히 연구된 바가 없어 이들의 항염증 활성에 대한 연구를 진행하였다.

한편 갈근 MeOH 추출물과 각 분획물들 중 DPPH radical과 ONOO⁻ 소거 활 성이 높으면서 수율 면에서 뛰어난 *n*-BuOH 분획물을 대상으로 column chromatography를 반복하여 allantoin, 3'-hydroxypuerarin, puerarin, daidzein 8-*C*apiosyl(1→6)-glucoside, genistin, daidzin, 3'-methoxypuerarin, 그리고 ononin을 분리 하였다. 이들 중 갈근의 주성분인 puerarin과 같은 골격의 3'-hydroxypuerarin 및 3'-methoxypuerarin의 항산화 활성과 구조간의 상관관계를 확인하기 위하여 ONOO⁻, NO·, ·O₂⁻, total ROS에 대한 소거 활성, 그리고 ONOO⁻로 매개된 tyrosine nitration 억제 활성을 비교 평가하였다. 그 결과 puerarin 골격의 C-3' 위치에 hydroxyl group이 존재하여 전자나 수소를 공여하기 쉬운 3'hydroxypuerarin이 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

종합적으로 본 연구는 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용한 in vitro 실험 계에서 갈근의 MeOH 추출물 및 각 분획물, 그리고 이들로부터 분 리된 화합물, 특히 아직 항염증 효능에 관한 연구가 미비한 lupenone과 lupeol 이 염증반응 매개물질의 생성 억제에 관여하는지를 검토함으로써 이에 기인한 갈근의 항염증 효과를 평가하고자 하였으며, 아울러 갈근의 주요 성분인 puerarin과 같은 골격의 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin의 항산화 활성도 함께 검토하였다. 따라서 항염증 및 항산화 활성성분을 함유하는 갈근을 다양 한 염증 및 산화적 스트레스로 인한 질환을 예방하고 치료하기 위한 기능성 식품으로 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

7

1. 재료

본 실험에서 사용한 갈근 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi roots)은 경북 영천에 서 재배된 것으로 2005년 10월에 직접 구입하여 동국대학교 이제현 교수님으 로부터 감정하여 사용하였다. 식물 표본은 부경대학교에 보관하고 있다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Column packing materials은 silica (Si) gel 60 (70~230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)과 sephadex LH-20 (bead size 25~100 µm, Sigma, St. Louis, MO, USA), LiChroprep[®] RP-18 (40~63 µm, Merck, Germany), Diaion HP-20 (250~850 µm, Sigma)을 사용하였다. Thin layer chromatography는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plates (20 × 20 cm, 0.25 mm. Merck)와 RP-18 F_{254s} plates (5 × 10 cm, Merck)를 사용하였으며, 발색시약은 50% H₂SO₄을 분사하여 hot plate에 태워서 발색되는 색을 관찰하였다. 추출 및 column chromatography에는 1급 시약을 사용하였으며, NMR 측정에는 dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*₆ (Merck, deuterium degree 99.95%)와 CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95%)를 사용하였다.

LPS from *Escherichia coli*, Griess reagent, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), *t*-BHP, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), λ -carrageenan (CGN), prednisolone, DPPH, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), dihydrorhodamine 123 (DHR 123), sodium nitroprusside dihydrate (SNP), 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), xanthine (2,6-dihydroxypurine), xanthine oxidase (XOD) from bovine milk, bovine serum albumin

(BSA), 2-amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazine hydrochloride (AMT), L-ascorbic acid, L-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid (L-penicillamine), 2-(4carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl (carboxy-PTIO) potassium salt, allopurinol, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), fetal bovine serum (FBS), 그리고 antibiotics (streptomycin, penicillin)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. ONOO-는 Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. Primary antibodies (iNOS, COX-2, β-actin monoclonal antibodies)는 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, anti-nitrotyrosine (clone 1A6, mouse-monoclonal primary antibody, IgG2bK)과 horseradish peroxide (HRP)-conjugated anti-rabbit, anti-mouse Millipore Co. (Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. antibodies는 Polyvinylidenefluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P)은 Millipore Co. (Billelica, MA, USA)에서 구입하였으며, Supersignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate는 Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

2-2. 7]7]

¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 JNM ECP-400 spectrometer (400 MHz for ¹H NMR and 100 MHz for ¹³C NMR, JEOL, Japan)로 측정하였으며, EI-MS는 Hewlett-Packard 5989B spectrometer (Agilent Technologies)와 JEOL JMS-700 spectrometer로 측정하였다. IP는 고체시료의 경우 Perkin-Elmer 2000 spectrophotometer에서 KBr disc법으로 각각 측정하였으며, TLC상의 화합물 검색을 위해 장파장 (365 nm)과 단파장 (245 nm) 겸용 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, U.S.A)를 사용하였다. RAW 264.7 세포에서의 cell viability와 NO 생성 및 DPPH radical 측정은 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 하였고, ROS,

NO·, ONOO⁻ 측정은 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 하였으며, ONOO⁻의 흡광도와 ·O₂⁻ 측정은 UV spectrophotometer (Ultraspec[®] 2100 *pro*, Amersham Biosciences, USA)로 하였다.

2-3. 실험 세포주

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받아 사용하였다.

2-4. 실험 동물

4 주령의 수컷 ICR 마우스 (20 g)는 Samtaco Bio Korea Ltd. (Korea)에서 구입하였다.

3. 실험 방법

3-1. 추출 및 분획

같근 분말 12 kg 을 methanol (12 L)로 70℃의 수욕상에서 3 시간 동안 환류 냉각기를 사용하여 3 회 추출 후 여과하고, 그 여액을 rotary vacuum evaporator 에서 농축하여 MeOH 추출물 2.5 kg 을 얻었다. MeOH 추출물은 계통적 분석법에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (75 g), CH₂Cl₂ (30 g), EtOAc (43 g), *n*-BuOH (1,087 g), 그리고 H₂O (1,265 g) 분획물을 얻었다. 그 과정은 Scheme 1 에 나타내었다.



3-2. RAW 264.7 세포주의 배양

RAW 264.7 세포를 10% heat-inactivated FBS와 100 Unit/ml streptomycin, 100 µg/ml penicillin을 포함하고 있는 DMEM을 사용하여 37℃, 5% CO₂/air mixture 조건에서 배양하였다.

3-3. 활성성분 분리

3-3-1. n-Hexane 분획물의 성분 분리

갈근의 n-hexane 분획물 (75 g)을 Si column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH = 1:0→1:1, gradient)하여 16개의 subfractions (Fr. 1~16)으로 나누었다. 이들 중 Fr. 5 (1.7 g)을 Si column chromatography (n-hexane:EtOAc = 50:1→0:1, gradient)하여 6개의 fractions (Fr. 5-1~5-6)을 얻었으며, Fr. 5-2 (0.9 g)를 Si column chromatography (n-hexane:EtOAc = 100:1→0:1, gradient)하여 lupenone (680 mg)을 분리하였다 (Na et al., 2002). Fr. 9 (8.5 g) \equiv Si column chromatography (*n*-hexane:EtOAc = 30:1→0:1, gradient)하여 4개의 fractions (Fr. 9-1~9-4)을 얻었으며, Fr. 9-3 (4.5 g)을 Si column chromatography (n-hexane:EtOAc = 20:1→0:1, gradient)하여 lupeol (3.5 g)을 얻었다 (Na et al., 2002). 또한 Fr. 11 (1.6 g)을 100% MeOH 용매로 재결정하여 puerarol (130 mg) (Namgoong, et al., 1994)과 coumestrol (50 mg) (Bickoff et al., 1958)을 분리하였으며, Fr. 12 (3.6 g)를 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH = 30:1→0:1, gradient)하여 8개의 fractions (Fr. 12-1~12-8)으로 나누고, 이들 중 Fr. 12-6 (1.9 g)을 Si gel column chromatography (*n*-hexane:acetone = $4:1\rightarrow0:1$, gradient)하여 glyceryl-1-tetracosanoate (31 mg)을 분리하였다 (Saito et al., 1990; Hsieh et al., 2004). 이들 화합물은 분광학적 기기분석에 의하여 구조를 확인하였으며, 분리 과정은 Scheme 2에 나타내었다.

12



Scheme 2. Isolation of compounds from the *n*-hexane fraction of *P*. lobata roots.



3-3-1-1. n-Hexane 분획물 유래 성분의 분광학적 특성

n-Hexane 분획물에서 분리된 화합물들의 화학적 구조결정을 위하여 NMR (¹H, ¹³C), IR, UV, Mass-Spectrometry 등의 여러 가지 분광학적 분석을 통하여 구 조를 동정하였으며, 각각 문헌치와 비교하였다.

Lupenone : Colorless needles; mp 169-170°C; v_{max} (KBr) : 1717, 1638, 1458, 1381, 882; EI-MS *m/z* (%) 424; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.69 (1H, d, *J* = 1.95 Hz, H-29), 4.57 (1H, d, *J* = 1.56 Hz, H-29), 1.68 (3H, s), 1.07 (6H, s), 1.02 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.79 (3H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 218.26 (C-3), 150.86 (C-20), 109.39 (C-29), 54.92 (C-5), 49.78 (C-9), 48.23 (C-18), 47.95 (C-19), 47.32 (C-4), 42.98 (C-17), 42.88 (C-14), 40.77 (C-8), 39.97 (C-22), 39.61 (C-1), 38.16 (C-13), 36.88 (C-10), 35.51 (C-16), 34.14 (C-7), 33.56 (C-2), 29.82 (C-21), 27.42 (C-15), 26.64 (C-23), 25.15 (C-12), 21.46 (C-11), 21.03 (C-24), 19.67 (C-6), 19.30 (C-30), 18.00 (C-28), 15.96 (C-25), 15.77 (C-26), 14.47 (C-27).

Lupeol : Colorless needles; mp 210-212 °C; v_{max} (KBr) : 3326, 2931, 1631, 1450, 1377, 1035, 874; UV λ_{max} (CHCl₃) (log ε): 228 (60.1), 285 (31.8); EI-MS *m/z* (%) 426; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.68 (1H, br s, H-29a), 4.56 (1H, br s, H-29b), 3.18 (1H, dd, J = 5.08, 11.32 Hz, H-3), 2.37 (1H, dd, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 0.78 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-24), 0.83 (3H, s, H-25), 1.03 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-27), 0.76 (3H, s, H-28); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 150.96 (C-20), 109.31 (C-29), 78.98 (C-3), 55.28 (C-5), 50.41 (C-9), 48.28 (C-19), 47.97 (C-18), 42.98 (C-17), 42.81 (C-14), 40.81 (C-8), 39.98 (C-22), 38.84 (C-4), 38.69 (C-1), 38.03 (C-13), 37.14 (C-10), 35.56 (C-16), 34.26 (C-7), 29.83 (C-21), 27.97 (C-23), 27.43 (C-2), 27.40 (C-15), 25.12 (C-12), 20.91 (C-11), 19.29 (C-30), 18.30 (C-6), 17.98 (C-28), 16.10 (C-25), 15.96 (C-26), 15.35 (C-24), 14.53

(C-27).

Puerarol: White crystal; mp 237 °C; ν_{max} (KBr) : 3460, 3360, 1728, 1602, 1572; UV λ_{max} (MeOH) (log ε): 245 (4.35), 296 (3.70), 306 (3.89), 350 (4.42); EI-MS *m/z* (%) 404; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.69 (1H, s, OH-9), 10.01 (1H, s, OH-3), 7.66 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-7), 7.58 (1H, s, H-4), 7.11 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-10), 6.92 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz, H-8), 6.93 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz, H-8), 6.91 (1H, s, H-1), 5.34 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2'), 5.11 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-6'), 3.31 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 2.11 (4H, m, H-4', 5'), 1.68 (3H, s, H-8'), 1.65 (3H, s, H-9'), 1.56 (3H, s, H-10'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 159.4 (C-3), 158.9 (C-11a), 157.6 (C-6), 156.9 (C-10a), 155.9 (C-9), 152.8 (C-4a), 136.2 (C-3'), 130.8 (C-7'), 126.4 (C-6'), 124.0 (C-2'), 122.5 (C-1), 120.8 (C-2), 120.6 (C-7), 114.7 (C-7a), 113.9 (C-8), 104.7 (C-1a), 102.3 (C-4), 101.9 (C-6a), 98.6 (C-10), 39.3 (C-4'), 27.3 (C-1'), 26.0 (C-5'), 25.5 (C-8'), 17.5 (C-9'), 15.8 (C-10').

Coumestrol : White amorphous powder; UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 350 (4.18), 304 (3.85), 244 (4.11), 220 (4.04); EI-MS *m/z* (%) 268; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.69 (1H, s, OH-9), 10.02 (1H, s, OH-3), 7.84 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-1), 7.68 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-7), 7.15 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-10), 6.95 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz, H-8), 6.93 (2H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz, H-2), 6.89 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.2 (C-3), 159.4 (C-11a), 157.6 (C-6), 157.0 (C-10a), 155.9 (C-9), 154.6 (C-4a), 122.7 (C-1), 120.6 (C-7), 114.6 (C-7a), 114.0 (C-8), 113.7 (C-2), 104.2 (C-1a), 103.0 (C-4), 102.0 (C-6a), 98.7 (C-10).

