



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0112955
(43) 공개일자 2009년10월29일

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01) *A23L 1/29* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0038759

(22) 출원일자 2008년04월25일

심사청구일자 2008년04월25일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구 달서구 신당동 1000번지

(72) 발명자

이인선

대구광역시 수성구 황금동 368번지 롯데화성 캐슬
골드파크 1416동1803

황보미향

대구광역시 동구 검사동 907-7

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인명문

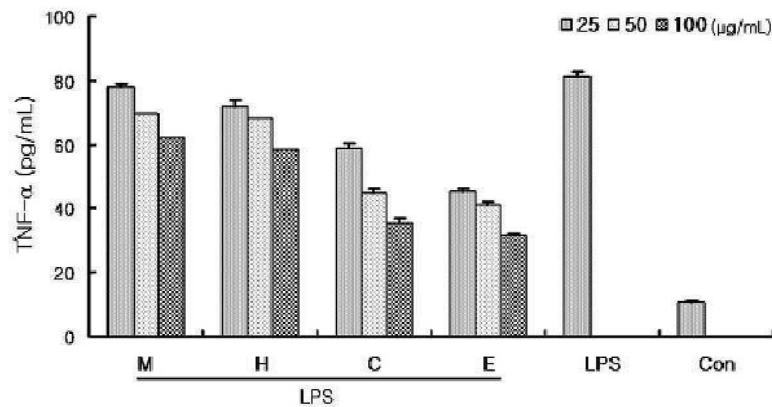
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 항염증 활성을 갖는 몰로키아 추출물을 함유하는 식품

(57) 요약

본 발명은 항염증 활성을 갖는 몰로키아 추출물을 함유하는 식품에 관한 것으로서, 특히 활성이 현저히 높은 몰로키아 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 포함하는 식품 및 몰로키아 유래의 퀴세틴-3-갈락토사이드를 포함하는 식품에 관한 것이다.

대표도 - 도11



(72) 발명자

김현정

대구광역시 북구 산격2동 대우 아파트 109동 1610호

김혁일

경상남도 김해시 장유면 삼문리 대동아파트 502동 1404호

이상일

대구광역시 달서구 본동 247번지 그린맨션 208동 1005호

임남경

대구 서구 중리동 중리시영2차 12동 103호 703-831

유미희

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 대실역 이편한세상 103동1810호

이지원

대구광역시 달성군 다사읍 매곡리 다사주공 103동 203호

이효주

대구 수성구 만촌2동 972-40

특허청구의 범위

청구항 1

몰로키아 메탄올 추출물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 식품.

청구항 2

몰로키아 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 식품.

청구항 3

몰로키아 유래의 퀴세틴-3-갈락토사이드를 함유하는 항염증 활성을 갖는 식품.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, NO(nitric oxide), PGE₂(Prostaglandin E₂), 및 TNF- α (Tumor necrosis factor-1) 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, MCP-1(Monocyte chemotactic protein-1), iNOS(Inducible NOS), COX-2(Cyclooxygenase-2)의 mRNA 유전자 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, COX-2(Cyclooxygenase-2), NF κ B(Nuclear factor κ B) 및 IL-1 β (Interleukine-1 β)의 단백질 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 몰로키아 추출물을 함유하는 식품에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 항염증 활성을 갖는 몰로키아 추출물을 함유하는 식품에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 최근 우리나라는 경제성장과 생활의 변화로 질병의 양상이 변화하여 동맥경화, 비만, 당뇨, 암 등과 같은 영양과잉이나 영양불균형에 기인된 만성 퇴행성 질환이 지속적으로 증가하고 있는 실정이다. 이러한 만성 질환의 주된 요인 중 하나가 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이다. 체내 ROS가 존재하면 생체 내의 제거시스템이나 환원기구의 작동에 의해 제거되지만, 제거량에 비해 생성량이 과다하여 체내 ROS에 의한 산화적 스트레스가 가해지면, DNA, 단백질, 지질 분자의 손상 및 생체막의 연쇄적 과산화반응을 일으킴으로써 세포손상을 야기하여 다양한 질병을 유발할 수 있다.
- <3> 일반적으로 동맥경화란 동맥벽이 두꺼워지고 딱딱해져 결과적으로 탄력성을 잃게 되는 질환으로 흔히 죽상동맥경화를 지칭하며, 혈관내막과 중막 내부에 지방반이 쌓이는 질환으로 정의된다. 또한 동맥경화는 단순히 노화 과정에 수반되는 질환이 아니라, 만성적인 염증성 질환으로 보고되고 있다. 동맥경화를 유발하는 요인으로는 혈중 콜레스테롤 농도의 상승, 고혈압, 당뇨, 비만, 스트레스, 흡연 등이 있으며, 특히 저밀도 지단백질(Low density lipoprotein, LDL)의 산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- <4> 이러한 위험인자들이 혈관내피세포의 기능을 손상시켜 혈액 내 LDL을 내피조직으로 이동시키고, 이동된 LDL은 내피세포, 평활근세포, 대식세포 등에 의해 산화된다. 산화된 LDL(oxidized LDL)은 혈중 단백질이 피하조직으로 이동하는데 필요한 부착물질인 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1(intracellular adhesion molecule-1), MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1), 사이토카인인 NF κ B, IL-1, TNF- α 및 성장인자인

MCSF, PDGF 등을 발현시켜, 혈액중의 단핵구의 유입을 도와 동맥경화를 계속 진행시킨다.

<5> 그리고 산화스트레스는 염증반응의 촉진, 세포독성뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 조절한다. 그 중에서도 NF κ B는 ROS, TNF- α , IL-1 β 와 같은 chemokine에 의해 I κ B kinase가 활성화된 후 인산화와 일련의 분해과정을 통해 I κ B가 분리되고 NF κ B의 핵으로 전이가 일어난다. NF κ B는 활성화된 후 핵으로 이동하여 염증반응을 유도하는 cytokine, iNOS, COX-2, VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, E-selectin 등의 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 그러므로 NF κ B활성과 세포부착분자의 발현을 감소시키면 다양한 염증 관련 질환을 예방할 수 있다.

<6> 한편 물로키아(*Corchorus olitorius* L.)는 피나무과의 1년생 녹색채소로서, 원산지는 이집트의 지중해 연안에서 자생하는 식물이며 단백질, 조섬유, 회분, 비타민, 미네랄을 균형 있게 함유하며 특히 22.8%의 mucilage, 그리고 β -carotene과 lutein도 풍부하다. 또한 물로키아는 폐놀성 물질에 의한 항산화작용, 콜레스테롤 저하 효과 등의 생리활성이 보고된 바 있다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

- <7> 본 발명의 일 구현예에서는 항염증 활성을 갖는 물로키아 추출물을 포함하는 식품을 제공하고자 한다.
- <8> 본 발명의 일 구현예에서는 특히 항염증 활성이 우수한 물로키아 추출물의 분획물을 포함하는 식품을 제공하고자 한다.
- <9> 본 발명의 일 구현예에서는 산화 및 염증반응에 우수한 저해능을 갖는 물로키아 추출물 및 분획물을 함유하는 식품을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- <10> 본 발명의 일 구현예에서는 물로키아 메탄올 추출물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 식품을 제공한다.
- <11> 본 발명의 일 구현예에서는 또한 물로키아 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 식품을 제공한다.
- <12> 본 발명의 일 구현예에서는 또한 물로키아 유래의 퀴세틴-3-갈락토사이드를 함유하는 항염증 활성을 갖는 식품을 제공한다.
- <13> 본 발명의 구현예들에 의한 식품은 NO(nitric oxide), PGE₂(Prostaglandin E₂), 및 TNF- α (Tumor necrosis factor-1) 생성을 억제하는 것일 수 있다.
- <14> 본 발명의 구현예들에 의한 식품은, MCP-1(Monocyte chemotactic protein-1), iNOS(Inducible NOS), COX-2(Cyclooxygenase-2)의 mRNA 유전자 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- <15> 본 발명의 구현예들에 의한 식품은 COX-2(Cyclooxygenase-2), NF κ B(Nuclear factor κ B), IL-1 β (Interleukine-1 β)의 단백질 발현을 억제하는 것일 수 있다.

효과

- <16> 본 발명의 일 구현예에 의하면 물로키아의 메탄올 추출물, 특히 에틸아세테이트 분획물은 총폴리페놀 함량이 높고, 총 플라보노이드 함량이 높으며, DPPH와 ABTS 소거활성능도 높아 우수한 항산화능을 가지고 있음을 확인하였다.
- <17> 또한 본 발명의 다른 일 구현예에 의하면 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 세포주를 이용하여 물로키아 추출물과 분획물이 산화 및 염증반응에 미치는 영향을 조사한 결과, 물로키아 추출물 및 분획물의 50-250 μ g/mL 농도에서 세포생존율, NO 생성, PGE₂, TNF- α 생성능이 억제됨을 확인하였고, 특히 물로키아 에틸아세테이트 분획물의 100 μ g/mL 농도에서 세포생존율, NO 생성, PGE₂, TNF- α 생성능이 가장 크게 억제됨을 확인하였다. 또한 에틸아세테이트 분획물 100 μ g/mL 첨가 농도에서 MCP-1, iNOS, COX-2의 mRNA 유전자 발현을 억제하였고, NF κ B, IL-1 β 의 단백질 발현도 저해하였다.
- <18> 이상의 결과로 물로키아 추출물, 특히 물로키아 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물은 우수한 항산화능을