Glyceryl-1-tetracosanoate : White crystal; EI-MS m/z (%) 442 [M⁺] (0.7), 411 (6.7), 368 (8.6), 351 (17.4), 323 (7.9), 154 (35.4), 134 (71.4), 112 (51.1), 98 (100); ¹H-NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ : 4.21 (1H, dd, J = 4.7, 11.7 Hz, H-1a), 4.14 (1H, dd, J = 6.3, 11.7 Hz, H-1b), 3.93 (1H, q, J = 5.5 Hz, H-2), 3.70 (1H, dd, J = 3.9, 11.3 Hz, H-3a), 3.60 (1H, dd, J = 5.7, 11.3 Hz, H-3b), 2.52 (1H, br s, OH-2), 2.35 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-2'), 2.08 (1H, br s, OH-3), 1.63 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-3'), 1.25 (42H, br s, H-4' \sim 23'), 0.88 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-24'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 174.34 (C-1'), 70.27 (C-2), 65.17 (C-1), 63.32 (C-3), 34.15 (C-2'), 31.92 (C-22'), 29.69 \sim 29.20 (C-4' \sim C-21'), 22.68 (C-23'), 14.11 (C-24').





Fig. 1. Chemical structures of compounds isolated from the *n*-hexane fraction.

3-3-2. EtOAc 분획물의 성분 분리

갈근의 EtOAc 분획물 (43 g)을 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH = 1:1→0:1, gradient)하여 14개의 subfractions (Fr. 1-14)으로 나누었다. 이들 중 Fr. 3 (1 g)을 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH = 20:1→0:1, gradient)하여 6개 의 fractions (Fr. 3-1~3-6)으로 나누고, Fr. 3-3 (240 mg)을 30% MeOH 용매로 RP18 column chromatography하여 anhydroglycinol (30 mg)을 분리하였다. Fr. 10 (15 g)을 여과하여 MeOH 재결정법에 의해 daidzein (2.4 g) (Shibata et al., 1959)을 분리하 였으며, 모액을 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH = 20:1→0:1, gradient) 하여 genistein (2 g) (Hudson and Bentley, 1969)을 분리하였다. 또한 Fr. 12 (15.2 g) 를 100% MeOH 용매로 Sephadex LH-20 gel column chromatography하여 12개의 fractions (Fr. 12-1~12-12)으로 나누고, Fr. 12-8~12-9 (7 g)를 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O = 5:1:0.1)하여 puerarin (2.1 g) (Kinjo et al., 1988a)을 분리하였으며, Fr. 12-10 (3.8 g)을 Si gel column chromatography $(CH_2Cl_2:MeOH:H_2O = 10:1:0.1)$ 하여 (+)-puerarol B-2-O-glucopyranoside (230 mg) (Ding et al., 2004)를 분리하였다. Anhydroglycinol은 표준품과 비교 TLC 하여 확 인하였으며, 나머지 화합물들은 분광학적 기기분석에 의하여 구조를 확인하였 다. 분리 과정은 Scheme 3에 나타내었다.

CH OT IN

17 73



Scheme 3. Isolation of compounds from the EtOAc fraction of P. lobata roots.



3-3-2-1. EtOAc 분획물 유래 성분의 분광학적 특성

EtOAc 분획물에서 분리된 화합물들의 화학적 구조결정을 위하여 NMR (¹H, ¹³C), IR, UV, Mass-Spectrometry, TLC 등의 여러 가지 분광학적 분석을 통하여 구조를 동정하였으며, 각각 문헌치와 비교하였다.

Daidzein : Colorless needles; 300 °C; UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 303 (sh 4.00), 259 (sh 4.38), 249 (sh 4.40), 238 (sh 4.38); EI-MS *m/z* (%) 254; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.81 (1H, br s, OH-7), 9.58 (1H, br s, OH-4'), 8.28 (1H, s, H-2), 7.96 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-5), 7.38 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.93 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.9 Hz, H-6), 6.86 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.81 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.69 (C-4), 162.51 (C-7), 157.42 (C-9), 157.16 (C-4'), 152.78 (C-2), 130.06 (C-2', 6'), 127.28 (C-5), 123.48 (C-1'), 122.55 (C-3), 116.63 (C-10), 115.11(C-6), 114.94 (C-3', 5'), 102.09 (C-8).

Genistein : White powder; 297-298°C, UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 264 (4.45); EI-MS m/z (%) 270; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.95(1H, br s, 5-OH), 10.87 (1H, br s, 7-OH), 9.58 (1H, br s, 4'-OH), 8.31 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.20(C-4), 164.25 (C-7), 161.99 (C-5), 157.57 (C-4'), 157.40 (C-2), 153.94 (C-9), 130.14 (C-2', 6'), 122.27 (C-3), 121.20 (C-1'), 115.05 (C-3', 5'), 104.45 (C-10), 98.74 (C-6), 93.64 (C-8).

(+)-Puerarol B-2-*O*-glucopyranoside : White powder; 231-234 °C; λ_{max} (MeOH) (log ε) : 312, 286, 217; EI-MS *m/z* (%) 474; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.23 (1H, s, OH-4), 7.57 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6), 6.95 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-2, 6), 6.89 (1H, d, *J* =

2.3 Hz, H-3), 6.72 (1H, dd, J = 2.3, 8.6 Hz, H-5), 6.63 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3, 5), 6.34 (1H, s, H-2), 6.01 (1H, m, H-4), 5.05 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.05 (1H, dd, J = 2.7, 14.4 Hz, H-5a), 2.55 (1H, dd, J = 7.8, 14.4 Hz, H-5b); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.49 (C-1), 165.98 (C-3), 162.91 (C-4), 156.35 (C-2), 155.96 (C-4), 131.31 (C-6), 130.40 (C-2, 6), 126.67 (C-1), 114.78 (C-3, 5), 113.34 (C-2), 112.07 (C-1), 108.58 (C-5), 101.17 (C-3), 100.22 (C-1'), 83.61 (C-4), 77.42 (C-5), 76.54 (C-3), 73.07 (C-2), 69.92 (C-4), 60.79 (C-6), 55.49 (OCH₃), 38.24 (C-5).

Puerarin : White amorphous powder; UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 308 (3.85), 271 (4.11), 250 (4.20), 242 (4.23); EI-MS *m/z* (%) 416; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.52 (1H, s, OH-4'), 8.35 (1H, s, H-2), 7.94 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 7.40 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.99 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-6), 6.81 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 4.98 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-1"), 4.81 (1H, t-like, *J* = 5.5 Hz, OH-6"), 3.72 (1H, m, H-6"), 3.47 (2H, m, H-5", 6"), 3.31 (2H, m, H-2", 3"), 3.17 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-4"); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.90 (C-4), 161.06 (C-7), 157.14 (C-4'), 156.06 (C-9), 152.64 (C-2), 130.02 (C-2', 6'), 126.23 (C-5), 123.06 (C-3), 122.51 (C-1"), 116.86 (C-10), 114.95 (C-6), 114.95 (C-3', 5'), 112.66 (C-8), 81.83 (C-5"), 78.75 (C-1"), 73.42 (C-2"), 70.75 (C-3"), 70.47 (C-4"), 61.42 (C-6").



3-3-3. n-BuOH 분획물의 성분 분리

갈근의 n-BuOH 분획물 중 일부 (400 g)를 Diaion HP-20 column chromatography (H₂O→MeOH, gradient)하여 4개의 subfractions으로 나누었다: H₂O (B1, 175 g), 40% MeOH (B2, 276 g), 60% MeOH (B3, 17 g), and 100% MeOH (B4, 23 g). •] 들 중 B1 (175 g)을 H₂O로 Sephadex LH-20 column chromatography하여 11개의 subfractions (B1-1~1-11)을 얻었고, B1-3 (1 g)을 100% MeOH 용매로 여과하여 재 결정에 의해 allantoin (390 mg)을 분리하였으며(James et al., 1981), B1-4 (3.1 g)를 Si gel column chromatography (CH_2Cl_2 :MeOH:H₂O = 26:14:4), RP18 column chromatography (10% MeOH)하여 3'-hydroxypuerarin (13 mg)을 분리하였다 (Rong et al., 1998). 또한 B1-5와 B1-6 (20 g)을 Si gel column chromatography $(CH_2Cl_2:MeOH:H_2O = 26:14:4)$ 하여 daidzein 8-C-apiosyl(1→6)-glucoside (900 mg) (Ohshima et al., 1988)과 puerarin (12.8 g) (Kinjo et al., 1988a)을 분리하였으며, B1-11 (3 g)을 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O = 10:1:0.1)하여 genistin (85 mg)을 분리하였다 (Hasegawa et al., 1957). B2 (276 g)을 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O = 26:14:4)하여 3'-methoxypuerarin (176 mg) (Rong et al., 1998; Kinjo et al., 1988b)과 daidzin (3 g) (Shibata et al., 1959)을 분리하 였으며, B3 (17 g)을 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O = 26:14:4)하 여 ononin (16 mg) (Kim et al., 2008)과 daidzin (3.1 g) (Shibata et al., 1959)을 분리하 였다. 화합물들은 분광학적 기기분석에 의하여 구조를 확인하였으며, 분리 과 정은 Scheme 4에 나타내었다


3-3-3-1. n-BuOH 분획물 유래 성분의 분광학적 특성

n-BuOH 분획물에서 분리된 화합물들의 화학적 구조결정을 위하여 NMR (¹H, ¹³C), IR, UV, Mass-Spectrometry 등의 여러 가지 분광학적 분석을 통하여 구조를 동정하였으며, 각각 문헌치와 비교하였다.

Allantoin : White powder; EI-MS m/z (%) 158 [M+] (2.9), 141 (14.2), 130 (78.9), 115 (35.8), 87 (100), 70 (18.8), 60 (90.7); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.53 (1H, s, H-1), 8.06 (1H, s, H-3), 6.89 (1H, d, J = 8.2 Hz, NHCONH₂), 5.80 (2H, s, NHCONH₂), 5.24 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-4); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.63 (C-5), 157.40 (C-6), 156.81 (C-2), 62.44 (C-4).

3'-Hydroxypuerarin : White powder; mp 248-250 °C; v_{max} (KBr) : 3300, 1623, 1619, 1610, 1581; UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 309 (3.94), 295 (4.06), 272 (4.09), 238(4.23), 224 (4.22); EI-MS *m/z* (%) 432; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.66 (1H, s, 7-OH), 8.99 (1H, br s, 3'-OH), 8.94 (1H, br s, 4'-OH), 8.29 (1H, s, H-2), 7.93 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 7.03 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6), 6.98 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6'), 6.80 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.7 Hz, H-5'), 6.75 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 4.80 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-1"), 4.02 (1H, m, H-2"), 3.72 (1H, br d, *J* = 12 Hz, H-6"), 3.70 (1H, br d, *J* = 12 Hz, H-6"), 3.46 (1H, m, H-3"), 3.34 (1H, m, H-4"), 3.28 (1H, m, H-5"); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.84 (C-4), 161.02 (C-7), 156.08 (C-9), 152.55 (C-2), 145.23 (C-4'), 144.74 (C-3'), 126.21 (C-5), 123.21 (C-3), 123.21 (C-1'), 119.74 (C-6'), 116.84 (C-10), 116.61 (C-5'), 115.30 (C-2'), 114.94 (C-6), 112.62 (C-8), 81.78 (C-5"), 78.73 (C-1"), 73.41 (C-2"), 70.74 (C-3"), 70.45 (C-4"), 61.39 (C-6").

Daidzein 8-*C***-apiosyl-(1→6)-glucoside :** White powder; mp 188-190 °C; UV λ_{max}

(MeOH) (log ε) : 308 (3.90), 270 (4.10), 247 (4.18), 241 (4.23); EI-MS *m/z* (%) 548; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.52 (1H, s, OH-4'), 8.33 (1H, s, H-2), 7.94 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5), 7.39 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.99 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-6), 6.80 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 5.07 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1"), 4.79 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H-1), 4.00 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-4), 3.92 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-4), 3.84 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-6"), 3.73 (1H, m, H-2), 3.57 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-6"), 3.38 (1H, m, H-3"), 3.35 (1H, br s, H-5), 3.30 (1H, m, H-2"), 3.25 (2H, m, H-5"), 3.19 (1H, m, H-4"); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.90 (C-4), 161.02 (C-7), 157.13 (C-4'), 156.14 (C-9), 152.60 (C-2), 130.01 (C-2', 6'), 126.25 (C-5), 123.09 (C-3), 122.52 (C-1'), 116.87 (C-10), 114.95 (C-6), 114.95 (C-3', 5'), 112.50 (C-8), 109.04 (C-1), 80.05 (C-5"), 78.74 (C-3), 78.62 (C-1"), 75.66 (C-2), 73.37 (C-2"), 73.20 (C-4), 70.63 (C-3"), 70.52 (C-4"), 68.32 (C-6"), 62.97 (C-5).

Genistin : Colorless plates; mp 258-260 °C, UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 326 (3.70), 261 (4.40); EI-MS *m/z* (%) 432; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.94 (1H, s, OH-5), 9.61 (1H, s, OH-4'), 8.43 (1H, s, H-2), 7.40 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.72 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.47 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 5.41 (1H, br s, OH-2"), 5.14 (1H, br s, OH-3"), 5.06 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1"), 4.61 (1H, br s, OH-6"), 3.71 (1H, m, H-6"), 3.46 (2H, m, H-5", 6"), 3.27 (2H, m, H-2", 3"), 3.17 (1H, t, *J* = 8.1 Hz, H-4"); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 180.49 (C-4), 163.00 (C-7), 161.63 (C-5), 157.49 (C-9), 157.21(C-4'), 154.54 (C-2), 130.15 (C-2', 6'), 122.55 (C-3), 120.98 (C-1'), 115.08 (C-3', 5'), 106.07 (C-10), 99.83 (C-1"), 99.56 (C-6), 94.51 (C-8), 77.18 (C-5"), 76.40 (C-3"), 73.06 (C-2"), 69.58 (C-4"), 60.61 (C-6").

3'-Methoxypuerarin : White powder; mp 214-216°C; v_{max} (KBr) : 3380, 1615, 1586,

1508; UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 311 (3.78), 289 (3.98), 239 (4.15), 224 (sh 4.20); EI-MS *m/z* (%) 446; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.09 (1H, br s, 4'-OH), 8.40 (1H, s, H-2), 7.94 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 7.17 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6), 7.04 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.6 Hz, H-6'), 6.99 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.80 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 4.81 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-1"), 4.03 (1H, t-like, *J* = 9.2 Hz, H-2"), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.72 (1H, br d, *J* = 12.0 Hz, H-6"), 3.70 (1H, br d, *J* = 12 Hz, H-6"), 3.46 (1H, m, H-3"), 3.34 (1H, m, H-4"), 3.28 (1H, m, H-5"); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.84 (C-4), 161.18 (C-7), 156.08 (C-9), 152.89 (C-2), 147.17 (C-4'), 146.39 (C-3'), 126.21 (C-5), 123.00 (C-1'), 122.95 (C-3), 121.49 (C-6'), 116.80 (C-10), 115.15 (C-6), 113.02 (C-2'), 113.02 (C-5'), 112.62 (C-8), 81.86 (C-5"), 78.78 (C-1"), 73.43 (C-2"), 70.75 (C-3"), 70.51 (C-4"), 61.40 (C-6"), 55.62 (OCH₃).

Daidzin : Colorless needles; mp 235-237 °C; UV λ_{max} (MeOH) (log ε) : 306 (sh 3.70), 270 (4.23), 248 (4.40); EI-MS *m/z* (%) 416; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.56 (1H, s, OH-4'), 8.39 (1H, s, H-2), 8.05 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 7.41 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 7.23 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-8), 7.14 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.6 Hz, H-6), 6.82 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 5.45 (1H, d, *J* = 4.3 Hz, OH-2"), 5.17 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, OH-3"), 5.11 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1"), 4.62 (1H, t-like, *J* = 5.5 Hz, OH-6"), 3.72 (1H, m, H-6"), 3.47 (2H, m, H-5", 6"), 3.31 (2H, m, H-2", 3"), 3.17 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-4"); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.74 (C-4), 161.39 (C-7), 157.25 (C-4'), 157.02 (C-9), 153.33 (C-2), 130.08 (C-2', 6'), 126.95 (C-5), 123.69 (C-3), 122.30 (C-1'), 118.46 (C-10), 115.57 (C-6), 114.97 (C-3', 5'), 103.37 (C-8), 99.97 (C-1"), 77.20 (C-2"), 76.47 (C-3"), 73.12 (C-4"), 69.61 (C-5"), 60.62 (C-6").

Ononin : White powder; EI-MS m/z (%) 430; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.44

(1H, s, H-2), 8.06 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-5), 7.53 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 7.24 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-8), 7.15 (1H, dd, J = 2.4, 8.9 Hz, H-6), 7.00 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 5.46 (1H, s, OH-2"), 5.19 (1H, br s, OH-3"), 5.11 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1"), 4.62 (1H, t-like, J = 5.4 Hz, OH-6"), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.71 (1H, m, H-6"), 3.48 (2H, m, H-5", 6"), 3.32 (2H, m, H-2", 3"), 3.17 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-4"); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) $\delta : 174.64$ (C-4), 161.43 (C-7), 159.01 (C-4'), 157.03 (C-9), 153.62 (C-2), 130.06 (C-2', 6'), 126.93 (C-5), 123.95 (C-1'), 123.35 (C-3), 118.44 (C-10), 115.61 (C-6), 113.62 (C-3', 5'), 103.39 (C-8), 99.99 (C-1"), 77.20 (C-2"), 76.46 (C-3"), 73.61 (C-4"), 69.61 (C-5"), 60.62 (C-6"), 55.13 (OCH₃).





Fig. 3. Chemical structures of compounds isolated from the *n*-BuOH fraction.

3-4-1. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정은 MTT assay 방법으로 분석하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1.0 × 10⁴ 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하고, FBS-free DMEM으로 교환한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 100 μl의 MTT 용액(0.5 mg/ml in PBS)을 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 100 μl의 DMSO를 첨가하여 생성된 결정을 용 해시키고 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 100%로 하여 상 대적인 세포 독성을 평가하였으며, 결과는 mean ± standard deviation (*n*=3)으로 나타내었다.

3-4-2. LPS로 유도된 NO 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 well 당 1.0 × 10⁵ 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였다. FBS-free DMEM으로 교환하고, 다양한 농도의 시료를 2시 간 동안 전처리 한 후, LPS (1.0 μg/ml)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. NO 는 Griess reagent를 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하 였다. 세포 배양 상등액 100 μ를 취하여 96-well plate로 옮긴 후 Griess reagent 100 μl를 첨가하여 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite로 표준검량곡 선을 작성하여 nitrite의 농도를 계산하고, iNOS 억제제인 AMT를 대조군으로 사용하였다. 결과는 mean ± standard deviation (*n*=3)으로 나타내었다

3-4-3. Western blot을 통한 iNOS 및 COX-2 발현 분석

LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 양을 측정하기 위해서 RAW 264.7 세포 에 다양한 농도의 화합물을 2시간 동안 전처리 한 후, LPS (1.0 µg/ml)를 처리하 여 18시간 동안 배양하였다. 그 후 차가운 phosphate buffered saline (PBS)으로 2 회 세척하고 긁어낸 후 lysis buffer를 4℃에서 30분 동안 가하여 세포를 lysis 시켰다. 4℃에서 14,000 ×g로 20분간 원심분리 하여 세포 내 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 Bradford 방법으로 정량 하였다.

단백질을 gel buffer (Bio-Rad)와 혼합하고 5분간 끓여 변성시킨 후, 동량의 단 백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝나면 wet transfer system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 PVDF membrane으로 옮기고, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해서 membrane 을 blocking solution (5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20, pH 7.4 (TBST buffer))으로 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 membrane에 iNOS와 COX-2에 대한 항체 (1:1000 in TBST buffer)를 4℃에서 밤 새 반응시켰다. iNOS와 COX-2 발현 양은 HRP가 부착되어 있는 anti-rabbit IgG (1:2000 in TBST buffer)로 실온에서 1시간 반응 후 Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 확인하였다. 분자 량은 full-range rainbow molecular weight markers (Amersham)을 이용하여 확인하였 다. Western blotting data는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인 하였다.

3-4-4. t-BHP로 유도된 세포내의 ROS 측정

하나 또는 그 이상의 비공유 전자를 가지면서 독립적으로 존재할 수 있는 종류들을 유리기 (free radical)라고 하며, 이들은 정상적인 세포 또는 병리상태 의 세포의 이물질 대사 또는 이온화 조사를 통해 생성된다. 분자내 산소와 같 은 전자 수용체들이 이 유리기들과 즉각 반응하여 그 자신이 radical이 되는데 이들을 ROS라 한다.

지방 산화에 의한 생물학적 조직의 손상 정도를 측정하기 위해, 세포 배양 계에서 비형광 probe인 DCFH-DA를 이용하여 생물 세포의 활성 산소종을 직 접적으로 정량 측정하는 방법을 이용하는데, 이는 산화적 스트레스에 의해 발 생되는 초기 세포내 산화반응을 신속하게 측정할 수 있다 (Hempel *et al.*, 1999; Wang and Joseph, 1999). DCFH-DA는 안정한 비형광성 분자로 세포막에 쉽게 교 차 결합하며 세포내 존재하는 esterase에 의해 deacetylation되어 비형광성 환원 물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)가 형성되므로 (Fig. 4), 이 형광의 변화를 측정함으로써 세포내 활성 산소종 특히, ·O₂'의 초기 생성량을 정량할 수 있게 된다 (Lebel and Bondy, 1990). 그러나 DCFH-DA는 수용성 활성산소종에 대해서 는 특이성이 없기 때문이 그 사용에 다소 제한되는 문제가 있다 (Delia *et al.*, 1997).

RAW 264.7 세포를 96-well black plate에 well 당 2.0 × 10⁵ 세포가 되도록 분주 한 후 24시간 배양하였다. FBS-free DMEM으로 교환하고, 각각의 농도 별로 시 료를 처리하여 2시간 동안 배양하였다. 그 후 *t*-BHP (f.c. 200 μM)를 처리하고, DCFH-DA (20 μM)를 첨가하여 30분 동안 배양시킨 다음 산화된 DCF의 형광 강도를 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 excitation과 emission 파장 각각 485와 530 nm에서 측정하였다. 대 조군을 100%로 하여 상대적인 ROS 함량을 평가하였으며, 결과는 mean ± standard deviation (*n*=3)으로 나타내었다.

32



3-5. In vivo에서의 항염증 활성

갈근으로부터 분리한 화합물 중 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생 성과 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함으로써 항염증 활성을 가지는 것으로 나타난 lupenone과 lupeol이 *in vivo*에서 항염증 효과를 가지는지 확인하기 위하 여, 마우스에서 λ-CGN으로 유도된 발 부종 억제 활성을 평가하였다. Lupeol은 이전에 흰쥐에서 λ-CGN으로 유도된 발 부종을 억제한다고 보고된 바 있으나 (Nguemfo *et al.*, 2009), 본 실험에서는 마우스에서 lupenone의 활성과 비교 평가 하였다.

3-5-1. 마우스에서 λ-CGN으로 유도된 발 부종 억제 활성

In vivo에서의 항염증 활성을 평가하기 위하여, Winter et al. (1962)의 방법을 약간 변형하여 마우스에서 λ-CGN으로 유도된 발 부종을 측정하였다. 4주령의 수컷 ICR 마우스 (20g)를 Samtaco Bio Korea Ltd. (Korea)에서 구입하여 온도 (22 ± 2℃)와 상대습도 (50 ± 10%), 그리고 light:dark cycle이 12시간 간격이 되도록 조절되는 동물 사육실에서 7일 동안 정상사료와 물은 자유롭게 섭취되도록 하 면서 예비 사육하였으며, 체중이 27 ± 1 g이 되면 본 실험을 실시하였다. 7마리 씩 군을 나누어 DMSO에 녹인 화합물을 0.05 mL씩 복강투여 하고, 1시간 후 식염수에 녹인 1% CGN을 왼쪽 뒷발에 0.05 mL씩 투여하여 발 부종을 유발하 였다. 그 후 1,3,5 시간마다 plethysmometer (Ugo Basil, Italy)를 이용하여 부종의 부피를 측정하였으며, 처음에 화합물을 처리하지 않은 발의 부피보다 증가한 발의 부피를 부종으로 보았다. 대조군으로는 prednisolone을 사용하였다.

% inhibition of paw edema =

 $\frac{(\text{CGN-treated control group - test group)}}{(\text{CGN-treated control group - control group without CGN)}} \times 100$

3-6. 항산화 활성

갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 DPPH radical과 ONOO⁻ 소거 활성을 측정하여 항산화 활성을 평가하고, 분획물 중 수율과 항산화능이 높은 *n*-BuOH 분획물의 활성이 어떤 성분으로부터 기인한 것인지 확인하기 위하여 *n*-BuOH 분획물에서 분리된 화합물들 중 갈근의 주요성분인 puerarin과 이 유도 체인 3'-hydroxypuerarin, 3'-methoxypuerarin의 ONOO⁻, NO·, ·O₂⁻, 그리고 total ROS 소거 활성을 평가하였다. 또한 이들의 ONOO⁻ 소거 활성이 electron donation에 의한 것인지 아니면 tyrosine nitration 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 ONOO⁻로 유도된 tyrosine nitration의 억제 활성을 Western blot 방법으로 평가하 였다.

3-6-1. DPPH radical 소거 활성

DPPH radical 소거 실험은 광범위하게 쓰이는 간단하고 편리한 항산화 검색 법으로서, 특히 phenol과 aromatic amine 화합물의 항산화능 측정에 많이 사용 된다 (Blois, 1958). 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지는 홀수 전자 때문에 520 nm에서 특징적인 흡수 band도 사라지고 안정한 분자로 전환 된다. 즉, 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색 의 DPPH 색이 노란색으로 변하여 (Fig. 5) 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 관찰할 수 있다.

각 시료의 DPPH radical에 대한 소거능 측정은 각 농도별 시료 (1.25~320 μg/ml)를 MeOH에 녹여 160 μL씩 취하여 1.5 × 10⁴ M의 DPPH MeOH 용액 40 μL와 잘 혼합한다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC₅₀)를 계산하였다. 결

과는 mean ± S.E.M. (n=3)로 나타내었다.