가졌고, 항염증 활성을 가짐을 확인하였다. 그러므로 몰로키아 추출물 및 분획물은 항염증 활성을 갖는 우수한 식품소재라 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <19> 염증반응은 체내에서 발생한 산화스트레스에 의해 촉진되는데, 산화스트레스는 세포사멸뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증 반응을 개시하거나 악화시킨다. 그 중에서 NF κ B는 세포 증식 및 성장, 염증 반응, 세포 부착 등을 조절하는 인자로서, 주로 저해 단백질인 I κ B와 복합체를 이루어 불활성화 상태로 존재하다가 분열촉진 인자, 염증, 사이토카인, 자외선, 이온화, ROS, 세균 LPS 등의 자극을 받으면 I κ B는 빠르게 인산화되어 분해된다. 이때 I κ B로부터 분리된 NF κ B는 활성화되어 핵으로 이동한 후 초기 염증반응에 관여하는 여러 유전자를 조절하게 되는데 그 대표적인 것이 inducible NOS(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)이다.
- <20> 활성산소종의 하나인 nitric oxide(NO⁻)는 L-arginine의 guanidine 질소와 산소로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성되며, 이 효소에는 endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS), iNOS 3가지의 이성체가 있다. 이중에서 동물 또는 사람의 동맥경화 초기와 진행된 병변 모두에서 iNOS의 mRNA가 발현되며, 특히 담식세포가 많은 곳에서 iNOS mRNA와 oxLDL의 발현이 높으며, iNOS가 동맥경화에 관여한다.
- <21> 또한 COX-2는 아라키돈산으로부터 프로스타글라딘 생합성의 주요 조절 효소중의 하나로, 정상조직에서는 거의 검출되지 않고 종양유전자, 성장인자, 사이토카인 등에 의해 쉽게 유도된다. 특히 COX-2의 저해는 염증을 억제할 수 있어, COX-2는 염증에서 주요 조절인자가 된다.
- <22> 항산화제는 세포를 공격하기 전에 유리기를 안정화시키거나 불활성화시키는 물질로서 주로 비타민 C, 비타민 E, β -carotene, 폴리페놀 등을 의미한다. 그 중에서 폴리페놀 화합물은 강한 항산화 활성을 가지며, COX(cyclooxygenase)의 저해, NF κ B 활성을 감소한다고 보고되었다.
- <23> NF κ B 활성의 억제는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 염증 매개 인자의 방출을 저해함으로써 일어난다. 또한 폴리페놀 화합물은 핵내 인자인 AP-1의 활성을 억제하여 COX-2의 발현을 조절하고, 혈액내 HDL 관련 paraxonase -1(PON-1) 및 항산화 효소들의 활성을 증가시키고, 인간 대동맥 상피세포에서 VEGF 발현을 감소시켜 정상 말초 혈액 내 단핵구와 대식세포에서 IFN- γ , IL-4 유전자의 발현을 억제한다고 한다. Quercetin은 NF κ B 활성을 저해함으로써 LPS로 유도된 IL-1 β , TNF- α 등과 같은 cytokines의 생성을 억제하고, curcumin, resveratrol, theophylline, flavonols, 녹차의 폴리페놀들은 NF κ B 활성의 억제하고, IL-1 β , IL-8, TNF- α , iNOS 등의 초기 염증유전자의 발현을 저해하며, 그리고 COX와 lipoxxygenase 경로를 저해하여 항염증 활성을 보였다(도 1 참조).
- <24> 한편 최근 폴리페놀의 섭취는 관상심장 질환 또는 허혈성 쇼크 사망률을 감소시킨다고 한다. 전통적으로 사용되어 온 천연식품 추출물은 폴리페놀화합물이 풍부하여 동물모델에서 동맥경화의 진전을 억제함을 확인할 수 있다. 포도씨, 포도주와 녹차의 폴리페놀 화합물이 동물모델에서 동맥경화가 진전되는 것을 예방하고 초기 동맥경화 병변부위에서 플라그가 생성되는 것을 지연하고, 특히 폴리페놀 화합물인 quercetin, catechin, caffeic acid, resveratrol 등에서 항염증 효과가 확인되었다.
- <25> 많은 식물체들은 phenolic acid와 flavonoids을 포함하는 폴리페놀 화합물을 가진다. 폴리페놀 중 flavonoid는 식물계에 널리 존재하는 화합물로, 주로 채소나 과일, 와인 등에 많이 함유되어 있다. 이들은 5,000여종 이상의 서로 다른 flavonoid로 플라보놀(flavonol), 플라본(flavone), 이소플라본(isoflavonol), 플라바놀(flavanol), 안토시아닌(anthocyanin) 및 프로안토시아니딘(proanthocyanidin)등으로 분류된다(도 2 참조).
- <26> 플라보놀은 식품 중에 가장 많이 존재하는 플라보노이드로 quercetin, kaempferol, myricetin 등이 이에 속한다. 특히 quercetin은 식물의 주요 페놀성분의 구성 요소이고 식이 플라보노이드 중 양적으로 가장 중요하다. 식품에 존재하는 quercetin은 대부분 당이 결합한 배당체(glycosides)형태로 되어 있으며, 일부 당이 결합하지 않은 free flavonoid가 존재하는데, 이는 aglycone이라 한다. Aglycone은 소장 점막에서 흡수되지만 식이로 섭취되는 대부분의 플라보노이드는 glycoside 형태로 큰 분자량을 가지고 있어 소장 점막에서는 거의 흡수가 되지 않는다.
- <27> 플라보노이드는 항산화, 항염증반응 및 항암 등과 같은 생리활성을 가진 것으로 알려져 있다. 푸른 채소와 토마토, 멜론은 대장 및 직장암 예방효과를 나타내며, 플라보노이드가 풍부한 과일 또는 채소를 많이 섭취한 사람들에게 비해 과일이나 채소를 적게 섭취한 사람들에서 심장질환에 의한 사망률이 약 17% 높다고 보고하였다. 플라보노이드는 β -ring의 O- dihydroxyl기, C ring의 4-oxo기와 2,3 위치의 공액화된 이중결합 및 A와 C ring의

3,5-hydroxyl기와 같은 구조적 특징으로 인해 천연물에서 분리된 대표적인 항산화 물질로 알려져 있다. 또한 플라보노이드는 세포막 표면에서 chain-initiating radical을 소거하며 자유 라디칼 손상을 촉진하는 Fe^{2+} , Cu^{2+} 등과도 안정적인 금속이온 복합체를 형성할 뿐만 아니라 superoxide anion, hydroxyl radical, peroxy radical과 같은 자유라디칼을 직접 제거하는 것으로 알려져 있다.

<28> 특히 플라보노이드는 대부분 친수성이라서 LDL 분자와 결합하지 않고, 유리기의 제거 또는 킬레이트제로서 작용하여 LDL 단편에서 비타민 E, carotene, lycophen을 보호해주고, 지질과산화물을 가수분해할 수 있는 혈액내의 paraoxonase 활성을 유지시켜 LDL 산화를 억제한다. 또한 몇몇 *in vitro*연구에서 폴리페놀은 산화로부터 LDL를 보호하고, 플라보노이드가 풍부한 천연 산물을 섭취할 경우에도 LDL의 산화를 감소할 수 있다고 보고되었다.

<29> 본 발명의 일 구현예에서는 몰로키아의 항염증 효과를 규명하기 위해, 먼저 몰로키아 추출물 및 분획물을 제조하여 *in vitro*에서 항산화 효과, 염증반응의 NO, PGE₂ 및 TNF- α 의 활성 측정, 그리고 산화 LDL에 의한 단핵구로의 이동에 필요한 부착물질인 VCAM-1, ICAM-1, MCP-1의 발현 양상을 확인하였다. 또한 몰로키아의 주요 항산화물질인 quercetin, chlorogenic acid, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside의 항염증 효과도 비교 분석하였다.

<30> 이하에서는 이를 구체적으로 살핀다.

<31> 1. 재료 및 방법

<32> 1.1. 시약 및 기기

<33> 1.1.1. 시약

<34> 시료 추출 및 분획에 사용된 용매인 methanol, *n*-hexane, chloroform, ethylacetate 및 *n*-butanol은 J.T.Baker(Mallinckrodt Baker Inc., Philipsburg, USA)의 특급시약을 사용하였고, HPLC 측정에 사용된 표준품인 quercetin, chlorogenic acid, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-galactoside는 Sigma(St. Louis, Mo., USA)를 사용하였다. 세포배양에 사용된 DMEM, antibiotic, Fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA는 Gibco BRL (Rockville, USA)로부터 구입하였다. 세포독성에 측정된3-(4,5-dimethyl -thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT)는 Amresco(Ohio, USA)로부터 구입하였다. PCR 실험에 사용된 Primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)로부터, RNA추출을 위하여 사용한 시약은 Trizol solution Molecular Research Center(Ohio, USA), 1-bromo-3-chloro-propane은 Sigma(St. Louis, Mo., USA)의 제품을 사용하였으며, RT-PCR 측정은 Takara kit는 Takara(Shiga, Japan), DNA ladder는 Promega(Madison, WI, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 그리고 western blot 분석에 사용된 trizma base(Tris-Cl), ethylenedinitro tetraacetic acid disodium salt(EDTA-2Na), triton X-100, N,N,N',N'-tetra-methylethylene diamine(TEMED), acrylamide, sodium dodecyl sulfate(SDS), ammonium persulfate(APS), tween-20, bicinchoninic acid kit 등은 모두 Sigma(St. Louis, Mo., USA)로부터 구입하였고, ECL Detection kit는 Amersham(Buckinghamshire, England), 그리고 immobilon-P transfer membrane은 Millipore(Billerica Massachusetts, USA), NF- κ B(p65), IL-1 β , iNOS, COX-2는 Santacruz biotechnology(California, USA)로부터 구입하였다.

<35> 1.1.2 기기

<36> 실험에 사용한 중요한 기기는 rotary vacuum evaporator(Buchi, R-3000, Germany), UV/visible spectrophotometer(Kontron, Uvikon 922, Italy), incubator(Forma Scientific, Model 3154, USA), HPLC (Shimadzu LC-10A prominence, Shimadzu, Japan), PCR machine(Bioneer, Mygenie 96, Korea), Mini-Protein electrophoresis system(BioRad Co., USA), microplate spectrophotometer(Molecular Devices, Spectra max 340PC, USA), microplate shaker(Finepcr, Finemixer SH2000, Korea), ultracentrifuge (Hitachi, Model 695-7, Japan), cryotome(Leica CM 1850, Germany), micro haematocrit centrifuge(Hanshin HHC-24, Korea)를 본 실험에 사용하였다.

<37> 1.2 실험재료

<38> 몰로키아(*Corchorus olitorius* L.)는 2006년 8월 하순에 채집한 잎을 50℃에서 12시간 저온건조시킨 후 100 mesh로 분쇄된 분말을 경기도 여주 몰로야 마을에서 구입하여 사용하였다. 분말 시료에 10배량의 80% 메탄올(v/v)을 가하여 3회 반복 추출한 다음, 추출액을 여과지를 사용하여 2회 여과하고 감압농축기로 농축하여 동결 건조 후 메탄올추출물로 사용하였다. 메탄올추출물은 다시 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및

water로 순차 분획하여 각각 농축, 건조하여 분획물을 제조하여 시료로 사용하였다.

1.3 몰로키아의 항산화 효과

1.3.1 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였다. 각 메탄올 추출물 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 용해시켜 10배 희석한 희석액 2 mL에 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하여 혼합하고 3분간 방치한 후 2 mL의 10% Na₂CO₃를 가하고, 1시간동안 방치한 후 UV/visible spectro- photometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

1.3.2 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(Nieva, M. M.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 109-114.)의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 용액을 10% ethanol로 10배 희석한 후 100 μ L를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 μ M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

1.3.3 DPPH radical의 소거 활성

DPPH 라디칼의 소거활성은 Blois(Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 103-107.)의 방법에 따라 각 시료의 DPPH 라디칼에 대한 환원력을 측정하였다. 각 추출물을 농도별로 99% 메탄올에 녹인 후, 800 μ L를 취하여 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 200 μ L와 혼합하여 30분경과 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다.

1.3.4 ABTS radical 소거 활성

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+[·] cation decolourisation assay(Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237.)에 의하여 시행하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+[·]을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70($\pm$ 0.02)이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 990 μ L에 sample 10 μ L를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다.

1.3.5 폴리페놀 화합물 성분 분석

분석에 사용된 고성능 액체 크로마토그래프는 Shimadzu의 HPLC 10-A를 이용하였다. 각 성분을 분리하기 위한 컬럼은 ODS-HG5(4 mm, 4.6 i.d. x 150 mm)를 사용하였으며, 40℃로 유지되는 column oven에 장착하여 항온 조건에서 재현성 있게 분리되도록 하였다. 이동상은 두 가지의 buffer를 사용하였다. Buffer A는 2% acetic acid를 함유한 증류수이고, buffer B는 50% acetonitrile을 사용하였다. 분리를 위한 gradient 조건은 다음 표 1과 같으며, 0.9 mL/min의 유속으로 분석하였다. 검출은 UV-VIS detector (SPD-20A)를 사용하여 파장 295 nm에서 측정하였다.