Fig. 5. DPPH radical scavenging action of antioxidants [ArOH]. (Blois, 1958)



3-6-2. ONOO⁻ 소거 활성

ONOO⁻는 NO·와 ·O₂⁻가 반응하여 생성되는 것으로, NO·와 유사한 생리작용 을 가지며, 주요 생리 작용으로는 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanyl cyclase의 자극, tyrosine nitrarion 외에 lysine, protein의 methionine 잔기 의 산화 및 지질 과산화 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘 드리아에 의한 호흡 억제, membrane pump 억제, GSH의 고갈, ADP ribose synthase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해와 여러 만성 질환의 병변과 관련 됨이 보고되어 있다 (Althaus et al., 1994; Haenen et al., 1997; Lin et al., 1997). ONOO⁻는 다른 free radical에 비해 상대적으로 안정하지만, 생리적 pH에서 쉽 게 proton화 되어 반응성이 매우 높은 peroxynitrous acid (ONOOH)로 전환되는 데, 이 물질은 반감기 (1.9 s)가 매우 짧고, 여러 세포 독성 물질인 nitrogen dioxide, nitronium ion 및 hydroxyl radical의 전구체로 작용하여 oxidation, nitration, hydroxylation 반응을 유발한다 (Nonoyama et al., 1999). 그러나 세포내에서 ONOO⁻ 소거 활성에 관여하는 효소계가 없으므로, 그 소거활성물질을 찾는 것 이 더욱 중요하다 (Choi et al., 2002). 지금까지 보고된 천연 또는 합성의 ONOO⁻ 소거능을 갖는 물질로는 flavonoid (Choi et al., 2002), catechin, polyphenol (Van Dyke et al., 2000, Chung et al., 1998), ergothioneine (Auroma et al., 1999), defroxamine, urate, glutathione (Menconi et al., 1998), melatonin (Cuzzocrea et al., 1999) 그리고 D-(-)-penicillamine (Fici et al., 1997)이 있다.

ONOO⁻ 소거능은 Kooy *et al.* (1994)의 방법을 약간 변형하여 DHR 123의 산화 를 측정하였다 (Fig. 6). Dimethylformamide로 녹인 DHR 123 (5 mM)는 질소 충진 하여 -80℃에서 stock solution으로 저장하였다. 90 mm sodium chloride, 50 mM sodium phosphate, 5 mM potassium chloride로 조제한 buffer (pH 7.4)를 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 µM과 섞어, DHR 123의 최종 농도가 5 μM이 되도록 한다. 이 working solution에 시료와 authentic ONOO⁻를 첨가하면 5분 후, 비형광성의 DHR 123이 형광성의 rhodamine 123으로 바뀌게 된다 (Fig. 6). 이 형광물질을 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 excitation과 emission 파장 각각 480와 530 nm에서 측정하 였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 DHR 123 산화 저해 백 분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC₅₀)를 계산하였다. 결과는 mean ± S.E.M. (*n*=3)로 나타내었다.







3-6-3. NO·소거 활성

0

NO· 소거 활성은 Chung *et al.* (2001)의 방법을 약간 변형하여 특이적인 NO· 의 indicator인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)를 이용하여 측정하였다. Fig. 7에 나 타내었듯이, DAF-2는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO·를 포집하여, 490~495 nm의 excitation 파장에서 녹색 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. 따 라서 형광의 세기가 DAF-2에 의해 포집된 NO·의 양에 따라 달라지는 것을 통 해 NO· 소거 활성을 평가하였다. DAF-2 (4.5 mM)의 stock solution을 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 1/45 비율로 희석하여 사용하였고, NO· 제 공물질인 sodium nitroprusside (f.c. 2 mM) 역시 buffer에 녹여 사용하였고, NO· 제 이번 동안 상은에서 반응 후, 희석한 DAF-2 solution (f.c. 25 μ M)을 첨가하였다. DAF-2와 NO·의 반응에 의해 방출되는 형광물질을 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 excitation과 emission 파 장 각각 480와 530 nm에서 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 NO· 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC₅₀)를 계산하 였다. 결과는 mean ± S.E.M. (*n*=3)로 나타내었다.

ot u



Fig. 7. DAF-2T formation by reaction between NO and DAF-2.



3-6-4. Xanthine oxidase (·O₂⁻) 소거 활성

Xanthine oxidase (XOD)에 의해 xanthine으로부터 uric acid가 형성되는 과정 중 ·O₂⁻가 생성된다. 따라서 XOD의 활성을 측정함으로써 ·O₂⁻ 소거 활성을 평가 하였다 (Park *et al.*, 2008). 10% DMSO에 녹인 시료 50 µl와 350 µl의 xanthine (1.0 mM)을 혼합하여 실온에서 2분간 반응시키고, 400 µl의 XOD (50 mU/ml)을 첨가 하여 37℃에서 30분간 배양하였다. 이 때 xanthine과 XOD는 0.25 mM EDTA가 첨가된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 사용하였다. 배양 후 HCl (100 µl, 5.0 M)을 넣어 반응을 종료시키고, 생성된 uric acid를 UV/Visible spectrophotometer (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA)를 이용하여 파장 295 nm에서 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 XOD 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC₅₀)를 계산하였다. 결과 는 mean±S.E.M. (*n*=3)로 나타내었다.

3-6-5. Total ROS 소거 활성

수컷 Wistar rats (체중 150~200 g)의 신선한 kidney homogenate를 준비하고, 이 를 시료와 혼합하여 12.5 µM DCFH-DA의 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) solution과 함께 37℃에서 30분간 배양한다. 생성된 ROS는 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 excitation과 emission 파장 각각 480와 530 nm에서 각각 30 분간 측정하였다 (Lebel and Bondy, 1990). 형광 강도가 증가하지 않은 것은 실험한 물질이 활성 산소종을 소거하여, DCFH가 산화되지 않았으므로 항산화 물질임을 의미한다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 ROS 소거활성을 백분율로 나 타내고, 50% 저해 농도 (IC₅₀)를 계산하였다. 결과는 mean ± S.E.M. (*n*=3)로 나타 내었다.

3-6-6. ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration 억제 활성

0

3-Nitrotyrosine의 형성을 억제하는 능력은 Western blot 방법을 이용하여 평가 하였다. 10% ethanol에 녹인 시료 2.5 µl를 BSA (0.5 mg of protein/ml) 95 µl와 상은 에서 10분간 배양한 뒤, 2.5 µl의 ONOO⁻ (200 µM)를 첨가하여 상은에서 10분간 배양하였다. 준비된 시료 용액을 gel buffer (Bio-Rad)와 혼합하고 5분간 끓여 단 백질을 변성시킨 후 동량의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝나면 wet transfer system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 PVDF membrane으로 옮기고, 항체의 비특이적 결합을 억제 시키기 위해서 membrane을 blocking solution으로 1시간 동안 실온에서 배양하 였다. 그 후 membrane에 3-nitrotyrosine에 대한 항체 (1:2000 in TBST buffer)를 4℃에서 밤새 반응시켰다. 3-Nitrotyrosine의 발현 양은 HRP가 부착되어 있는 anti-mouse IgG (1:2000 in TBST buffer)로 실온에서 1시간 반응 후 Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 확인하였 다. 분자량은 full-range rainbow molecular weight markers (Amersham)을 이용하여 확인하였다. Western blotting data는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하였다.

1. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 평가

RAW 264.7 세포에 대한 세포독성은 MTT assay를 통해 측정하였으며, 이는 대조군에 대한 백분율로 값을 평가하였다.

1-1. 갈근 MeOH 추출물 및 각 분획물들의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 평가

RAW 264.7 세포에 대한 갈근의 MeOH 추출물과 이를 계통적 용매 분획하 여 얻은 각 분획물들의 세포독성은 Fig. 8에 나타내었다. 갈근의 MeOH 추출물 은 10, 50, 100 μg/ml에서 세포생존율이 각각 106.34 ± 0.61, 98.13 ± 3.68, 98.73 ± 2.14%로 나타남으로써 100 ug/ml 이하의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 판 단하였으며, 갈근에 함유된 성분들 중 RAW 264.7 세포에서 독성을 가지는 성 분을 예측하기 위하여 각 분획물들의 세포독성도 함께 평가하였다. 그 결과 n-hexane 분획물은 2 μg/ml에서 세포생존율이 100.55 ± 2.80%로 나타났으나, 10 과 50 μg/ml에서 각각 85.01 ± 3.89과 10.63 ± 0.09%의 세포생존율을 보였다. CH₂Cl₂ 분획물은 10 μg/ml에서 세포생존율이 103.59 ± 3.34%로 나타났으나, 50과 100 μg/ml에서 각각 85.04 ± 7.85와 59.92 ± 4.31%의 세포생존율을 보였다. 한편 EtOAc 분획물은 1.25 μg/ml에서 98.64 ± 7.49%의 세포생존율을 보여 그 이하의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 판단하였다. n-BuOH 분획물은 50, 100, 200 µg/ml에서 세포생존율이 각각 99.64 ± 0.23, 63.76 ± 1.33, 55.10 ± 6.54%로 나타남 으로써 50 μg/ml 이하의 농도는 세포생존에 영향을 미치지 않는 것으로 판단 하였으며, H₂O 분획물은 10, 50, 100 μg/ml에서 세포생존율이 각각 92.31 ± 3.11, 99.21 ± 2.08, 90.84 ± 0.18%로 나타남으로써 역시 50 μg/ml 이하의 농도는 세포독 성을 보이지 않는 것으로 판단하였다. 따라서 MeOH 추출물에 대한 각 분획물

들 중 *n*-hexane과 CH₂Cl₂ 분획물이 다른 분획물에 비해 낮은 농도에서 비교적 강한 세포독성을 나타내는 것으로 보아 갈근에 포함된 비극성 성분들이 세포 독성이 높을 것이라고 예상하였다.





Fig. 8. Effects of MeOH extract and its various solvent soluble fractions of *P. lobata* roots on LPS-induced nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells



Fig. 8. Effects of MeOH extract and its various solvent soluble fractions of *P. lobata* roots on LPS-induced nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of (A) MeOH extract, (B) *n*-hexane fraction, (C) CH_2Cl_2 fraction, (D) EtOAc fraction, (E) *n*-BuOH fraction, and (F) H_2O fraction of *P. lobata* roots for 2 h and LPS (1.0 µg/ml). After 18 h incubation, the amount of nitrite in the culture supernatants was measured by the Griess reaction assay, as described in the materials and methods. Cell viability was determined using MTT method. The data represent mean \pm STDEV of triplicate experiments

1-2. 갈근에서 분리된 화합물들의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 평가

갈근에서 분리된 화합물들의 세포독성은 Fig. 9에 나타내었다. n-Hexane 분획 물에서 분리된 coumestrol은 3.77 μM에서 50%의 세포생존율을 보여 비교적 세 포독성이 강한 것으로 판단되었다. Lupenone은 20, 50, 100 μM에서 세포생존율 이 각각 97.77 ± 1.80, 71.12 ± 3.07, 50.82 ± 2.27%로 나타난 반면, lupeol은 200 µM 에서도 세포생존율이 96.06 ± 1.70%로 나타남으로써 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성은 lupeol보다 lupenone이 더 강한 것으로 나타났다. 따라서 coumestrol 과 lupenone이 포함된 n-hexane 분획물이 세포독성을 나타낸 것으로 유추할 수 있다. 또한 EtOAc 분획물로부터 분리한 daidzein과 genistein은 10 μM에서 세포 생존율이 각각 100.98 ± 2.06과 96.68 ± 2.90%로 세포독성을 나타내지 않았으나, 50과 100 µM에서 daidzein은 각각 73.50 ± 1.98과 30.91 ± 2.10%, genistein은 각각 30.73 ± 0.76과 9.69 ± 0.38%의 세포생존율을 보임으로써 50 μM 이상의 농도에 서는 세포독성을 가지는 것으로 판단하였다. 반면, (+)-puerarol B-2-Oglucopyranoside는 100 μM에서 94.14 ± 8.90%의 세포생존율을 보여 그 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않는 것으로 평가하였다. 한편 n-BuOH 분획물 로부터 분리한 allantoin, daidzein 8-C-apiosyl (1→6) glucoside, daidzin, 그리고 genistin 모두 100 µM 이하의 농도에서 세포생존율에 영향을 미치지 않았다. 이들 결과를 통해 추후 RAW 264.7 세포를 이용한 in vitro 실험 계에서 각 화 합물들을 세포 생존에 영향을 미치지 않는 농도 내로 이용하였다.

49



Fig. 9. Effects of compounds isolated from *P. lobata* roots on LPS-induced nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells



Fig. 9. Effects of compounds isolated from *P. lobata* roots on LPS-induced nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells



Fig. 9. Effects of compounds isolated from *P. lobata* roots on LPS-induced nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells



Fig. 9. Effects of compounds isolated from *P. lobata* roots on LPS-induced nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of (A) daidzein, (B) genistein, (C) allantoin, (D) daidzein 8-*C*-apiosyl-(1 \rightarrow 6)-glucoside, (E) daidzin, (F) genistin, (G) lupenone, (H) lupeol, (I) (+)-puerarol B-2-*O*-glucopyranoside, and (J) coursetrol for 2 h and LPS (1.0 µg/ml). After 18 h incubation, the amount of nitrite in the culture supernatants was measured by the Griess reaction assay, as described in the materials and methods. Cell viability was determined using MTT method. The data represent mean ± STDEV of triplicate experiments. [#]P < 0.001 indicates significant differences from the unstimulated control group. ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, and ^{***}P < 0.001 indicate significant differences from the LPS-treated group.