표 1

Time (min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
0	100	0
0.3	90	10
50	55	45
70	0	100
79	10	90

- <51> **1.4 NO 생성과 항염증 효과**
- <52> **1.4.1 세포 배양 및 처리**
- <53> Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다.
- <54> 세포는 D60 culture dish(1×10⁶ cells/dish) 및 24 well plate(1×10⁵ cells /well)에 주입하여 부착시키고, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, lipopolysaccharide(LPS) 1 µg/mL를 첨가하여 24시간 배양시킨 후 실험에 이용하였다. LPS를 처리하지 않은 실험구를 negative control로 하였으며, LPS를 처리한 것을 positive control로 하였다.
- <55> **1.4.2 세포 생존률 측정**
- <56> Cytokine에 의해 생성되는 NO가 RAW 264.7 cell에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Green 등(Green, L. M.; Reade, J. L.; Ware, C. F. Rapid colometric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lympholines. *J. Immuno. methods* **1984**, *70*, 257-268.)의 방법에 준하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다. 배양한 cell은 0.4% trypan blue 염색법으로 세포수를 측정한 후 96 well plate에 각 well 5×10⁴ cells/200 µL 농도로 분주하여, 24시간 배양 후 배지를 제거하고, 새로운 DMEM 배지 200 µL에 녹인 농도별 시료를 각 well에 첨가하여 24시간 배양한 후, LPS(1 µg/mL)를 첨가하여 다시 24시간 배양시켰다. 시료와 LPS가 첨가된 배양액에 MTT(5 mg/mL) 용액 10 µL를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 µL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- <57> **1.4.3 Nitric oxide(NO) 생성 측정**
- <58> NO 생성정도를 Green 등(Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J. Analysis of nitrate, and nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131-138.)의 방법으로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 NO₂⁻양을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 DMEM를 이용하여 1×10⁵ cells/mL 농도로 24 well plate에 분주한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, LPS(1 µg/mL)를 첨가하여 다시 24시간 배양시켰다. 세포배양 상등액 100 µL와 Griess시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 96 well plates에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻ 표준곡선은 NaNO₂를 농도별로 조제하여 사용하였다.
- <59> **1.4.4 ProstaglandinE₂(PGE₂) 측정**
- <60> RAW 264.7 cell을 DMEM를 이용하여 1×10⁵ cells/mL 농도로 24 well plate에 분주한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, LPS(1 µg/mL)를 첨가하여 다시 24시간 배양시켰다. 상등액으로 PGE₂ 생성량을 측정하였다. Antibody를 coating buffer와 함께 overnight precoating한 후 0.05%의 Tween-20을 함유한 0.01 M PBS로 씻고 blocking buffer와 함께 96 well plates에 배양하였다. Blocking buffer를 제거한 후 시료를 첨가한 다음 다시 배양하였다. 세척한 96 well plates에 이차 항체를 부착시키고 detection reagent, substrate, stopping reagent를 차례로 넣어 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- <61> **1.4.5 TNF-α 측정**
- <62> RAW 264.7 cell을 DMEM를 이용하여 1×10⁵ cells/mL 농도로 24 well plate에 분주한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, LPS(1 µg/mL)를 첨가하여 다시 24시간 배양시켰다. 상등액으로 TNF-α 생성량을 측정하였다. Antibody를 coating buffer와 함께 overnight precoating한 후 0.05%의 Tween-20을 함유한 0.01 M PBS로 씻고 blocking buffer와 함께 96 well plates에 배양하였다. Blocking buffer를 제거하고 시료를 첨가한 다음 다시 배양하였다. 세척한 96 well plates에 이차 항체를 부착시키고 detection reagent, substrate, stopping reagent를 차례로 첨가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

1.5 동맥경화 관련 유전자의 발현

1.5.1 RT-PCR 법에 의한 유전자 발현 조사

RNA는 D60 culture dish에 RAW 264.7 cell(1×10^6 cells/mL)을 split하여 4 mL의 배지에서 24시간 배양한 다음, 물로키아 메탄올 추출물 및 그 분획물을 농도별로 첨가하고, 다시 1 μ g/mL의 LPS 1 μ L를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. RNA의 분리를 위해서 D60의 media를 제거하고 PBS (pH 7.4) 1 mL로 3회 세척한 후 TRI reagent를 처리하였다. 이를 멸균된 1.5 mL tube에 1 mL씩 첨가하고 1-bromo-3-chloropropane을 200 μ L 첨가하여 30초간 vortex하여 층이 분리될 때까지 얼음에 방치한 뒤 원심분리(15,000 rpm, 20분, 4°C)하여 상등액을 취해 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 이상 방치하여 원심 분리(15,000 rpm, 20분, 4°C)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올을 첨가하여 제거한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 분리된 RNA는 UV/visible spectrophotometer와 2% agarose gel 전기영동을 이용하여 확인하고 정량하였다.

분리한 total RNA 2 μ g, RNA PCR kit을 혼합하여 42°C에서 90분간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

Total RNA를 역전사 시켜 생성된 cDNA는 다음 표 2의 primer들을 이용한 PCR 방법으로 증폭하였다. PCR의 반응은 2.5 U Taq polymerase (Takara Ex.), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각의 primer에 맞는 조건으로 실시하였다. Amplification profile로서 94°C에서 2분 30초 동안 initial step을 수행 후 95°C에서 40초간 denaturation, 각각의 annealing temperature에서 1분 20초간 annealing, 72°C에서 2분간 polymerization을 30 cycle 수행하고 최종 cycle에서는 72°C에서 10분간 반응을 더 연장한 후 5°C에 보관하였다. 여기에서 사용된 primer는 ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, iNOS, COX-2, GAPDH 등으로 다음 표 2와 같다.

표 2

Gene	Fragment size(bp)	Oligonucleotides
ICAM-1	170	F 5'-AAC TCT TCC AGA ACA CCT CG-3' R 5'-AGC ACC AGC TAG ACC TTA GC-3'
VCAM-1	206	F 5'-TCA TCC CCA CCA CTG AAG AT-3' R 5'-GCC ATT GCT AGA GCA TGT CA-3'
MCP-1	267	F 5'-GTG CCT GCT ACT CAC AGT AG-3' R 5'-GGA ATT TGG TTT TTC TTG TT-3'
iNOS	920	F 5'-GCC TTC AAC ACC AAG GTT GTC TGC A-3' R 5'-TCA TTG TAC TCT GAG GGC TGA CAC A-3'
COX-2	490	F 5'-TGG GCA AAG ATG CAA ACA TC-3' R 5'-CAG CAA ATC CTT GCT GTT CC-3'
GAPDH	514	F 5'-GGA AGG CCA TGC CAG TGA-3' R 5'-TGA GAA CGG GAA GCT TGT CA-3'

1.5.2. Western blot에 의한 단백질 발현 조사

물로키아 메탄올 추출물 및 그 분획물이 염증 관련 유전자 조절 인자인 NF- κ B, IL-1 β 의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 western blot을 실시하였다. RAW 264.7 cell (1×10^6 cells/mL)에 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂ 항온기에서 24시간 배양 후 배지를 제거하고 새로운 배지를 첨가하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간 동안 용해시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 표준화 한 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 상등액은 단백질을 정량한 후 10% running gel과 4.5% stacking gel을 이용하여 125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다.

전기영동으로 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane과 transfer buffer (20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA에서 120분간 transfer시켰다. 단백질이 이동된 membrane은 fast green solution으로 transfer의 유무를 확인한 후, 5% non-fat skim milk solution으로 blocking하였다. 4℃에서 일차 항체인 NF- κ B, IL-1 β 의 발현 양을 검토하기 위하여 anti-rabbit, anti-mouse를 TTBS 용액에 1 : 1000으로 희석하여 24시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG를 1 : 5000으로 희석하여 2시간 반응시킨 후 TST(100 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 0.5% tween-20)를 이용하여 10분 간격으로 3회 세정하였다. 항체와 반응한 membrane에 ECL 진단 kit의 발색시약 I 과 II를 40 : 1로 섞은 혼합액을 가해 확인하였다.

1.6. 통계분석

실험결과는 SAS program(SAS institute, Inc. SAS/SAAT user's Guide. version 6, 4th ed. Cary, NC, USA. 1998.)을 이용하여 분산 분석한 후 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

2. 결과 및 고찰

2.1 몰로키아의 조성

2.1.1 몰로키아의 일반성분

몰로키아 분말의 일반성분을 분석한 결과는 다음 표 3과 같다. 탄수화물 55%, 조지방 2.5%, 조단백 17%, 수분 6.1%, 조회분 12.9%, 조섬유 6.5%이었다.

표 3

Constituent	Content (%)
Moisture	6.1
Carbohydrate	55.0
Crude fat	2.5
Crude protein	17.0
Crude ash	12.9
Crude fiber	6.5

2.1.2 몰로키아 추출물의 계통적 분획 수율

몰로키아 메탄올 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 water로 극성에 따라 순차적으로 분획했을 때의 수율은 다음 표 4와 같다.

표 4

Weight(g) of fraction recovered(%)					
Extract	Fractions				
Methanol	<i>n</i> -Hexane	Chloroform	Ethylacetate	<i>n</i> -Butanol	Water
25.0	2.1	1.2	16.1	27.4	45.6

*Percentage of each fractions to methanol extract content(100g)

2.2 몰로키아의 항산화 효과

2.2.1 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량

몰로키아 추출물 및 분획물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 tannic acid 및 quercetin을 기준물질로 하여 비교 측정하여 그 결과를 다음 표 5에 나타내었다. 그 결과 몰로키아 ethylacetate 분획물, chloroform 분획물 및 butanol 분획물에서 각각 295.03, 108.53, 103.54 μ g/mg으로 매우 높은 폴리페놀 함량이 나타났다. 또한 총 플라보노이드의 함량은 ethylacetate 분획물에서 230.92 μ g/mg로 가장 높게 나타났다.

표 5

<87>

Sample	Total phenolics ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Total flavonoids ²⁾ ($\mu\text{g/g}$)
Methanol ext.	79.81 $\pm$ 8.88	35.93 $\pm$ 0.46
<i>n</i> -Hexane fr.	55.88 $\pm$ 1.65	55.82 $\pm$ 0.46
Chloroform fr.	108.53 $\pm$ 9.10	50.05 $\pm$ 1.04
Ethylacetate fr.	295.03 $\pm$ 32.00	230.92 $\pm$ 13.47
<i>n</i> -Butanol fr.	103.54 $\pm$ 12.27	29.78 $\pm$ 7.33
Water fr.	34.29 $\pm$ 5.51	4.93 $\pm$ 0.46

<88>

¹⁾Total phenolics is expressed as tannic acid equivalents.

<89>

²⁾Total flavonoids is expressed as quercetin equivalents.

<90>

2.2.2 DPPH radical 소거활성

<91>

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 cysteine, glutathione과 같은 함황아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine 등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질 측정에 많이 이용되고 있다. ROS는 체내 방어기전에 의해 대부분 제거되지만 제거되지 못할 경우 생체분자들과 신속하게 반응하여 단백질의 변성이나 생체막의 지질 과산화, DNA 손상 등을 일으키며, 세포 내로 확산되거나 혈류를 통해 이동된 지질 과산화물은 새로운 radical 반응을 촉진시켜 각종 만성질환과 노화의 원인으로 작용한다.

<92>

몰로키아 추출물 및 분획물과 butylated hydroxyanisole(BHA)의 DPPH 소거활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과는 도 3과 같다. 표준물질로 이용한 BHA 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 90% 정도의 항산화능을 나타내었고, 몰로키아 ethylacetate 분획물, chloroform 분획물, butanol 분획물 및 methanol 추출물 각 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 94% 정도의 우수한 소거활성능이 있었다. 그리고 ethylacetate 분획물과 butanol 분획물의 RC_{50} 값은 각각 17.22 $\mu\text{g/mL}$, 57.95 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다.