Ó

2. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 효과

그람음성세균의 내독소로 알려진 LPS를 대식세포에 처리하면 NO, PGs, 염 증성 cytokines과 같은 다양한 물질들이 생성되어 염증반응을 조절하는 다양한 병리학적 반응이 유도된다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 실험 계에서 대식세 포의 염증반응을 유도하기 위해 LPS (1.0 μg/ml)를 RAW 264.7 세포에 첨가하여 이하의 실험을 진행하였으며, 생성된 NO는 Griess reagent을 이용하여 세포 배 양액 중에 존재하는 NO₂의 형태를 측정하였다.

2-1. 갈근의 MeOH 추출물 및 각 분획물들이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도 된 NO 생성에 미치는 효과

Fig. 8에 나타낸 것처럼, RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 증가된 NO의 생 성은 10, 50, 100 μg/ml의 갈근 MeOH 추출물의 전처리에 의해서 LPS 단독처리 군에 비해 각각 33.89 ± 5.62, 63.44 ± 3.31, 85.18 ± 3.60%씩 농도의존적으로 억제 되었다 (IC₅₀ = 31.80 μg/ml). *n*-Hexane 분획물은 세포생존에 영향을 미치지 않는 것으로 평가된 2 μg/ml에서 28.85 ± 2.19%의 억제율을 보였으며, 10 μg/ml 이상 의 농도에서는 세포독성을 나타내어 정확한 활성을 평가하기 어려웠다 (IC₅₀ = 5.88 μg/ml). CH₂Cl₂ 분획물은 세포독성을 가지지 않는 것으로 나타난 10 μg/ml 에서 NO 생성을 22.63 ± 9.50% 억제하였으며, 역시 그 이상의 농도에서는 세포 독성으로 인해 정확한 활성을 평가할 수 없었다 (IC₅₀ 30.26 μg/ml). 한편, EtOAc 분획물은 세포독성이 나타나지 않는 것으로 평가된 0.16, 0.31, 0.63, 그리고 1.25 μg/ml에서 NO 생성을 각각 53.62 ± 7.12, 70.91 ± 8.21, 72.95 ± 1.02, 그리고 94.41 ± 2.94%씩 억제함으로써 분획물들 중 가장 높은 NO 억제 활성을 나타내 었다 (IC₅₀ = 0.13 μg/ml). 반면, *n*-BuOH 분획물은 세포독성이 없는 것으로 나타 난 50 μg/ml에서 NO 생성을 32.26 ± 3.91% 억제하였으며, 그 이상의 농도에서 H₂O 분획물은 100 μg/ml에서도 세포독성은 가지지 않는 것으로 나타났으나, NO 억제 활성을 보이지 않았다. 이들 결과로부터 EtOAc 분획물이 NO 생성을 억제하는 데 가장 효과적이며, 이 분획물에 NO 억제능이 뛰어난 활성성분이 포함되어 있을 것으로 예상하였다. 그러나 EtOAc 분획물에 함유된 daidzein 및 genistein의 항염증 특성은 이미 알려져 있으며 (Sheu *et al.*, 2001; Jun *et al.*, 2005), EtOAc 분획물이 이들 활성성분에 의해 NO 억제 활성을 나타낸 것으로 생각 되어 본 연구는 다른 분획물로부터 새로운 항염증 활성성분을 찾고자 하였다. 따라서 세포독성이 나타나지 않는 농도 내에서 NO 억제능이 좋으면서 EtOAc 분획물보다 수율이 높은 *n*-hexane 분획물에 포함된 성분의 항염증 활성에 초 점을 두고 연구를 진행하였으며, 이들 성분은 비교적 비극성이 강할 것으로 예상하였다.

2-2. 갈근에서 분리된 화합물들이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성 에 미치는 효과

같근에서 분리된 화합물들이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 효과는 Fig. 9에 나타내었다. 극성의 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물에 다량 함유되어 있을 것으로 예상된 daidzein, genistein, 그리고 puerarin과 같은 isoflavonoids는 항염증과 항산화 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다 (Sheu *et al.*, 2001; Jun *et al.*, 2005). 예상한 바와 같이, EtOAc 분획물에서 분리된 daidzein 과 genistein은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성을 각각 8.05과 8.08 µM의 IC₅₀ 값을 가짐으로써 강력하게 억제하였다. 그러나 *n*-BuOH 분획물 에서 분리된 allatoin, daidzein 8-C-apiosyl-(1→6)-glucoside, daidzin, 그리고 genistin 은 세포내 NO 생성에 대해 각각 153.96, 87.98, 100.03, 그리고 109.34 µM의 IC₅₀ 값을 가지며 비해 비교적 약한 억제 활성을 보였다. 반면, EtOAc 분획물로부터 분리된 (+)-Puerarol B-2-*O*-glucopyranoside는 100 µM에서도 세포의 NO 생성을 억제하지 않았다. 따라서 EtOAc 분획물 다음으로 높은 세포의 NO 억제 활성 을 보인 n-hexane 분획물에서 분리된 성분들에 대한 항염증 활성을 평가하고 자 하였다. n-Hexane 분획물로부터 얻은 coumestrol은 세포독성이 나타나지 않 는 1 μM에서 24.76 ± 3.57%의 NO 억제율을 보였지만, 5 μM 이상에서는 세포독 성으로 인해 정확한 활성을 평가할 수 없었다. 반면 lupenone을 세포독성을 보 이지 않는 5, 10, 20 μM의 농도로 전처리한 결과 NO 생성을 각각 31.95 ± 2.90, 47.25 ± 5.36, 81.00 ± 3.55%씩 농도 의존적으로 억제하였다 (IC₅₀ = 10.81 μM). Lupeol 역시 세포독성이 나타나지 않는 50, 100, 200 µM 농도로 전처리한 결과 세포내 NO 생성을 각각 44.29 ± 5.49, 63.77 ± 5.37, 76.63 ± 3.36% 식 농도 의존적 으로 억제하였다 (IC₅₀ = 64.65 μ M). 따라서 lupenone과 lupeol은 같은 lupane-type triterpenes이지만 C-3 위치에 ketone group을 가지는 lupenone이 hydroxyl group을 가지는 lupeol보다 RAW 264.7 세포에서 독성은 더 강하지만, 세포독성이 나타 나지 않는 농도 내에서 lupeol 보다 약 6배 높은 NO 억제 활성을 가지는 것을 확인하였다. 종합해보면, lupenone과 lupeol 모두 각각 세포생존율에 영향을 미 치지 않는 농도 내에서 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하며, n-hexane 분획 물의 세포내 NO 생성 억제 효과가 이 두 lupane-type triterpenes의 활성에서 기 인한 것으로 유추할 수 있다.

3. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

갈근 *n*-hexane 분획물로부터 분리된 lupenone과 lupeol의 RAW 264.7 세포에 서 LPS로 유도된 NO 억제 활성이 어떤 경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 iNOS 및 COX-2의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였으며, 이는 Fig. 10에 나타내었다. 3-1. Lupenone과 lupeol이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS (1.0 μg/ml)를 처리함으로써 iNOS와 COX-2의 발현이 급격히 증가되었으며, LPS를 처리하지 않은 세포에서는 이들 단백질이 발현되 지 않았다. 따라서 lupenone 및 lupoel을 각각 세포생존율에 영향을 미치지 않 는 농도 이하로 2시간 동안 전처리 한 후 LPS로 iNOS와 COX-2의 생성을 유 도하여 이들의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

Fig. 10에서 볼 수 있듯이, lupenone은 10과 20 μM에서 iNOS의 발현을 농도의 존적으로 저해하였으며 20 μM에서는 COX-2의 발현도 함께 억제되었다. 한편, 50과 100 μM의 lupeol에 의해 iNOS의 발현이 농도 의존적으로 억제되었지만, COX-2의 발현은 변화가 없었다. 이와 같은 결과는 RAW 264.7 세포에서 lupenone (20 μM)이 세포생존에 영향을 미치지 않는 농도에서 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 저해함으로써 NO 생성을 억제한다는 것을 나타낸다. 또한 lupeol (100 μM) 역시세포독성을 나타내지 않는 농도에서 LPS로 유도된 NO 생성을 억제하며, 이는 iNOS 발현의 억제에서 기인한 것이라고 유추할 수 있다. 즉 RAW 264.7 세포에서 lupenone의 경우 iNOS와 COX-2 발현 모두 저해 함으로써 강력한 NO 억제 활성을 가지며, lupeol의 NO 억제 활성은 COX-2 보 다 iNOS의 발현 억제에 의해 나타나는 것이라고 판단되었다.

더불어 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 억제 활성이 미비하지만 수 율 면에서 뛰어난 *n*-BuOH에서 분리된 allantoin, daidzein 8-*C*-apiosyl-(1→6)glucoside, daidzin, 그리고 genistin의 효과도 함께 평가한 결과, allantoin은 100 µM에서 iNOS와 COX-2의 발현을 미약하게 저해하였지만, 나머지 화합물들은 50 µM에서 iNOS와 COX-2의 발현 모두에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 10).

한편, 갈근으로부터 분리된 양이 미량이거나 NO 생성 억제 활성이 좋지 않 은 화합물, 그리고 세포 독성이 강하게 나타나는 화합물에 대한 평가는 수행 하지 않았다.







Cells were pretreated with the indicated concentrations of compounds for 2 h and LPS (1.0 μ g/ml) for 16 h. Cytosolic lysates were separated on SDS-PAGE. iNOS, COX-2, and β -actin were detected by Western blot analysis.

4. RAW 264.7 세포에서 t-BHP로 유도된 ROS 생성에 미치는 효과

ROS는 cyclooxygenase와 lipooxygenase로 매개된 arachidonic acid에서 염증성 매개체로의 전환에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Backhouse *et al.*, 1994). 따라서 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성을 가지는 것으로 확인된 lupenone과 lupeol이 세포내 ROS 생성에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여, RAW 264.7 세포에서 *t*-BHP로 유도된 ROS 생성에 대한 억제 활성을 평가하였다 (Fig. 11). RAW 264.7 세포에 *t*-BHP를 처리함으로써 ROS의 생성이 증가되었으 며, lupenone을 5, 10, 20 µM로 전처리한 결과 ROS 억제율이 각각 18.36, 16.71, 17.86%로 나타남으로써 유의적인 억제 활성을 보이지 않았고, 그 이상의 농도 에서는 세포독성으로 인해 정확한 활성을 평가하기 어려웠다. 반면 lupeol은 20, 50, 100, 200 µM에서 세포내 ROS 생성을 각각 18.12, 38.26, 46.43, 62.28%씩 농도 의존적으로 억제하였다 (IC₅₀ = 122.48 µM).




Fig. 11. Effects of lupenone and lupeol on *t*-BHP-induced ROS generation in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of (A) lupenone, and (B) lupeol for 2 h and treated with *t*-BHP (200 μ M) to induce ROS generation and DCFH-DA (20 μ M) for 30 min. The data represent mean ± STDEV of triplicate experiments. [#]P < 0.001 indicates significant differences from the unstimulated control group. ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, and ^{***}P < 0.001 indicate significant differences from the *t*-BHP-treated group.

5-1. 마우스에서 λ-CGN으로 유도된 뒷발 부종에 대한 lupenone과 lupeol의 억 제 활성

마우스에서 λ-CGN에 의해 유도된 발 부종에 대한 lupenone과 lupeol의 효과 는 Table 1에 나타내었다. 마우스의 왼쪽 뒷발에 CGN을 투여하고 1, 3, 5 시간 이 경과한 후 왼쪽 뒷발의 부피가 CGN을 투여하지 않은 group (0.133 ± 0.005 mL)에 비해 각각 0.087 ± 0.020, 0.127 ± 0.014, 0.137 ± 0.023 mL씩 증가됨으로써 시간에 따라 부종이 유도되는 것을 확인하였다. 대조군으로 사용한 prednisolone (20 mg/kg)은 CGN을 투여하고 1, 3, 5 시간이 경과했을 때 부종 억 제율이 각각 51.92, 43.42, 40.98%로 나타나 CGN으로 유도된 뒷발 부종을 유의 적으로 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 lupenone과 lupeol 모두 20 mg/kg 농 도로 복강 투여하고 CGN 투여 후 1 시간이 경과했을 때 각각 15.38과 11.54% 의 부종 억제율을 나타냄으로써 유의적인 억제 활성을 보이지 않았다. 또한 CGN 투여 후 3 시간과 5 시간 후에 lupenone (20 mg/kg)은 부종 억제율이 각각 13.16과 13.17%, lupeol (20 mg/kg)은 5.26과 10.98%로 나타남으로써 부종을 미약 한 수준으로 억제하는 것으로 판단되었다. 특히 lupeol은 Nguemfo et al. (2009) 에 의해 흰쥐에서 부종을 유의적으로 억제한다고 보고된 것과 달리 마우스에 서는 미약한 활성을 보였다. 따라서 이는 마우스가 흰쥐에 비해 발 부종 부피 가 작아 변이가 크게 나타나며 계통간의 차이도 있을 것으로 판단되어 추후 더 정확한 평가를 위해 흰쥐를 이용한 in vivo 실험이 필요할 것으로 사료된다.

	Doses (mg/kg)	1 h		3 h		5 h		
Compounds		Increased paw volume	%	Increased paw volume	%	Increased paw volume	%	
		(mL)	Inhibition	(mL)	Inhibition	(mL)	Inhibition	
CGN	-	0.087 ± 0.020		0.127 ± 0.014		0.137 ± 0.023		
Prednisolone	20	0.042 ± 0.007	51.92	0.072 ± 0.007	43.42	0.081 ± 0.009	40.98	
Lupenone	10		AT	0.122 ± 0.007	3.95	0.121 ± 0.005	11.71	
	20	0.073 ± 0.006	15.38	0.110 ± 0.006	13.16	0.119 ± 0.008	13.17	
Lupeol	10	120	/ /	0.123 ± 0.006	2.63	0.125 ± 0.015	8.78	
	20	0.077 ± 0.017	11.54	0.120 ± 0.006	5.26	0.122 ± 0.015	10.98	

Table 1. Effects of lupenone and lupeol on λ -carrageenan (CGN)-induced paw edema in mice

All compounds were intraperitoneally (i.p) administered (n=5). The data represent mean \pm STDEV of triplicate experiments. The paw volume of the untreated control group was 0.133 ± 0.005 mL.



6. 갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 항산화 활성

6-1. 갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 DPPH radical 소거 활성

같근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 DPPH 소거 활성을 측정하여 50% DPPH radical 소거 활성을 나타내는 IC₅₀ 값 (μg/ml)으로 나타내었으며, 그 결과 를 Table 2에 나타내었다. MeOH 추출물과 분획물들의 DPPH radical 소거 활성 에 대한 IC₅₀ 값 (μg/ml)은 EtOAc 분획물 (7.90) > CH₂Cl₂ 분획물 (31.05) > *n*-BuOH 분획물 (41.55) > MeOH 추출물 (83.30) 순으로 나타났으며, *n*-hexane과 H₂O 분획물은 실험 농도 (200 μg/ml) 내에서 유의적인 DPPH radical 소거 활성 이 나타나지 않았다. 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid는 4.6 μg/ml에서 50%의 DPPH radical을 소거하였다. 따라서 DPPH radical 소거 활성을 가지는 MeOH 추 출물에 대한 각 분획물들 중 높은 활성을 나타낸 EtOAc 분획물에 DPPH radical 소거 활성물질이 다량 함유되어 있으며, 이 물질은 다소 극성을 가진 물질임을 유추할 수 있다.

6-2. 갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 ONOO⁻ 소거 활성

갈근의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 ONOO⁻ 소거 활성은 50% ONOO⁻ 소 거 활성을 나타내는 IC₅₀ 값 (µg/ml)으로 나타내었으며, 그 결과는 Table 2에 제 시하였다. MeOH 추출물과 분획물의 ONOO⁻ 소거 활성에 대한 IC₅₀ 값 (µg/ml) 은 EtOAc 분획물 (37.31) > *n*-BuOH 분획물 (54.69) > MeOH 추출물 (58.61) > 순 으로 나타났으며, *n*-hexane, CH₂Cl₂, 그리고 H₂O 분획물은 실험 농도 (100 µg/ml) 내에서유의적인 ONOO⁻ 소거 활성이 나타나지 않았다. 대조군인 Lpenicillamine은 2.77 µg/ml에서 50%의 ONOO⁻ 소거율을 보였다. 따라서 ONOO⁻ 소거 활성을 가지는 MeOH 추출물에 대한 각 분획물들 중 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물이 비교적 높은 ONOO⁻ 소거 활성을 나타내는 것으로 보아 ONOO⁻ 소 거 활성물질은 이 두 분획물에 존재하며, 다소 극성을 가진 물질임을 유추할 수 있다.



	IC ₅₀ (μg/ml)					
_	DPPH			ONO0 ⁻		
MeOH ext.	83.30	±	0.27	58.61	±	1.36
<i>n</i> -Hexane fr.		>	200		>	100
CH ₂ Cl ₂ fr.	31.05	±	0.10		>	100
EtOAc fr.	7.90	±	0.11	37.31	±	1.78
n-BuOH fr.	41.55	±	0.04	54.69	±	3.09
H ₂ O fr.		>	200		>	100
L-Ascorbic acid ^a	4.6	±	0.03			
L-Penicillamine ^b		~	AL A	2.77	±	0.13

11 10

 Table 2. DPPH radical and ONOO⁻ scavenging activities of the MeOH extract and its various solvent soluble fractions of *P. lobata* roots

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, ONOO : peroxynitrite.

 a^{-b} were used positive controls on DPPH and ONOO⁻ scavenging activities.

H.

Values are mean ± S.E.M. of triplicate experiments.

6-3. n-BuOH 분획물에서 분리된 puerarin derivatives의 항산화 활성

갈근 MeOH 추출물의 각 분획물들 중 가장 높은 항산화 활성을 가지는 것 으로 나타난 EtOAc 분획물에 포함된 성분들 중 daidzein과 genistein은 이미 항 산화 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다 (Sheu et al., 2001). 따라서 EtOAc 분 획물 다음으로 항산화 활성이 높으면서 수율면에서도 뛰어난 n-BuOH 분획물 로부터 분리된 성분들 중 아직 항산화 활성에 대해 보고된 바가 없으며 갈근 의 주요성분인 puerarin의 유도체인 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin의 ONOO⁻, NO⁻, ·O₂⁻, total ROS 소거 활성을 측정하여 항산화 활성을 평가하였고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. Puerarin은 ONOO 에 대해서만 21.2 µM의 IC50 값을 가짐으로써 소거 활성을 보였으며, 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin 은 각각 1.36과 1.94 μM의 농도에서 ONOO 를 50% 소거함으로써 puerarin보다 약 20배 높으면서 대조군으로 사용한 L-penicillamine (IC₅₀ = 6.82 μM)보다 높은 소거 활성을 나타내었다. 특히 3'-hydroxypuerarin은 NO·와 total ROS에 대해 각 각 1.13과 6.51 μM의 IC₅₀ 값을 가지며 각각 대조군으로 사용한 carboxy-PTIO (IC₅₀ = 1.05 μM), trolox (IC₅₀ = 6.59 μM)와 유사한 활성을 보였다. 반면 ·O₂⁻에 대 해서는 211.66 µM의 IC₅₀ 값을 가지는 약한 소거능을 보였다. 한편 3'methoxypuerarin은 NO·와 ·O₂ 에 대해 각각 68.43과 247.35 μM의 IC₅₀ 값을 가짐 으로써 약한 소거 활성을 나타내었으며, total ROS에 대해서는 실험 농도 (179.37 µM) 내에서 유의적인 소거 활성을 보이지 않았다. 이를 통해 3'hydroxypuerarin은 NO· 소거에 의해 ONOO 소거 활성을 나타낸 것이라고 유 추할 수 있으며, 3'-methoxypuerarin은 ONOO⁻ 소거 활성이 NO· 또는 ·O₂⁻ 소거 에 의해서라기 보다 tyrosine nitration 억제와 같은 다른 메커니즘에 의해 나타 났을 것이라 예상하였다. 또한 3'-hydroxypuerarin이 C-3' 위치에 hydroxyl group 을 가짐으로써 전자나 수소를 제공하거나 전자 쌍을 받기 쉬워 free radical 소 거 활성을 증진시킨다는 사실을 확인하였다.

Compounds	IC ₅₀ (µM)					
Compounds	ONOO ⁻	NO·	$\cdot \mathbf{O}_2^-$	ROS		
Puerarin	21.2 ± 3.07	> 120.19	297.37 ± 0.38	> 192.31		
3'-Hydroxypuerarin	1.36 ± 0.14	1.13 ± 0.05	211.66 ± 0.47	6.51 ± 0.42		
3'-Methoxypuerarin	1.94 ± 0.31	68.43 ± 1.25	$247.35 \hspace{0.1 in} \pm \hspace{0.1 in} 0.38$	> 179.37		
L-Penicillamine ^a	6.82 ± 0.74	- V				
Carboxy-PTIO ^b		1.05 ± 0.14				
Allopurinol ^c			24.08 ± 0.10			
Trolox ^d			ŝ	6.59 ± 0.22		

Table 3. Antioxidant activities of puerarin derivatives isolated from the *n*-BuOH fraction of *P. lobata* roots

ONOO⁻: peroxynitrite, NO⁻: nitric oxide, $\cdot O_2^-$: super oxide, ROS: reactive oxygen species.

 a^{-d} were used positive controls on ONOO⁻, NO⁺, O⁻₂, and total ROS scavenging activities, respectively.

Values are mean ± S.E.M. of triplicate experiments.

6-4. *n*-BuOH 분획물에서 분리된 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin의 ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration 억제 활성

ONOO⁻ 소거는 electron donation과 nitration 억제에 의한 두 가지 메커니즘이 있다. 따라서 *n*-BuOH 분획물에서 분리된 3'-hydroxypuerarin과 3'methoxypuerarin의 ONOO⁻ 소거 활성이 어떤 메커니즘에 의해 나타난 것인지 확인하기 위하여 tyrosine nitration에 대한 억제 효과를 Western blot 방법을 통해 평가하였다 (Fig. 12). Protein (BSA)과 ONOO 의 반응으로 3-nitrotyrosine이 생성 되었으며, 6.25, 12.5, 25 µM의 3'-hydroxypuerarin에 의해 3-nitrotyrosine의 생성이 강력하게 억제되었다. 3'-Methoxypuerarin 역시 12.5와 25 μM에서 농도 의존적으 로 3-nitrotyrosine을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 3'-hydroxypuerarin과 3'methoxypuerarin 모두 ONOO 에 의한 nitration 억제를 통해 ONOO 소거 활성 을 가지는 것으로 확인되었다.



Nitrotyrosine		•	-	-	-	
ONOO ⁻ (200 μM)	_	+	+	+	+	
3'-Hydroxypuerarin (µM)	_	_	6.25	12.5	25	



Fig. 12. Effects of 3'-hydroxypuerarin and 3'-methoxypuerarin on the nitration of BSA by ONOO⁻.

A mixture of compound and BSA was incubated at 25 °C for 10 min. After ONOO⁻ was incubated at 25 °C for 10 min; this reactant was resolved by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gel.

염증반응은 외부항원에 의해 활성화된 다양한 면역세포들에 의해 매개되는 복잡한 과정이다 (Iontcheva *et al.*, 2004). 염증반응은 급성과 만성으로 나눌 수 있는데, 급성 염증은 즉각적으로 조직손상을 유발하게 되며, 만성 염증은 급성 염증보다 오래 걸리고 지속적이며 대식세포(macrophages), 단핵구(granulocytes), 림프구(lymphocytes), 혈장세포 등의 침윤을 동반한다 (Kumar *et al.*, 2005; Morson, 1980; Cline, 1970).

Macrophages는 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로써 동물체 내 모든 조직에 존재하며 외부 이물질을 탐지하고 포식하여 죽은 세포를 제거하는 포식작용 (phagocytosis)과 염증성 cytokines (TNF-α, IL-a, IL-6), ROS, NO, ·O₂⁻ 등과 같은 염증 매개물질을 다량 분비하는 염증세포이다 (Boscá et al., 2005; 1992; Turini and BuBois, 2002). Macrophages는 LPS와 같은 Nathan. 염증유발물질에 의해 활성화되며 (Iontcheva et al., 2004), 활성화된 macrophages로부터 분비되는 각종 염증 물질들은 염증반응을 유발하여 기관지 천식, 기관지염, 류마티스 관절염, 동맥경화증, 그리고 알츠하이머 병이나 파킨슨 병과 같은 퇴행성 뇌질환과 뇌졸중, 바이러스 감염 등의 발병에 관여한다 (Abreu and Arditi, 2004; Hanada and Yoshimura, 2002). 따라서 최근에는 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가되는 각종 염증 물질들을 효과적으로 감소시킬 수 있는 항염증제제 및 치료보조제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 한약재나 식품원료로부터 유래되는 생리활성 성분이 염증 치료를 위한 표적물질이 되고 있다.

Daidzein, genistein과 같이 *Pueraria* sp.에 포함된 isoflavonoids는 강력한 항염증 및 항산화 활성성분이라고 보고되어 있으나 (Sheu *et al.*, 2001; Jun *et al.*, 2005), 갈근으로부터 분리된 성분들의 항염증 및 항산화 활성에 대한

체계적인 연구는 아직 되어있지 않다. 본 실험에서는 갈근의 항염증 효능을 확인하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현, 그리고 *t*-BHP로 유도된 ROS 생성에 대한 억제 활성을 평가하였으며, 항산화 효능을 확인하기 위하여 DPPH, ONOO⁻, NO⁻, ·O₂⁻, 그리고 total ROS 소거 활성뿐만 아니라 ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration 억제 활성을 평가하였다.