<93>

도 3에 있어서, M: 메탄올 추출물, H: *n*-hexane 분획물, C: chloroform 분획물, E: ethylacetate 분획물, B: *n*-butanol 분획물, W: 물 분획물을 나타낸다.

<94>

2.2.3 ABTS radical 소거 활성

<95>

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 생성된 $\text{ABTS}^+\cdot$ 가 추출물의 항산화력에 의해 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 정도를 측정함으로써 추출물의 $\text{ABTS}^+\cdot$ 소거능을 관찰할 수 있다. 혈장에서 ABTS 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 ABTS 라디칼 소거법은 표준물질인 Trolox의 값과 비교하여 나타낼 수 있으며, *in vivo*에서 항산화능 측정뿐만 아니라 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있다.

<96>

몰로키아 추출물 및 분획물의 $\text{ABTS}^+\cdot$ 소거 활성을 Trolox와 비교하여 농도별로 측정한 결과 도 4와 같이, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 몰로키아 ethylacetate 분획물, chloroform 분획물, butanol 분획물 및 methanol 추출물에서 90% 이상의 우수한 소거활성능이 있었고, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리농도에서는 몰로키아 ethylacetate 분획물의 경우 90% 이상의 소거 활성능을, chloroform 분획물은 80% 이상의 소거 활성능을 보였으며, butanol 분획물 및 methanol 추출물에서도 60~70%의 소거활성능이 있었다. 그러나 몰로키아 hexane 및 water 분획물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 소거 활성능을 보였다. 특히 $\text{ABTS}^+\cdot$ 소거활성이 우수한 몰로키아 ethylacetate 분획물과 chloroform분획물의 RC_{50} 값은 각각 7.42 $\mu\text{g/mL}$, 30.04 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다. 이 결과는 몰로키아 추출물 및 분획물이 우수한 DPPH· 소거 활성을 나타낸 것과 유사하게 $\text{ABTS}^+\cdot$ 소거 활성도 우수함을 알 수 있었다

<97>

도 4에 있어서, M: 메탄올 추출물, H: *n*-hexane 분획물, C: chloroform 분획물, E: ethylacetate 분획물, B: *n*-butanol 분획물, W: 물 분획물을 나타내며, 다만 *H, W: 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$, Trolox: 15 μM 농도이다.

<98>

이를 요약하면 다음 표 6과 같다.

표 6

Sample	RC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)	
	DPPH	ABTS
Methanol ext.	58.42 ± 4.95	46.93 ± 3.15
<i>n</i> -Hexane fr.	170.69 ± 11.23	69.63 ± 2.71
Chloroform fr.	70.60 ± 6.70	30.04 ± 0.86
Ethylacetate fr.	17.22 ± 2.21	7.42 ± 0.62
<i>n</i> -Butanol fr.	57.95 ± 1.25	36.02 ± 1.40
Water fr.	152.14 ± 16.42	144.41 ± 8.22

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH and ABTS+• at 1 min after starting the reaction

²⁾Each value represent the mean ± S.D. from 3 independent experiments

**p* < 0.05

2.2.4 폴리페놀 화합물의 성분 정량

몰로키아에 함유된 폴리페놀화합물 중 chlorogenic acid, quercetin-3 -glucoside, quercetin -3-galactoside, quercetin 성분의 변화를 알아보기 위해 몰로키아 추출물 및 분획물에 대해 HPLC를 이용하여 함량 분석을 하였으며 그 결과를 다음 표 7로 나타내었다. 다음 표 7에 있어서 단위는 mg/100 g이다.

표 7

Compound	Methanol ext.	Ethylacetate fr.	Hexane fr.	Chloroform fr.
Chlorogenic acid	646.5	203.2	2.1	1.1
Quercetin-3-glucoside	70.21	175.2	0.7	0.4
Quercetin-3-galactoside	82.15	216.6	0.8	0.7
Quercetin	22.34	0	2.0	0.2

그 결과 몰로키아 추출물은 chlorogenic acid 646.5 mg, quercetin-3-glucoside 70.2 mg, quercetin-3-galactoside 82.15 mg, quercetin 22.3 mg/100 g로 나타났다.

특히 ethylacetate분획물은 chlorogenic acid 203.2 mg, quercetin-3 -glucoside 175.2 mg, quercetin-3-galactoside 216.6 mg/100g로 가장 높은 폴리페놀화합물 함량을 나타내었다. 그러나 hexane 및 chloroform 분획물에서는 폴리페놀 화합물이 미량 함유되어 있었다.

몰로키아 ethylacetate 분획물에서는 폴리페놀 화합물중 quercetin-3- galactoside가 가장 높은 함량을, methanol 추출물에서는 chlorogenic acid가 가장 높은 함량을 나타냄을 확인하였다.

도 5에는 몰로키아로부터 분리된 페놀성 항산화제의 화학구조를 도시하였다.

한편 도 6에는 몰로키아 메탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램을 도시하였는바, 도 6에서 1: chlorogenic acid, 2: quercetin-3-glucoside 3: quercetin-3-galactoside, 4: quercetin을 나타낸다.

2.3 몰로키아 추출물의 항염증 효과

2.3.1 세포생존율

Lipopolysaccharide(LPS)는 Gram 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포를 자극하여 NO의 생성을 증가시킨다고 보고되고 있다. LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에서 몰로키아 추출물 및 분획물을 농도별로 처리하여 일정시간 배양하였을 때 세포 생존율 도 7에 나타내었다. LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 cell의 생존율은 LPS를 처리하지 않은 대조구에 비해 감소되었지만, 몰로키아 추출물 및 분획물 농도를 25-250 μg/mL 처리한

경우 butanol 분획물을 제외한 다른 시료 처리구들은 50% 이상의 세포 생존율을 보였다. 그러나 가장 높은 농도인 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시에는 몰로키아 메탄올 추출물과 ethylacetate 분획물에서만 50~68% 정도의 세포생존율을 보였다.

도 7에 있어서 M: methanol extract, H: *n*-hexane fraction, C: chloroform fraction, E: ethylacetate fraction, B: *n*-butanol fraction, LPS: alone, Con: control을 나타낸다.

2.3.2 NO 생성조건 및 생성량

RAW 264.7 cell에 산화적 스트레스 유발에 필요한 LPS처리 농도와 시간을 결정하기 위하여 배양액에 LPS 처리 농도와 배양시간에 따른 NO 생성량을 측정함과 동시에 몰로키아 추출물의 NO 생성에 미치는 영향을 관찰하여 그 결과를 도 8에 나타내었다. LPS의 농도를 0~6 $\mu\text{g/mL}$, 처리시간을 6, 12, 18, 24, 48 hr로 처리하면 LPS의 처리 농도가 1 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서는 NO 생성량이 10배 정도 증가하였고 농도에 따른 차이는 없었다. 그리고 LPS를 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리하여 배양시간을 달리하여 NO 생성량을 확인하면 24 hr에서 NO의 생성량이 10배 정도 증가함을 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 LPS 처리농도를 1 $\mu\text{g/mL}$, 배양시간을 24 hr으로 결정하였다.

LPS 처리구는 LPS를 처리하지 않은 대조구보다 NO의 생성량이 증가하는데 이는 LPS가 산화적 스트레스를 유발한다는 보고와 일치하였다. LPS에 의해 세포내 산화적 스트레스가 유발되었을 때 NO 생성량은 유의적으로 증가하였으며, 몰로키아 추출물 및 분획물을 첨가하였을 때 NO의 생성이 억제되었으며 이를 도 8에 나타내었다. 이러한 결과로 보아 몰로키아 추출물 및 분획물은 초기 염증반응시에 대식세포에서 NO의 생성을 억제함으로써 NADPH oxidase에 의해 생성된 superoxide anion(O_2^-)과 NO의 반응으로 강력한 산화제인 peroxynitrite(ONOO^-)가 생성되는 것을 저해하여 세포독성과 LDL 산화를 억제할 수 있을 것으로 보인다.

정상적인 생리 상태에서 NO는 혈관의 항상성 등 중요한 생리적인 기능을 매개하지만 고지혈증과 동맥경화상태에서는 과잉의 superoxide와 NO가 반응하여 생성된 peroxynitrite에 의해 산화적인 스트레스가 유발되어 thiol group 또는 전이금속 함유 단백질과 반응하여 단백질의 기능을 손상시키거나, 세포 보호를 위한 유전자의 발현을 자극하여 세포손상이나 세포사멸을 유발하게 된다.

몰로키아의 hexane, chloroform 및 ethylacetate 분획물 각 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 50% 정도의 NO 생성을 저해하였으며, 특히 ethylacetate 분획물에서는 50% 이상의 높은 저해효과를 보였으며, 이를 도 9로 도시하였다. 따라서 몰로키아 ethylacetate 분획물이 가장 우수한 NO 생성 억제능을 가진 것으로 보이며, 이는 몰로키아 분획물 중 ethylacetate 분획물이 가장 많은 polyphenol류를 함유하고 있는 것과 관련이 있을 것으로 보인다.

도 9에 있어서 M: methanol extract, H: *n*-hexane fraction, C: chloroform fraction, E: ethylacetate fraction, B: *n*-butanol fraction, LPS: alone, Con: control.을 나타낸다.

2.3.3 PGE₂ 생성 억제

NO는 PGE₂의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 그리고 천연물에서 분리한 iNOS 저해제들 중에서는 COX-2 저해활성과 PGE₂의 생성 억제효과를 동시에 가지는 것들이 많으며, 또한 전사인자인 NF κ B의 조절에 의해 COX-2와 iNOS의 발현을 억제시킨다고 보고되고 있다.

몰로키아 추출물 및 분획물이 LPS로 처리한 RAW 264.7 cell에서 PGE₂의 생성을 억제한다는 사실을 확인하였다. 도 10에서와 같이 몰로키아 hexane, chloroform, ethylacetate 분획물 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리시에 약 50% 정도의 PGE₂ 생성이 억제되었고, 특히 ethylacetate 분획물의 경우는 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도에서도 50% 이상의 억제 활성을 보여 가장 큰 억제 활성을 보였다. 따라서 몰로키아 분획물은 PGE₂의 생성을 억제하여 염증을 저해 혹은 경감시켜 줄 수 있을 것으로 생각된다

도 10에 있어서, M: methanol extract, H: *n*-hexane fraction, C: chloroform fraction, E: ethylacetate fraction, LPS: alone, Con: control.을 나타낸다.

2.3.4 TNF- α 생성억제

염증성 cytokine의 일종인 TNF- α 는 혈관 내피세포의 NF κ B를 활성화시켜 VCAM 및 ICAM 등의 부착물질과 결합하게 함으로서 동맥경화를 유발시키는 인자로 알려져 있다.

몰로키아 추출물 및 분획물을 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell에서 TNF- α 의 생성억제활성을 확인하였다. 도 11

과 같이 LPS에 의해 증가된 TNF- α 가 몰로키아 메탄올추출물 및 hexane, chloroform, ethylacetate 분획물의 첨가 농도에 반비례하여 생성이 저해되었으며, 특히 chloroform과 ethylacetate 분획물에서 현저하게 TNF- α 의 생성이 억제되었다. 몰로키아 ethylacetate 분획물의 경우는 25 μ g/mL 처리농도에서도 40% 이상의 TNF- α 의 생성이 억제되어 가장 높은 TNF- α 의 생성 억제능을 보였다.