Scheme 1에 나타낸 것과 같이 갈근의 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 n-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH, 그리고 H₂O 분획물을 얻었다. 이들 중 n-hexane과 EtOAc 분획물이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 대해 각각 5.88과 0.13 µg/ml의 IC50 값을 가지며 높은 억제 활성을 보였다 (Fig. 8). 항산화 평가에서는 EtOAc와 n-BuOH 분획물이 DPPH radical에 대해 각각 7.90과 37.31, 그리고 ONOO⁻에 대해 40.32와 54.69 µg/ml의 IC₅₀ 값을 가지며 다른 분획물에 비해 높은 소거 활성을 나타내었다 (Table 2). 종합해보면, EtOAc 분획물은 항염증과 항산화 활성 모두 나타내며, n-hexane 분획물은 항염증, 그리고 n-BuOH 분획물은 항산화 활성을 가지는 선택적인 활성을 보였다. 갈근 MeOH 추출물 및 각 분획물들의 상대적인 억제 효능은 그들의 구성 성분의 차이로 설명할 수 있다. Daidzein, genistein, 그리고 puerarin과 같은 isoflavonoids는 극성의 EtOAc와 n-BuOH 분획물에 다량 함유되어 있을 것으로 예상되며, 이들은 항염증과 항산화 활성에 기여하는 것으로 잘 알려져 있다 (Sheu et al., 2001; Jun et al., 2005). 보고된 바와 같이 갈근 EtOAc 분획물에서 분리된 daidzein과 genistein은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성을 8.05와 8.08 μM의 IC₅₀ 값을 가지며 유의적으로 억제하였다 (Fig. 9). 그러나 Fig.9에 나타내었듯이, n-BuOH 분획물에서 분리된 allatoin, daidzein 8-C-apiosyl-(1→6)-glucoside, daidzin, 그리고 genistin은 NO 생성에 대해 약한 억제 활성을 보였다 (IC₅₀ = 각각 153.96, 87.98, 100.03, 그리고 109.34 µM). 반면, EtOAc

분획물에서 분리된 (+)-Puerarol B-2-O-glucopyranoside는 100 µM에서도 NO 생성을 유의적으로 억제하지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 9). 따라서 본 연구에서는 갈근의 n-hexane 분획물에 대한 항염증과 n-BuOH 분획물에 대한 항산화 활성을 평가하였다. n-Hexane 분획물에 대해 column chromatography를 반복적으로 실시하여 lupenone, lupeol, puerarol, coumestrol, 그리고 glyceryl-1tetracosanoate를 분리하였다. 이 화합물들 중에서, lupeone은 아직 항염증 활성에 대해 알려져 있지 않으며, lupeol은 항염증 활성은 보고되어 있으나 (Margareth and Miranda, 2009; Mohammad, 2009), LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 항염증 메커니즘에 대해 자세히 연구된 바가 없다. 따라서 lupenone과 lupeol의 세포내 항염증 효능을 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성과 iNOS 및 COX-2 발현, 그리고 t-BHP로 유도된 ROS 생성에 대한 억제 활성으로 평가하였다. 또한 정확한 항염증 효능을 평가하기 위해, RAW 264.7 세포에 대한 각 성분들의 세포독성을 MTT assav를 통해 확인하였다. Fig. 9에 나타낸 것처럼, lupenone과 lupeol은 각각 20과 200 µM의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 각각 세포독성에 영향을 미치지 않는 농도를 사용하여 이들의 항염증 활성이 세포독성 효과에 의한 것이 아니라는 사실을 확인하였다. Lupenone과 lupeol은 NO 생성에 대해 각각 10.81과 64.65 μM의 IC₅₀ 값을 가짐으로써 세포 독성을 나타내지 않는 농도 내에서 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, C-3에 ketone group을 가지는 lupenone이 hydroxyl group을 가지는 lupeol보다 더 높은 NO 억제 활성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 lupane-type triterpene 골격에서 ketone group의 존재가 NO 생성을 억제하는 데 더 효과적이라고 유추할 수 있다. 한편 lupenone과 lupeol의 NO 억제 활성이 어떤 경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 iNOS 및 COX-2의 발현 억제를 Western blot 방법으로 확인하였다. 그 결과, lupenone은 20 μM에서 iNOS와 COX-2 발현 모두 저해하였으며, lupeol은 50과 100 μM에서

iNOS의 발현을 농도 의존적으로 저해하였지만 COX-2의 발현은 100 μM에서도 변화가 없었다 (Fig. 10). 이를 통해 lupenone은 iNOS와 COX-2의 발현 억제를 통해, 그리고 lupeol은 iNOS보다는 COX-2의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제하며, 결과적으로 이들은 iNOS 및 COX-2와 같은 유전자 수준에서 염증을 억제하는 것으로 유추할 수 있다. 이와 같이 항염증 활성을 가지는 것으로 확인된 lupenone과 lupeol이 염증 매개체들의 분비 및 발현에 영향을 미치는 ROS 생성에는 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에서 t-BHP로 유도된 ROS 생성에 대한 억제 활성을 평가하였다. 그 결과, Fig. 11에 나타낸 것과 같이 lupenone (5~20 µM)은 ROS 생성에 대해 유의적인 억제 활성을 보이지 않았지만, lupeol은 122.48 μM의 IC₅₀ 값을 가지며 농도 의존적인 억제를 나타내었다. 이 결과는 C-3 위치에 hydroxyl group을 가지는 lupeol이 세포내 ROS 생성을 억제하는 데 더 중요한 구조임을 시사한다. 한편, 항산화 활성을 가지는 n-BuOH 분획물에 대하여 column chromatography를 반복 실시함으로써 allatoin, 3'-hydroxypuerarin, daidzein 8-C-apiosyl-(1→6)-glucoside, puerarin, genistin, 3'-methoxypuerarin, daidzin, 그리고 ononin을 분리하였다. 이 화합물들 중에서 아직 항산화 효능이 알려져 있지 않은 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin, 그리고 이들 구조의 골격이 되는 puerarin의 항산화 활성을 검증하기 위하여 ONOO⁻, NO⁻, ·O₂⁻, total ROS 소거 활성을 비교 평가하였다. 그 결과 3'-hydroxypuerarin (IC₅₀ = 1.36 μ M)과 3'-methoxypuerarin (IC₅₀ = 1.94 μ M)은 puerarin (IC₅₀=21.2 μM) 보다 뛰어난 ONOO⁻ 소거 활성을 보였으며, NO·와 total ROS 소거 활성에서는 3'-hydroxypuerarin (NO·, IC₅₀ = 1.13 μM; total ROS, IC₅₀ = 6.51 μ M)°] 3'-methoxypuerarin (NO·, IC₅₀ = 68.43 μ M; total ROS, IC₅₀ > 179.37 μ M) 보다 높은 활성을 보였다. 단백질의 nitration은 산화적 스트레스에 대한 생물학적 마커로서 중요한 역할을 하며 3-nitrotyrosine은 단백질 (BSA)과 ONOO⁻의 반응에 의해 생성되기 때문에, ONOO⁻로 매개된 tyrosine nitration에

대한 puerarin 유도체들의 억제 활성을 3-nitrotyrosine 항체를 이용해 Western blot 방법으로 평가하였다. 그 결과 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin (6.25~25 µM)이 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 12). 따라서 3'-hydroxypuerarin이 C-3'에 있는 hydroxyl group의 electron donation과 tyrosine nitration의 억제에 의해 ONOO⁻에 대한 강력한 소거 활성을 가지는 반면, 3'-methoxypuerarin은 C-3'에 있는 methoxyl group에 의해 electron donation은 어렵지만 tyrosine nitration을 억제함으로써 ONOO⁻를 소거한다는 것을 유추할 수 있다. 다시 말해, puerarin 구조에 있는 3'-hydroxyl group의 존재가 ONOO⁻, NO⁻, 그리고 total ROS의 소거뿐만 아니라 ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration 억제 메커니즘에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

종합해보면 본 연구는 항염증 및 항산화 활성성분을 함유한 갈근이 여러 염증성 질환과 산화적 스트레스와 관련된 질환을 예방하고 치료하기 위한 기능성 식품으로 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다 (Fig. 13).





Fig. 13. Plausible multifunctional actions of *P. lobata* roots in inflammatory pathways.



지금까지 이루어진 NO 억제제의 탐색 연구는 NO가 발현되는 세포주를 이 용하는 실험으로 특히, 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리 하면 염증 매개물질의 최종 산물인 NO가 증가하게 되는데, 이는 주로 iNOS 염증 매개 효소에 기인하는 것으로 NO 억제 활성 검색에 유용한 것으로 사료 된다. 이에 본 연구에는 갈근의 MeOH 추출물 및 이를 계통적 용매 분획하여 얻은 각 분획물, 그리고 이들로부터 분리된 다양한 화합물들의 항염증 효과를 조사하기 위하여 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성의 변화를 평가 하였다. 특히 갈근으로부터 분리한 여러 화합물 중 아직 항염증 효과에 대한 연구가 미비한 lupane-type triterpenes인 lupenone과 lupeol이 세포에서의 NO 생 성과 iNOS 및 COX-2의 발현, 그리고 ROS 생성에 어떤 차이를 보이는지에 초 점을 두고 관찰하였다. 그 결과 lupenone이 더 낮은 농도에서 강한 세포 독성 을 보이기는 했지만, lupenone과 lupeol 모두 각각 세포 생존에 영향을 미치지 않는 농도 내에서 LPS로 유도된 NO 생성을 억제하였다. 그리고 lupenone에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 억제가 NO의 생성 억제와 유사한 경향을 나타냄 으로써 NO 생성 억제가 iNOS와 COX-2의 발현 저해를 경유한 것임을 알 수 있었다. 반면 lupeol은 세포 독성을 보이지 않는 농도 내에서 iNOS의 발현은 억제하였으나 COX-2의 발현에는 변화가 없는 것으로 보아, lupeol에 의한 NO 생성 억제는 iNOS의 발현 저해를 경유한 것임을 알 수 있었다. 한편 이들의 항염증 활성에 ROS의 생성 억제가 관여하는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에서 t-BHP로 유도된 ROS의 생성을 관찰한 결과, lupenone은 세포 독성을 가지지 않는 농도 내에서 유의적인 억제를 보이지 않았지만, lupeol은 ROS의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 결론적으로 이와 같은 연구 결과는 RAW 264.7 세포에서 lupenone 및 lupeol이 함유된 갈근이 세포의 생존에는 영향을

미치지 않으면서 LPS에 의해 유도된 NO 생성뿐만 아니라 *t*-BHP로 유도된 ROS의 생성도 억제할 수 있음을 시사한다. 이와 같은 현상이 나타나는 기전 에는 NF-kB가 promoter로 작용하여 발현을 조절하는 것으로 알려져 있어 향후 이러한 유전자의 발현 조절물질 등의 활성에 대한 연구가 필요하다. 한편 lupenone과 lupeol이 *in vivo*에서도 항염증 효능을 나타내는지 확인하기 위하여 마우스에서 λ -CGN으로 유도된 발 부종에 대한 억제 활성을 평가하였다. 그 결과 lupenone과 lupeol 모두 미비한 억제 활성을 나타내었다. 따라서 향후 흰 쥐를 이용하여 실험의 정확도를 높이는 등 다양한 *in vivo* 연구가 필요할 것으 로 사료된다. 한편 갈근의 주요 성분인 puerarin의 유도체인 3'-hydroxypuerarin 과 3'-methoxypuerarin의 ONOO⁻, NO⁻, ·O⁻, total ROS 소거 활성과 ONOO⁻에 의 한 tyrosine nitration의 억제 활성을 평가함으로써 이들의 항산화 효능을 조사한 결과, puerarin의 C-3' 위치에 hydroxyl group이 존재하는 3'-hydroxypuerarin이 methoxyl group을 가지는 3'-methoxypuerarin보다 항산화능이 뛰어남을 확인하였 다. 그리고 이를 통해 이러한 성분을 함유한 갈근이 뛰어난 항산화 활성 또한 가진다는 것을 증명하였다.

요약하면, 본 연구는 lupenone과 lupeol을 갈근으로부터 분리하여 이들의 항 염증 활성과 기전을 밝힘으로써 daidzein 및 genistein 등과 더불어 갈근의 항염 증 효과를 증명하였으며, 3'-hydroxypuerarin과 3'-methoxypuerarin의 항산화 활성 을 통해 갈근이 항염증뿐만 아니라 항산화 활성을 나타내는 식품으로 이용될 수 있음을 시사한다. 또한 이와 같은 연구 결과는 향후 갈근이 임상에서 항염 증 및 항산화 전략으로 개발하기 위한 기초자료로 응용될 수 있음을 보여준다.

- Abreu, M. T. and Arditi, M., Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research, *J. Pediatr.*, 144, 421–429, 2004.
- Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. J., Scherch, H. M., Sethy, V. H., VonVoigtlander, P. F., Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 83, 243–254, 1994.
- Auroma, O. I., Spencer, J. P. E., Mahmood, N., Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine, *Food Chem. Toxicol*, 37, 1043–1053, 1999.
- Backhouse, N., Delporte, C., Givernau, M., Cassels, B. K., Valenzuela, A., Speisky, H., Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine, *Agents Actions.*, 42, 114–117, 1994.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshell, P. A., Freeman, B. A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1620–1624, 1990.
- Bickoff, E. M., Lyman, R. L., Livingston, A. L., Booth, A. N., Characterization of coumestrol, a naturally occurring plant estrogen, J. Am. Chem. Soc., 80, 3969–3971, 1958.
- Blois, M. S., Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199–1202, 1958.
- Boscá, L., Zeini, M., Través, P. G., Hortelano, S., Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate, *Toxicology*, 208, 249–258, 2005.

- Chang, H. M. and But, P. P. H., Pharmacology and applications of Chinese materia medica, *Singapore: World Scientific Publishing*, 2, 1163–1166, 1987.
- Choi, J. S., Chung, H. Y., Kang, S. S., Jung, M. J., Kim, J. W., No, J. K., Jung, H. A., The structure-activity relationship of flavonoid as scavenging of peroxinitrite, *Phytother*. *Res.*, 16, 232–235, 2002.
- Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y., Kye, I. S., No, J. K., Baek, B. S., Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4484–4486, 1998.
- Chung, H. Y., Choi, H. R., Park, H. J., Choi, J. S., Choi, W. C., Peroxynitrite scavenging and cytoprotective activity of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether from the marine alga *Symphyocladia latiuscula*, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3614–3621, 2001.
- Cline, K. J., Luekocyte function in inflammation: the ingestion, killing, and digestion of microorganisms, *Ser Haematol*, 3, 3–16, 1970.
- Cuzzocrea, S., Tan, D. X., Costantino, G., Mazzon, E., Caputi, A. P., Reiter, R. J., The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy in the rat, *FASEB J.*, 13, 1930–1938, 1999.
- Delia, D., Aiello, A., Meroni, L., Nicolini, M., Reed, J. C., Pierotti, M. A., Role of antioxidants and intracellular free radicals in retinamide-induced cell death, *Carcinogenesis*, 18, 943–948, 1997.
- Fici, G. J., Althaus, J. S. and VonVoigtlander, P.F., Effects of lazaroids and a peroxynitrite scavenger in a cell model of peroxynitrite toxicity, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 223–228, 1997.
- Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E., Bast, A., Peroxynitrite scavenging by flavonoids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 591–593, 1997.

- Hanada, T. and Yoshimura, A., Regulation of cytokine signaling and inflammation, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13, 413–421, 2002.
- Hasegawa, M., Flavonoids of various *Prunus* species VI. The flavonoids in the wood of *Prunus aequinoctialis*, *P. nipponica*, *P. maximow* and *P. avium*, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1738–1740, 1957.
- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., Flaherty, D. M., Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 146–159, 1999.
- Herschman, H. R., Prostaglandin synthase 2, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1299, 125–140, 1996.
- Higgs, G. A., Moncada, S. and Vane, J. R., Eicosanoids in inflammation, Ann. Clin. Res., 16, 287–99, 1984.
- Higuchi, M., Hisgahi, N., Taki, H., Osawa, T., Cytolyticmechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages, J. Immunol., 144, 1425–1431, 1990.
- Hsieh, P. W., Chang, F. R., Lee, K. H., Hwang, T. L., Chang, S. C., Wu, Y. C., A new anti-HIV alkaloid, drymartin, and a new *C*-glycoside flavonoid, diandraflavone, from *Drymaria diandra*, *J. Nat. Prod.*, 67, 1175–1177, 2004.
- Huang, Y. C., Guh, J. H., Cheng, Z. J., Chang, Y. L., Hwang, T. L., Liao, C. H., Tzeng, C. C., Teng, C. M., Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives: involvement of IkappaB-alpha stabilization, *Eur. J. Pharm.*, 418, 133–139, 2001.

- Hudson, A. T. and Bentley, R., Stereospecific effects in cobalt(II1)-triethylenetetramine-N-methyl-(S)-alanine complexes. The isolation of isoflavonoids from bacteria, *Chem. Commun.*, 14, 830–831, 1969.
- Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A., and Dyke, T. E., Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction, *Infect. Immun.*, 72, 2312–2320, 2004.
- James, F. W., Frederick, A. F., Geraldine, J. F., Harry, S. M., Isolation of allantoin and adenosine from the marine sponge *Tethya aurantia*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 70, 799–801, 1981.
- Jun, M., Hong, J., Jeong, W. S., Ho, C.T., Suppression of arachidonic acid metabolism and nitric oxide formation by kudzu isoflavones in murine macrophages, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 1154–1159, 2005.
- Kim, J. M., Jang, D. S., Lee, Y. M., Kim, Y. S., Kim, J. S., Puerarol from the roots of *Pueraria lobata* inhibits the formation of advanced glycation end products (AGEs) *in vitro*, *Nat. Prod. Sci.*, 14, 192–195, 2008.
- Kinjo, J. E., Furusawa, J. I., Baba, J., Takeshita, T., Yamasaki, M., and Nohara, T., Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. Isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 4846–4850, 1987.
- Kinjo, J. E., Takeshita, T., Abe, Y., Terada, N., Yamashita, H., Yamasaki, M., Takeuchi,
 K., Murakami, K., Tomimatsu, T., Nohara, T., Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. IV. Chemical constituents in the flowers and the Leaves, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1174–1179, 1988a.

- Kinjo, J. E., Takeshita, T. and Nohara, T., Studies on the constituents of *Pueraria lobata*.
 V. A trypotphan derivative from *Pueraria Flos, Chem. Pharm. Bull.*, 36, 4171–4173, 1988b.
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S., Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 149–156, 1994.
- Kumar, Abbas, Fausto, Robbins, Cotran, Pathologic basis of disease, 7th edition, *Philadelphia: Elsevier Saunders*, 47–86, 2005.
- Laflamme, N. and Rivest, S., Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components, *FASEB J.*, 15, 155–163, 2001.
- Lawrence, T., Wiilloughby, D. A. and Gilroy, D. W., Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 787–795, 2002.
- Lebel, C. P. and Bondy, S. C., Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes, *Neurochem Int.*, 17, 435–440, 1990.
- Lee, S. J., Baek, H. J., Lee, C. H., Kim H, P., Antiinflammatory activity of isoflavonoids from *Pueraria Radix* and biochanin a derivatives, *Arch. Pharm. Res.*, 17, 31–35, 1994.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., Lin, J. K., Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis*, 20, 1945–1952, 1999.
- Lin, K. T., Xue, J. Y., Sun, F. F., Wong, P. Y., Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 115–119, 1997.

- Margareth, B. C. G., Miranda, J. S., Biological activities of lupeol, *International J. Biomedical and Pharmaceutical Sci. Global Science Books*, 2009.
- Menconi, M. J., Unno, N., Smith, M., Aguirre, D. E., Fink, M. P., Nitric oxide donorinduced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1425, 189–203, 1998.
- Mohammad, S., Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene, *Cancer lett.*, 285, 109–115, 2009.
- Morson, B. C., Pathology of inflammatory bowel disease, *Gastroenterol Jpn.*, 15, 184–187, 1980.
- Namgoong, S. Y., Lee, C. H. and Kim, H. P., Effects of isoflavonoids on mouse lymphocyte proliferation in vitro, *Arch. Pharm. Res.*, 17, 236–239, 1994.
- Na, M. K., An, R. B., Min, B. S., Lee, S. M., Kim, Y. H., Bae, K. H., Chemical constituents from Sorbus commixta, Nat. Prod. Sci., 8, 62–65, 2002.
- Nathan, C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.*, 6, 3051–3064, 1992.
- Nathan, C. and Xie, Q. W., Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls, *Cell*, 78, 915, 1994.
- Nguemfo, E. L., Dimo, T., Dongmo, A. B., Azebaze, A. G., Alaoui, K., Asongalem, A.E., Cherrah, Y., Kamtchouing, P., Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae), *Inflammopharmacology*, 17, 37–41, 2009.
- Nonoyamaa, N., Chibaa, K., Hisatomea, K., Suzuki, H., Shintani, F., Nitration and hydroxylation of substituted phenols by peroxynitrite. Kinetic feature and an alternative mechanistic view, *Tetrahedron Lett.*, 40, 6933–6937, 1999.

- Ohshima Y., Okuyama T., Takahashi K., Takizawa T., Shibata S., Isolation and high performance liquid chromatography (HPLC) of isoflavonoids from the *Pueraria* root, *Planta Med.*, 54, 250–254, 1988.
- Park, J. S., Park, H. Y., Kim, D. H., Kim, D. H., Kim, H. K., ortho-Dihydroxyisoflavone derivatives from aged Doenjang (Korean fermented soypaste) and its radical scavenging activity, *Bioor. Med. Chem. Lett.*, 18, 5006–5009, 2008.
- Reddy, S. T. and Herschman, H. R., Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages, J. Biol. Chem., 269, 15473–15480, 1994.
- Rong, H., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Cooman, L. D., Keukeleire, D. D., Identification of isoflavones in the roots of *Pueraria lobata*, *Planta Med.*, 64, 620–627, 1998.
- Saito, K., Arai, N., Sekine, T., Ohmiya, S., Kubo, H., Otomasu, H., Murakoshi, I., (-)-5α-Hydroxysophocarpine, a new lupin alkaloid from the seeds of *Sophora flavescens* var. angustifolia, *Planta Med.*, 56, 487–488, 1990.
- Saleem, M., Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene, *Cancer Lett.*, 285, 109–115, 2009.
- Sheu, F., Lai, H. H. and Yen, G. C., Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1767-1772, 2001.
- Shibata, S., Murakami, T. and Nishikawa, Y., Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. I. On the constituents of *Pueraria* root, *J. Pharm. Soc. Japan*, 79, 757–760, 1959.
- Tizard, I. R., Immunology: An introduction inflammation. 2nd ed. Saunders College Pub. Co. New York, 423–441, 1986.
- Trowbridge, H. O. and Emling, R. C., Inflammation: a review of the process, 5th ed. Quintessence Pub. Co. Chicago, 3–9, 1997.

- Turini, M. E. and DuBois, R.N., Cyclooxygenase-2: a therapeutic target, Annu. Rev. Med., 53, 35–57, 2002.
- Vallyathan, V., Shi, X., The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases, *Environ. Health Perspect.*, 105, 165–177, 1997.
- Van Dyke, K., McConnell, P., Marquardt, L., Green tea extract and it polyphenols markedly inhibit luminal-dependent chemiluminescense activated by peroxynitrite or SIN-1, *Luminescence*, 15, 37–43, 2000.
- Wang, H. and Joseph, J. A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 612–616, 1999.
- Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T., Huez, G., Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophages: similarities and differences, *J. Inflamm.*, 46, 1–12, 1996.
- Winter, C. A., Risley, E. A., and Nuss, G. W., Carrageenan-induced edema in the hind paw on the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544–547, 1962.

감사의 글

부족한 저에게 항상 지속적인 관심과 가르침으로 이끌어 주시고, 제 자신이 부끄러울 정도로 학문에 대한 끊임없는 열정을 보여주신 최재수 교수님께 감사 드리며, 교수님의 가르침 잊지 않겠습니다.

또한 바쁘신 와중에도 따뜻한 조언과 함께 논문을 심사해주신 류은순 교수님, 좋은 논문 쓸 수 있도록 세심하게 교정해주신 변대석 교수님께 감사 드립니다. 그리고 평소에 올바른 가르침을 주신 김형락 교수님, 남택정 교수님, 류홍수 교수님, 김재일 교수님께도 감사 드립니다.

실험실 선·후배님들과 동기들에게도 감사의 마음을 전합니다. 특히, 많은 조언과 격려를 해주며 도와주신 정현아 교수님께 감사 드립니다. 그리고 단순한 동기로서뿐만 아니라 힘들 때나 즐거울 때나 늘 함께하며 힘이 되어준 소중한 친구 유경이와 진주, 잘 따라준 후배 보라와 혜은이, 먼 이국 땅에서도 열심히 하는 Nurul, Dafang, Sabiha, 그리고 짧은 시간이었지만 도와주며 힘을 준 정민이, 주미, 안나에게도 고마움을 전합니다.

학부과정 동안 따뜻한 관심으로 지켜봐 주신 동아대학교 김도훈 교수님께도 감사 드립니다.

또한 학부 때부터 지금까지 친언니처럼 아껴주고 많은 조언을 해준 연재언니와 은영이언니, 서로 격려하며 큰 힘이 되어준 윤섭선배와 영준선배, 실험 잘 할 수 있도록 도와주고 많은 위로해 준 진수선배에게도 고마움을 전하며, 모두 뜻하는 바를 이룰 수 있기를 바랍니다.

바쁘다고 자주 만나지 못해도 언제나 걱정해주고 많은 위로와 격려로 힘이 되어 준 소중한 친구들에게도 고마움을 전합니다.

힘들다는 핑계로 투정만 늘어가는데도 늘 딸 걱정하며 사랑과 관심으로 지켜봐 주신 아빠, 짜증과 투정 다 받아가며 사랑과 지극정성으로 뒷바라지 해주신 엄마께 진심으로 감사 드리며, 동생을 진심으로 아껴주고 큰 위로가 되어 주는 언니와 누나의 건강까지 생각하며 응원해준 동생에게도 정말 진심으로 감사 드립니다. 든든한 버팀목 같은 가족이 있었기에 이 결실을 맺을 수 있다고 생각하며 그 사랑에 어긋나지 않도록 밝고 긍정적인 모습으로 올바르게 살아가겠습니다.

> 2010 년 12 월 진성은 올림