<129> 도 11에서 M: methanol extract, H: *n*-hexane fraction, C: chloroform fraction, E: ethylacetate fraction, LPS: alone, Con: control을 나타낸다.

<130> 2.3.5 동맥경화 관련 유전자의 발현에 미치는 효과

<131> 2.3.5.1 VCAM-1, ICAM-1 발현

<132> LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에 몰로키아 추출물이 adhesion molecule의 생성에 미치는 영향을 관찰하고자, 동맥경화의 초기 현상에 관여하는 soluble VCAM-1, ICAM-1의 유전자 발현을 RT-PCR법으로 확인하였으며 그 결과를 도 12에 나타내었다. 몰로키아 메탄올 추출물을 농도별로 처리했을 때 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현은 처리농도가 증가할수록 유전자의 발현이 감소되었다. 그러나 이들 유전자의 발현에 사용된 mRNA 양을 표준화하기 위하여 선택된 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 발현은 시료 처리 농도에 따른 차이를 보이지 않아 LPS 처리가 목표 유전자 발현에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

<133> 염증이 일어나는 초기단계에는 내피세포의 표면에 VCAM-1, ICAM-1과 같은 세포부착 물질의 발현이 증가하여 혈액 속을 순환하고 있던 백혈구, 단핵구를 내피 속으로 유인함으로써 동맥경화를 심화시키고 LPS에 의한 염증성 cytokine과 IL-1 등이 혈관내피의 세포부착물질들의 발현을 증가시키게 된다. 그러므로 몰로키아의 메탄올 추출물은 세포부착물질의 유전자 발현을 현저히 감소시킴으로써 동맥경화 초기 발생과정을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

<134> 2.3.5.2 MCP-1, iNOS, COX-2 발현

<135> 최근 대식세포나 연골세포에서 사이토카인 및 LPS가 유도한 iNOS 발현을 조절하는 NF κ B 활성을 억제하는 폴리페놀 화합물에 대한 연구는 매우 활발하다. 이에 몰로키아 내에 함유된 폴리페놀 화합물인 quercetin, chlorogenic acid, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside와 LPS를 처리한 RAW 264.7 cell에서 monocyte chemotactic protein-1(MCP-1), inducible NOS(iNOS) 및 COX-2 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR법으로 확인하였다.

<136> MCP-1은 동맥경화증 병변형성의 초기단계에서 대식세포에 의해 주로 발현되는 것으로 알려져 있으며, 또한 평활근에 의해서도 발현된다고 한다. 몰로키아 메탄올 추출물에서는 100 μ g/mL이상에서 MCP-1 유전자 발현이 감소되었고, iNOS에서는 500 μ g/mL에서 현저히 감소하였다. 이를 도 13에 나타내었다.

<137> 그리고 각 몰로키아 폴리페놀 화합물별 처리 농도는 세포생존률 실험결과를 토대로 독성이 없는 농도를 설정하여 실험을 수행하였다. iNOS에서의 유전자 발현을 살펴본 결과, quercetin은 25 μ g/mL에서 iNOS의 유전자 발현이 감소하였고, chlorogenic acid는 변화가 없었으며, quercetin-3-galactoside에서는 10 μ g/mL, quercetin-3-glucoside에서는 5 μ g/mL이상에서 iNOS 유전자 발현이 감소하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.

<138> COX-2 발현에서는 quercetin과 chlorogenic acid의 25 μ g/mL 농도에서 각각 유전자 발현이 감소되었고, quercetin-3-galactoside은 10 μ g/mL에서 현저히 감소하였다. 반면, quercetin-3-glucoside는 COX-2 유전자 발현에 영향이 없었다. 그 결과를 도 15에 나타내었다.

<139> 혈관이완과 혈소판응집, 심혈관 항상성의 조절기전에 관련이 있는 NO 생성 유도 효소인 iNOS의 경우도 LPS 처리구에 비해 몰로키아 메탄올 추출물과 몰로키아 폴리페놀 화합물을 농도별로 처리하였을 때 도 14에서 보는 바와 같이 quercetin, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside에서 감소되었다.

<140> 도 14에서 1: control, 2: LPS: alone, Q(3-5): 5, 15, 25 μ g, CA(3-5): 10, 25, 50 μ g, Qgc(3-5): 1, 5, 10 μ g Qgu(3-5): 1, 5, 10 μ g, Q: Quercetin, CA: Chlorogenic acid, Qgc: Quercetin-3-galactoside, Qgu: Quercetin-3-glucoside를 나타낸다.

<141> iNOS는 평소에는 세포내 존재하지 않으나 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라, 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. NO는 염증과 암의 발생에 관여하며, iNOS의 발현은 NF κ B 활성으로 유

도되며, 이는 macrophage에서 LPS나 cytokine에 의해 염증성 매개물들이 과잉 생산되는 중요한 메카니즘이 된다. 몇 가지 천연 항산화 물질인 polyphenol 화합물들은 직접적으로 NF κ B 의존성 cytokine과 iNOS 유전자의 발현을 저해하여 염증을 억제하는 것으로 알려져 있다. RAW 264.7 cell에서 LPS(1 μ g/mL)를 사용하여 NO의 생성을 유도한 후 몰로키아 추출물과 폴리페놀 화합물을 농도별로 처리하였을 때 iNOS 유전자 발현이 처리농도가 클수록 감소되었으며, COX-2의 생성 및 활성이 억제됨으로써 몰로키아 폴리페놀 화합물들이 항염증 효과가 있을 것으로 보인다.

<142> COX는 arachidonic acid를 prostaglandinE₂(PGE₂)로 전환시키는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판을 형성, 위벽보호, 신장 기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용한다. 많은 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며, 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것이다. RAW 264.7 cell에 LPS(1 μ g/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 몰로키아 폴리페놀 화합물을 농도별로 처리하였을 때 이들 시료에서 처리농도가 증가할수록 유전자 발현이 억제되는 것을 확인하였으며, 그 결과를 도 15로 나타내었다.

<143> 도 15에서 1: control, 2: LPS: alone, Q(3-5): 5, 15, 25 μ g, CA(3-5): 10, 25, 50 μ g, Qgc(3-5): 1, 5, 10 μ g, Qgu(3-5): 1, 5, 10 μ g, Q: Quercetin, CA: Chlorogenic acid, Qgc: Quercetin-3-galactoside, Qgu: Quercetin-3-glucoside를 나타낸다.

<144> 따라서 COX-2에 의한 PGE₂의 합성은 염증반응을 촉진하는 것으로 생각되며, COX-2의 생성 및 활성을 억제하는 몰로키아 항산화 물질들이 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

<145> 이상의 결과들을 토대로 몰로키아 추출물과 몰로키아의 폴리페놀 화합물들이 LPS에 의하여 증가된 MCP-1, iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 억제함으로써 염증 예방 물질로 작용할 수 있을 것으로 보인다.

<146> 2.3.5.3 NF κ B의 단백질 발현

<147> NF κ B는 cytokine반응, 염증, 세포 성장 조절과 같은 다양한 단계에 관여하는 전사인자로, 최근 연구는 inducible NF κ B가 죽상동맥경화 발병에 관여함을 강하게 암시하고 있다. 여러 세포에서 NF κ B는 세포질로부터 핵으로의 다양한 신호 전달에 관여하는 redox-sensitive transcription factor로 세포질속에서 p50, p65, I κ B subunit의 trimer로 존재하며, 산화적 스트레스에 의해 I κ B가 분해되면 p50, p65 heterodimer가 핵 속으로 이동하여 연속적인 DNA 결합을 초래하는 것으로 알려져 있다.

<148> LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에 몰로키아 추출물과 분획물, 그리고 quercetin, chlorogenic acid, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside가 NF κ B 활성화에 미치는 영향을 확인해 보았다. 그 결과, LPS만 처리하면 NF κ B의 활성이 유도되었지만, 몰로키아 메탄올 추출물을 처리하면 LPS 처리구에 비해 처리농도가 증가할수록 NF κ B의 활성이 억제되었는바, 이를 도 16으로 나타내었다. 그리고 몰로키아 추출물 250 μ g/mL, ethylacetate 분획물 100 μ g/mL첨가 농도에서 LPS 처리구보다 약 3배 정도의 NF κ B 활성이 감소되었으며, 특히 ethylacetate 분획물 100 μ g/mL 농도에서 NF κ B 활성이 가장 크게 저해되었으며, 이를 도 17로 나타내었다. 또한 세포생존률 측정 시에 독성이 없는 농도인 quercetin 25 μ g/mL, chlorogenic acid 50 μ g/mL, quercetin-3-galactoside 10 μ g/mL, quercetin-3-glucoside 10 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 이들 처리구에서 LPS 처리구에 비해 NF κ B 활성이 약 4배 정도 감소되었으며 이를 도 18로 나타내었다.

<149> 이러한 결과로부터 몰로키아 methanol 추출물, ethylacetate 분획물 그리고 quercetin, chlorogenic acid, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside 등의 폴리페놀 화합물도 산화적 스트레스 혹은 염증의 전사인자인 NF κ B 활성을 억제시킴을 확인할 수 있다.

<150> 도 17에서 M250: methanol extract 250 μ g/mL, E100: ethylacetate fraction 100 μ g/mL, C50: chloroform fraction 50 μ g/mL, H50: hexane fraction 50 μ g/mL을 나타낸다.

<151> 또한 도 18에 있어서 Q25: quercetin 25 μ g/mL, CA50: chlorogenic acid 50 μ g/mL, Qgc10: quercetin-3-galactoside 10 μ g/mL, Qgu10: quercetin-3-glucoside 10 μ g/mL을 나타낸다.

<152> 2.3.5.4 IL-1 β 의 단백질 발현

<153> IL-1 β 는 TNF- α 와 함께 작용하여 감염이나 종양이 있을 때 나타나는 면역반응에서 inflammatory cytokine으로 작용한다. 또한 염증반응에 있어서 TNF- α 는 혈액과 조직사이의 구조물인 내피세포를 자극하여 ICAM-1, VCAM-1과 같은 부착물질들의 생산을 촉진하여 각종 백혈구들을 염증부위로 이동시키는 역할도 한다. 이러한 기

전들을 통하여 염증부위에 축적된 백혈구는 각종 cytokine을 지속적으로 분비하여 미생물과 종양세포에 대한 독성을 유지하기도 하며, 염증반응을 유발시켜 조직을 손상시키기도 한다.

<154> LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에 몰로키아 추출물과 분획물 및 폴리페놀 화합물인 quercetin, chlorogenic acid, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside가 interleukine- β (IL-1 β) 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, 몰로키아 메탄올 추출물은 LPS 처리구에 비해 처리농도가 증가할수록 IL-1 β 의 활성이 더 크게 억제되었는바, 그 결과를 도 19로 나타내었다. 그리고 ethylacetate 분획물 100 μ g/mL, hexane 분획물 50 μ g/mL 첨가 농도에서 LPS 처리구보다 IL-1 β 활성이 약 3배 정도 감소되었으며, 특히 ethylacetate 분획물 100 μ g/mL 농도에서 가장 큰 IL-1 β 활성 저해를 보였는바, 그 결과를 도 20으로 나타내었다.

<155> 또한 세포 독성이 없는 농도인 quercetin 25 μ g/mL chlorogenic acid 50 μ g/mL quercetin-3-galactoside 10 μ g/mL, quercetin-3-glucoside 10 μ g/mL으로 처리한 결과, LPS 처리구에 비해 chlorogenic acid 및 quercetin-3-galactoside 처리구는 약 3배 정도의 IL-1 β 활성이 감소되었고, quercetin 및 quercetin-3-glucoside를 처리했을 때는 약 2배 정도 IL-1 β 활성이 저해되었는바, 그 결과를 도 21로 나타내었다.

<156> 이처럼 몰로키아 methanol 추출물, ethylacetate 분획물 그리고 quercetin, chlorogenic acid, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside 등도 RAW 264.7 cell 에서 IL-1 β 가 유도한 iNOS 발현의 전사단계인 NF κ B 활성을 차단하여 NO 생성을 억제함으로써 몰로키아의 폴리페놀 화합물이 IL-1 β 활성을 억제시킴을 알 수 있다.

<157> 한편 도 20에 있어서, M250: methanol extract 250 μ g/mL, E100: ethylacetate fraction 100 μ g/mL, C50: chloroform fraction 50 μ g/mL, H50: *n*-hexane fraction 50 μ g/mL.를 나타낸다.

<158> 도 21에 있어서, Q25: quercetin 25 μ g/mL, CA50: chlorogenic acid 50 μ g/mL, Qgc10: quercetin-3-galactoside 10 μ g/mL, Qgu10: quercetin-3-glucoside 10 μ g/mL를 나타낸다.

<159> 한편 몰로키아 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 육류, 음료수, 초콜렛, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알콜음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<160> 이와 같이 식품에 적용하게 되면 성인 및 노인층의 광범위한 계층에 이르기까지 늘 간편하게 몰로키아 추출물을 간편하게 섭취할 수 있어 지속적인 음용 효과를 기대할 수 있다.

<161> 본 발명에서 이와 같은 몰로키아 추출물, 특히 활성이 우수한 몰로키아 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 식품에 적용하는 경우 전체 조성물에 대해 적어도 0.01중량% 이상 함유하는 것이 효과적인 측면에서 바람직하다. 몰로키아 추출물의 경우 그 함량이 과량으로 포함되더라도 독성을 나타내지는 않으므로 그 첨가량의 상한을 설정하는 것은 각별한 의미가 없다 할 것이다.

<162> 식품으로의 제조의 일예를 보면 다음과 같을 수 있으나 각 식품 조성에 한정이 있는 것이 아님은 물론이다.

<163> (1) 기능성 음료의 제조

<164> 몰로키아 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물 0.01중량%, 식용색소 0.05중량%, 오렌지 에센스 0.05중량%, 과다 7.0중량%, 구연산 0.1중량%, 비타민 C 0.05중량%를 포함하는 일반 기능성 음료 베이스를 첨가한 조성물을 제조한 다음, 정제수를 가하여 음료를 제조하였다.

<165> (2) 약술의 제조

<166> 탈취 정제된 40중량%의 알코올을 증류수로 희석하고, 몰로키아 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물 0.01중량%를 첨가하고, 스테비오사이드, 고과당, 아미노산, 구연산, 소금 등을 첨가하여 알코올 함유 농도 15 내지 30 중량%로 제조하였다.

<167> (3) 건강 식품의 제조

<168> 몰로키아 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물 1,000mg, 적량의 비타민 혼합물(비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg), 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 적량의 무기질 혼합물(황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산

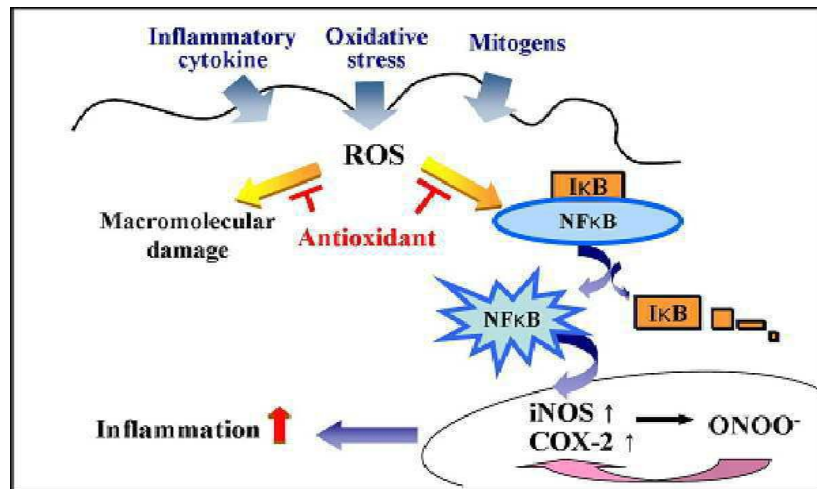
칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg)을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용한다.

도면의 간단한 설명

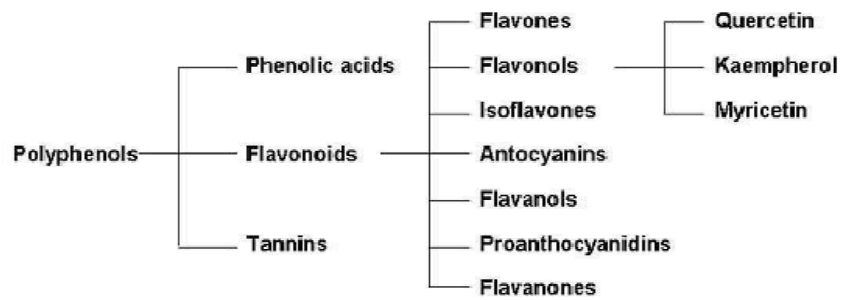
- <169> 도 1은 항산화제의 가능한 활성부위의 모식도.
- <170> 도 2는 폴리페놀류의 주요 분류.
- <171> 도 3은 부틸레이티드 하이드록시아니솔(BHA), 몰로키아 메탄올 추출물 및 분획물들의 DPPH 라디칼 소거활성.
- <172> 도 4는 트롤록스(Trolox), 몰로키아 메탄올 추출물 및 분획물들의 ABTS 라디칼 소거활성.
- <173> 도 5는 몰로키아로부터 분리된 페놀성 항산화제의 화학구조.
- <174> 도 6은 몰로키아 메탄올 추출물 및 분획물의 HPLC 크로마토그램들.
- <175> 도 7은 몰로키아 메탄올 추출물 및 분획물의 RAW 264.7 cells 증식에 미치는 효과.
- <176> 도 8은 RAW 264.7 cells 내에서 NO 생성에 대한 LPS 농도에 따른 효과(A) 및 항온 온도에 따른 효과(B)를 나타낸 그래프.
- <177> 도 9는 몰로키아 메탄올 추출물 및 분획물의 LPS-처리 RAW 264.7 cells내에서 NO 생성에 미치는 영향을 본 그래프.
- <178> 도 10은 몰로키아 메탄올 추출물 및 분획물들이 LPS-유도 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 본 그래프.
- <179> 도 11은 몰로키아 메탄올 추출물과 분획물이 RAW 264.7 cells내에서 LPS-유도 TNF- α 생성에 미치는 영향을 본 그래프.
- <180> 도 12는 LPS-induced RAW 264.7 cells내에서 몰로키아 메탄올 추출물의 VCAM-1 저해효과(A) 및 ICAM-1 저해효과(B)를 본 그래프.
- <181> 도 13은 LPS-induced RAW 264.7 cells내에서 몰로키아 메탄올 추출물의 MCP-1 저해효과(A) 및 iNOS 저해효과(B)를 본 그래프.
- <182> 도 14는 LPS-induced RAW 264.7 cells내에서 몰로키아 화합물들의 iNOS 저해효과를 본 그래프.
- <183> 도 15는 LPS-induced RAW 264.7 cells내에서 몰로키아 화합물들의 COX-2 저해효과를 본 그래프.
- <184> 도 16은 몰로키아 메탄올 추출물이 LPS-induced RAW 264.7 cells 내에서 NF- κ B 생성에 미치는 영향을 본 그래프.
- <185> 도 17은 몰로키아 분획물들이 LPS-induced RAW 264.7 cells 내에서 NF- κ B 생성에 미치는 영향을 본 그래프.
- <186> 도 18은 LPS-induced RAW 264.7 cells내에서 몰로키아 화합물들의 NF- κ B 저해효과를 본 그래프.
- <187> 도 19은 몰로키아 메탄올 추출물이 LPS-induced RAW 264.7 cells 내에서 IL-1 β 생성에 미치는 영향을 본 그래프.
- <188> 도 20은 몰로키아 분획물들이 LPS-induced RAW 264.7 cells 내에서 IL-1 β 생성에 미치는 영향을 본 그래프.
- <189> 도 21은 LPS-induced RAW 264.7 cells내에서 몰로키아 화합물들의 IL-1 β 저해효과를 본 그래프.

도면

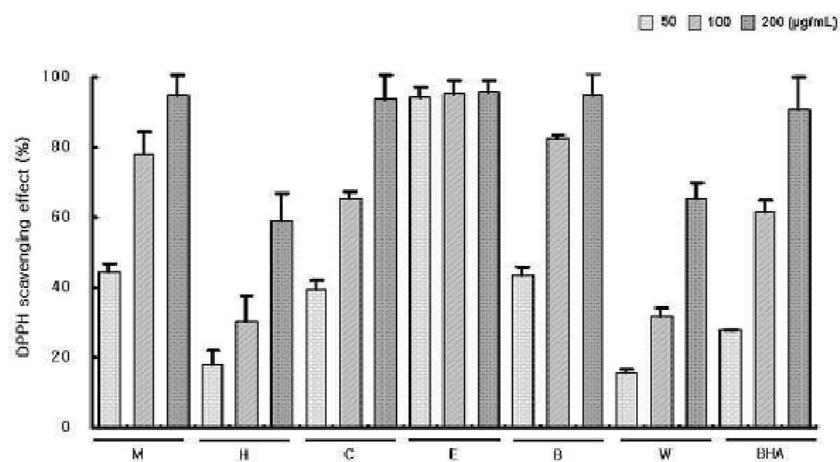
도면1



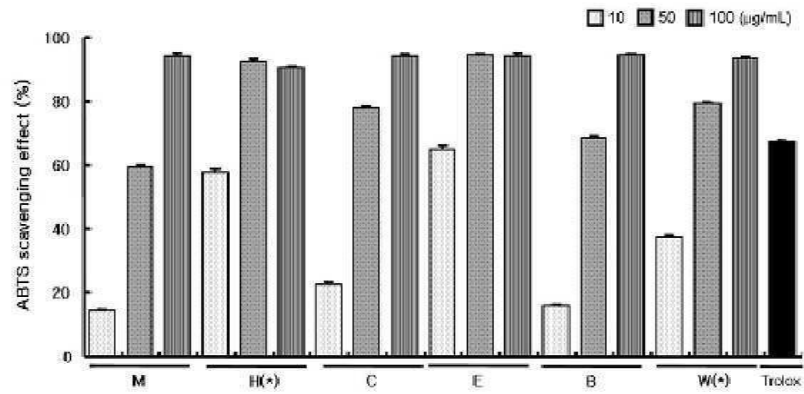
도면2



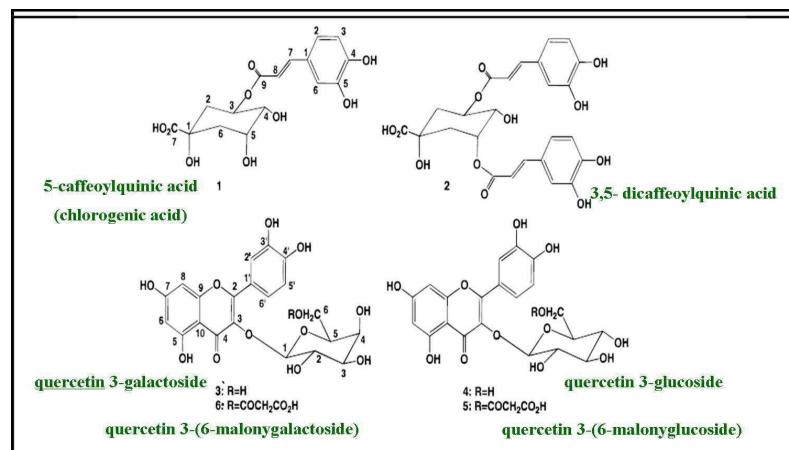
도면3



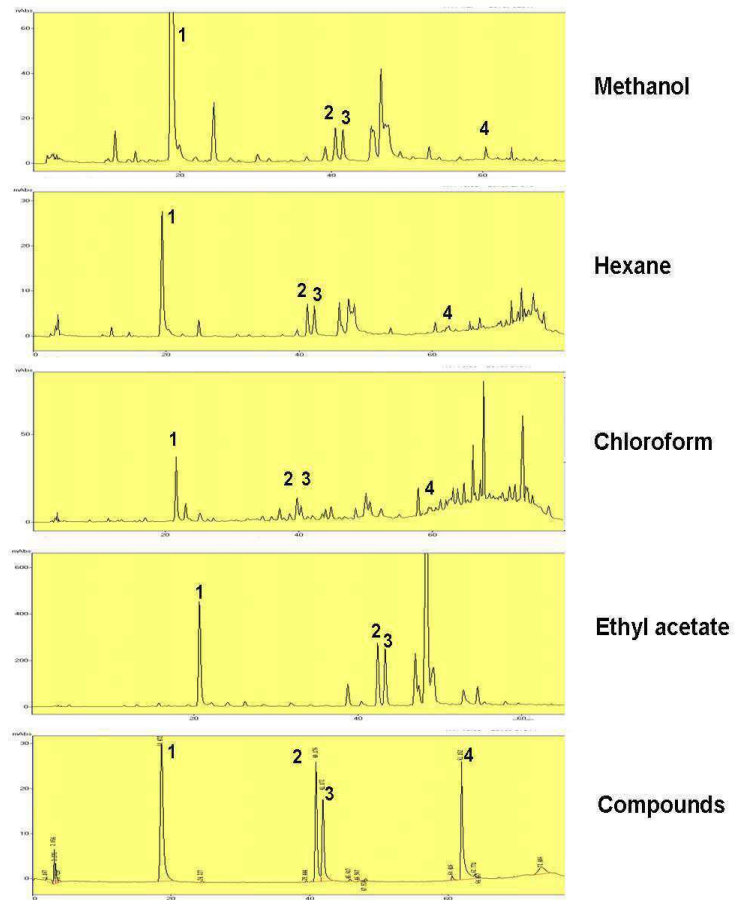
도면4



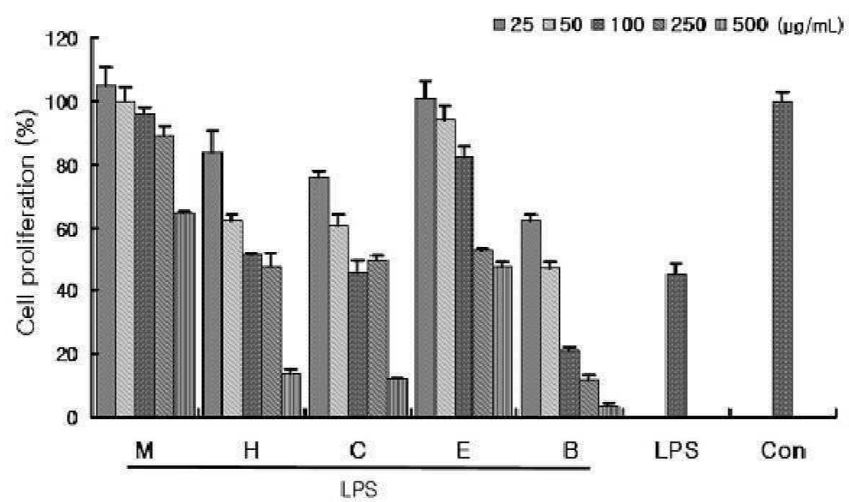
도면5



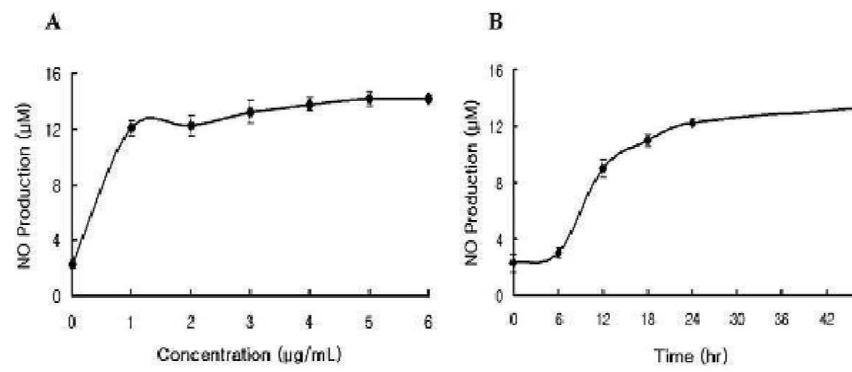
도면6



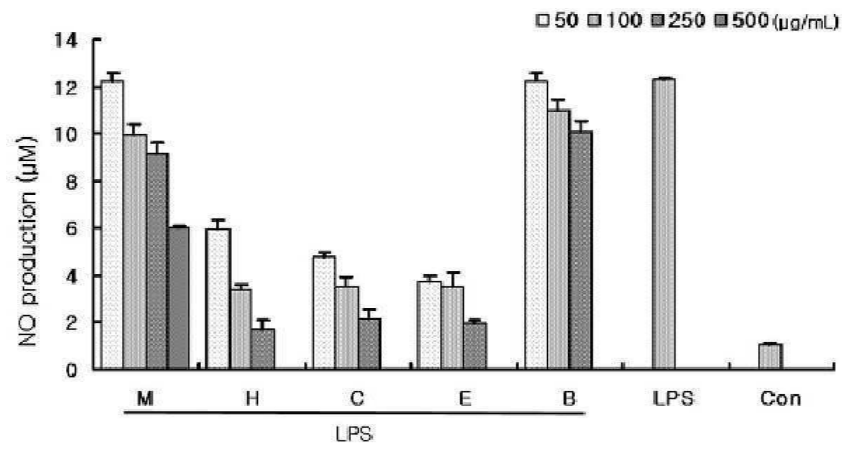
도면7



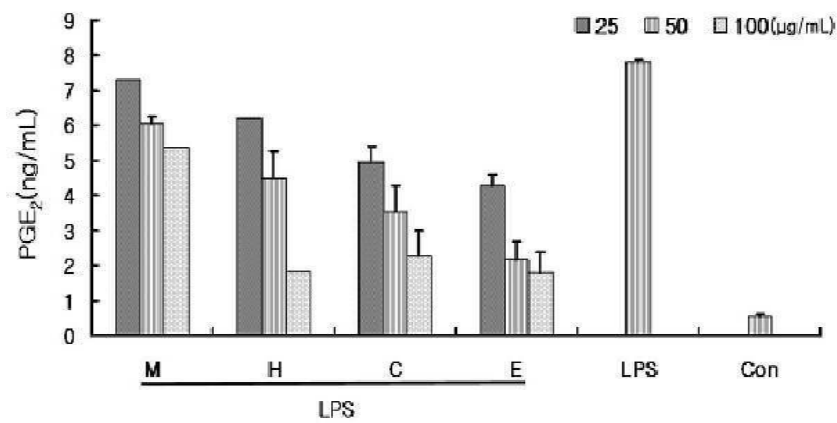
도면8



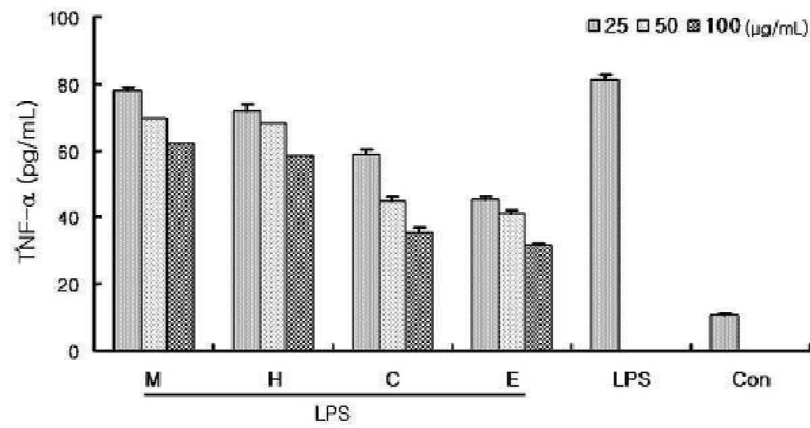
도면9



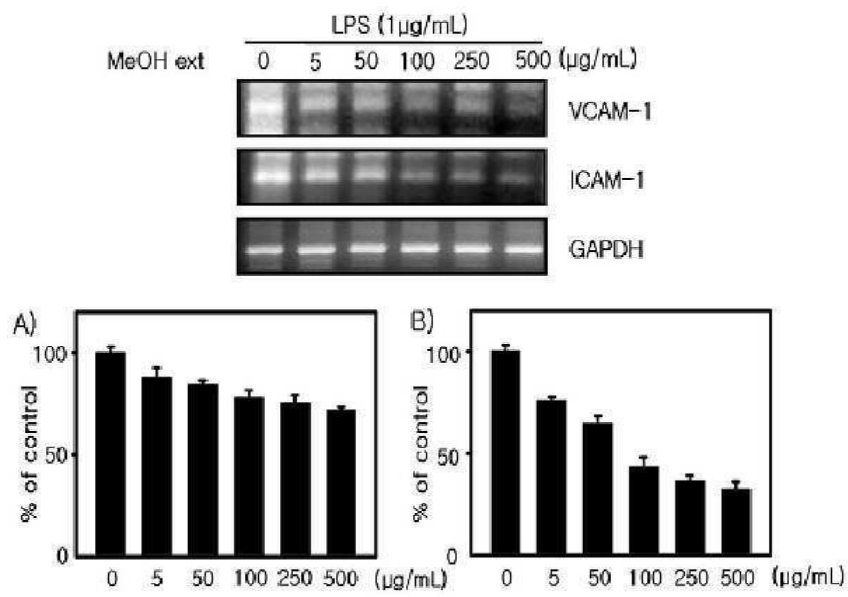
도면10



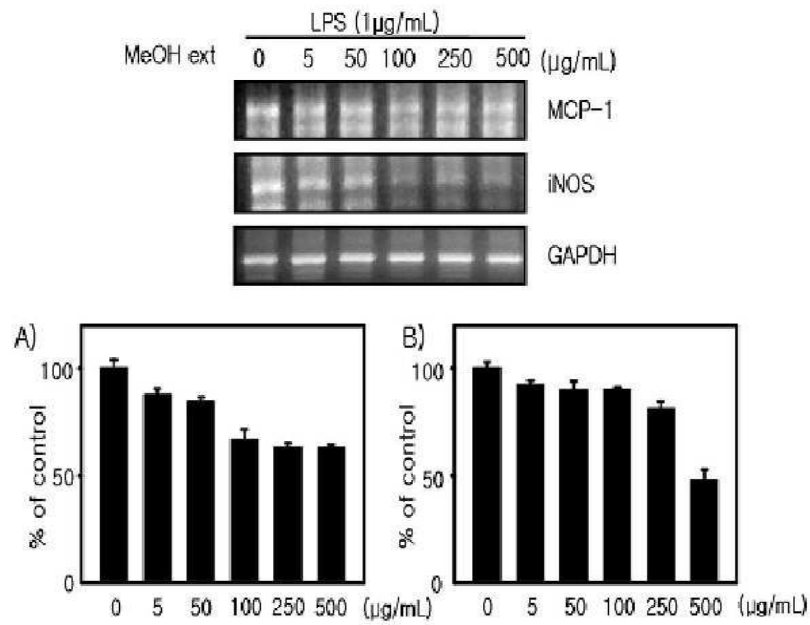
도면11



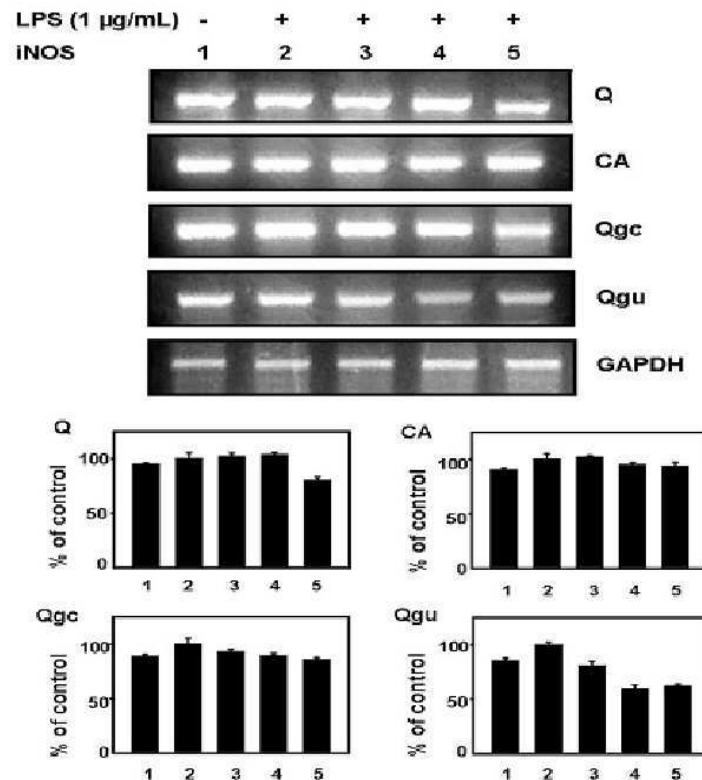
도면12



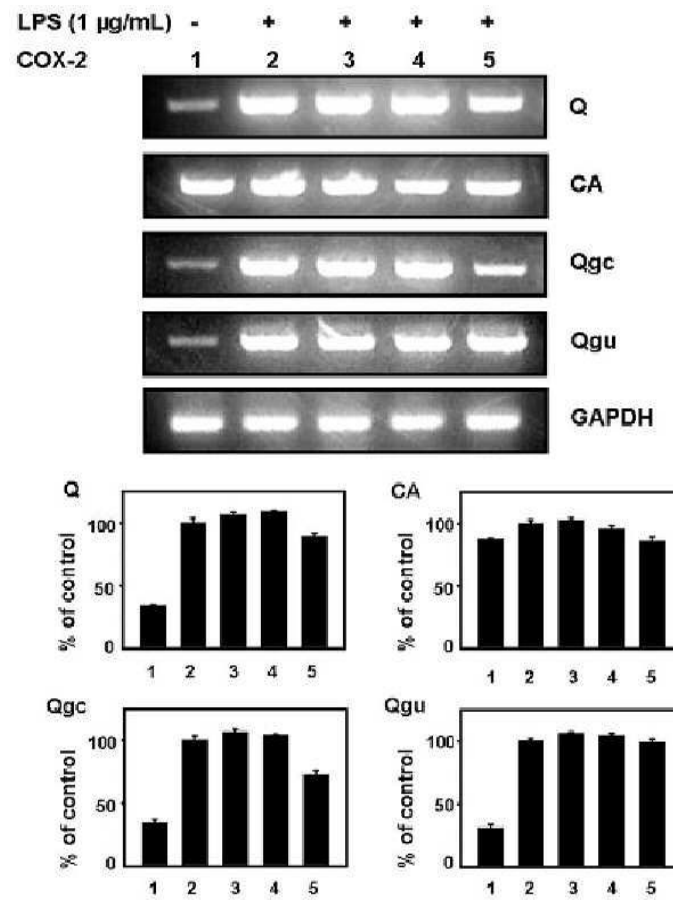
도면13



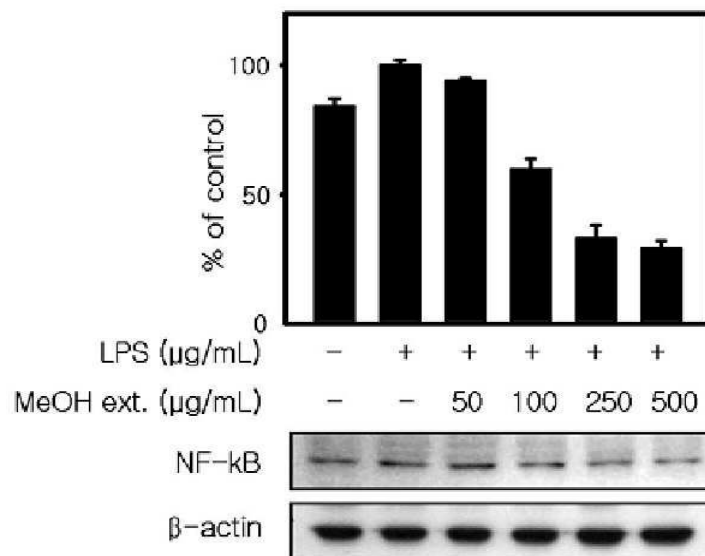
도면14



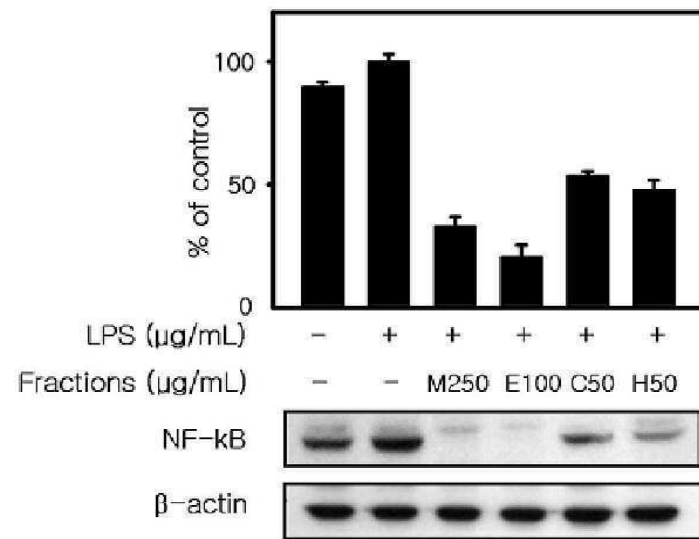
도면15



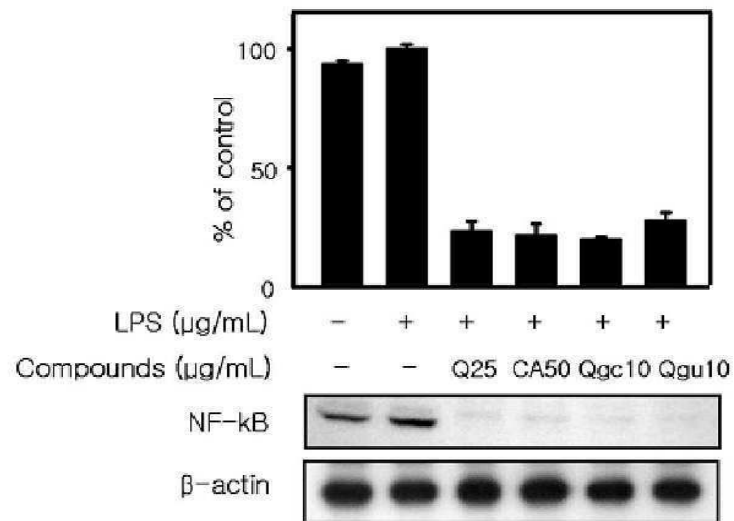
도면16



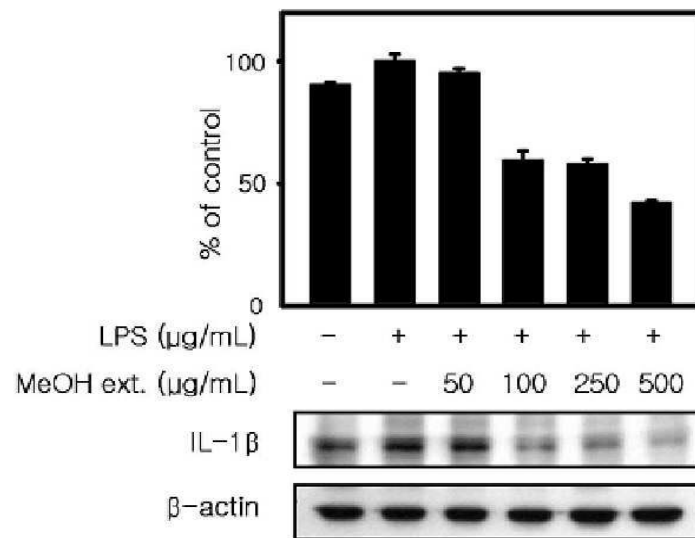
도면17



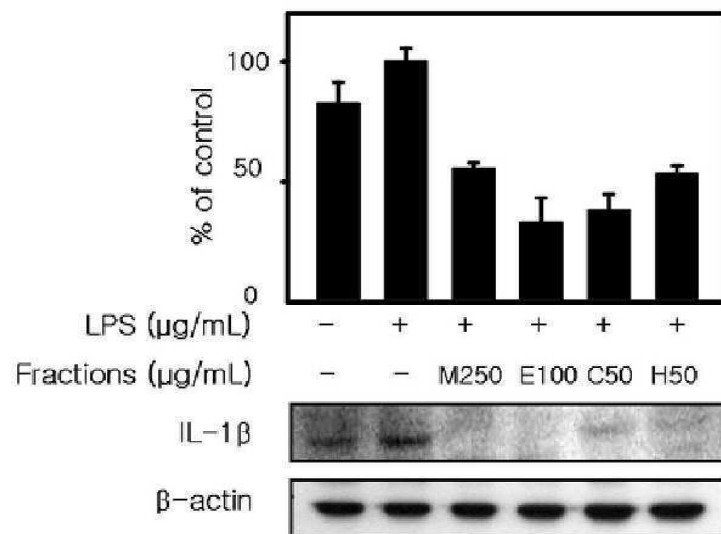
도면18



도면19



도면20



도면21

