



# 고려엉겅퀴 에탄올 추출물의 대식세포에서의 항염효능과 정상 및 ovalbumin 감작 Balb/c에서 혈청 면역글로블린에 대한 효능

## Anti-inflammatory Effect of *Cirsium Setidens* Ethanol Extract on Macrophages and Effect on Immunoglobulins in Normal or Ovalbumin Sensitized Balb/c Mouse

김지은<sup>1</sup> · 최창업<sup>2</sup> · 이선영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>유성호텔 조리실

Kim, Ji Eun<sup>1</sup> · Choi, Chang Up<sup>2</sup> · Ly, Sun Yung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

<sup>2</sup>Culinary Department, Yousung Hotel

### Abstract

This study evaluated the anti-inflammatory effects of *Cirsium setidens* ethanol extract on raw 264.7 cells and effect on serum immunoglobulins in normal and ovalbumin-sensitized Balb/c mouse. In animal experiments, the Balb/c mice were randomly divided into four to five groups, which may or may not be ovalbumin-sensitized. Mice were administered AIN-93G basal diet (for control groups, NC or SC) or AIN-93G diet mixed with 2.5%(G-2.5), 5%(G-5), and 10%(G-10) *Cirsium setidens* extracts (treated groups) for 7 weeks. The serum IgE and IgG1 levels and the degree of oxidative DNA damage were evaluated. The results showed that the NO release from raw cell was not significantly changed by the *Cirsium setidens* ethanol extract, whereas the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were significantly decreased from 500 and 250  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. In non-sensitized animal experiments, the serum IgE concentration of the experimental groups was dose-dependently reduced compared with the control group ( $P<0.05$ ). The tail length and moment resulting from DNA fragmentation of blood white cells decreased significantly in G-5 and G-10 groups. In the OVA-sensitized animal experiment, the serum OVA-specific IgE levels were significantly decreased in groups fed with *Cirsium setidens* extract. The tail DNA and tail moment in all the experimental groups decreased compared with the SC group. *Cirsium setidens* is a vegetable with antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties, which warrant additional research.

**Key words:** anti-inflammatory effect, anti-oxidant effect, ethanol extract of *Cirsium setidens*

### I. 서론

염증이란 외상과 같은 물리화학적 요인과 세균 및 바이러스 등에 의한 생물학적 요인이 침입하여 일으키는 작용에 대해 반응하는 생체의 방어 반응을 뜻한다. 특히 만성

\* Corresponding Author: Ly, Sun Yung  
Tel: +82-42-821-6838, Fax: +82-042-821-8968  
E-mai: sunly@cnu.ac.kr

염증은 바이러스에 의한 감염, 외부항원의 침입, 자가면역 반응 등에 의하여 발생되며 대식세포와 같은 단핵세포와 밀접한 관련성을 가진다. 염증발생 시 염증부위에 면역세포들이 침투되고 이들 세포들에 의해 여러 종류의 화학물질 및 cytokine를 분비하여 생체방어 및 염증반응을 일으킨다. 대식세포는 체내의 모든 조직에 분포하면서 1차적으로 bacteria와 virus 등의 병원체 뿐만 아니라 암세포에 대해 탐식작용을 통한 방어능력을 가지며, 다양한 염증 유발 cytokine과 생리활성물질을 분비하여 면역반응을 극대화시키는 중요한 매개체 역할을 한다(Yu et al., 2012). 대식세포는 감염초기에 nitric oxide(NO), tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ ) 등을 분비하여 생체방어에 중요한 역할을 하는데, 이 물질들에 의해 염증이 유발되기에 일명 염증매개물질이라 하기도 한다(Lee et al., 2010). NO는 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 역할을 하지만, 병리적 원인에 의해 과도하게 생성되면 염증을 유발시키게 되며, 조직손상이나 유전자 변이 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(Rodeberg et al., 1995). TNF- $\alpha$ 는 다양한 세포의 성장과 분화를 조절하며, 세포에 독성을 일으키고, 혈관 형성, 골 흡수, 혈전 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Aggarwal, 2003).

반면, 알레르기(allergy)는 비정상적으로 일어나는 면역학적 기전에 의하여 발생하는 과민반응의 일종이다. 알레르기의 질환의 증상으로는 비염, 아토피, 천식, 두드러기 등이 있으며, 면역글로불린(IgE)의 증가와 관련이 있다(Lee et al., 2009). 따라서 알레르기 질환의 대표적인 면역지표는 항원의 감작에 의한 B세포로부터의 면역글로불린의 증가이며 특히 IgE 항체는 mast cell을 활성화시키고 히스타민과 같은 화학매개물질을 유리시켜 혈관확장, 점막부종, 가려움증, 점액분비 증가 등을 유발한다. 또한 mast cell로부터 leukotriene, prostaglandin 등의 염증매개물질을 분비함으로써 염증반응을 일으키게 된다(Byun et al., 2003; Kim et al., 2009). 혈장에서 가장 풍부한 항체(80-85%)인 IgG는 항체의존 세포독성이나 신생아 면역과 관련이 있다(Abul et al., 2008; Sung et al., 2012). 알레르기 및 아토피 질환은 최근 산업화로 인한 도시환경의 변화, 식습관의 변화, 환경오염에 의해 발생하는 화학적, 생물학적 노출에 의해 다양한 연령층에서의 발생이 증가하고 있으며(Kim et al., 2012; Heo & Kim, 2008), 알레르기 질환 등의 만성 질환은 특히 경제적으로 발전된 나라에서 꾸준히 증가하는 추세이다(Kang et al., 2013a; Jo et al., 2010). 이에 따라 지금까지 인류가 섭취

해 온 천연물질로부터 변화된 면역기능을 조정하여 정상으로 회복시키거나 이러한 변화를 최대한 경감시키고 생체방어능력을 증강시키는 물질을 탐색하려는 연구가 진행되고 있다(Pyo, 2001). Ovalbumin(OVA)은 달걀 흰자 단백질로서 주요한 allergen으로 알려져 있으며, 달걀 흰자 단백질 중 약 54%로 가장 많은 비율을 차지하고 있다(Lee et al., 2011). OVA를 이용한 알레르기 반응을 유발하는 마우스 모델에서 IgE, histamin 분비, Th2 type의 항체, cytokine의 증가가 나타나며, OVA는 알레르기 연구를 위한 실험 동물 모델 안에서 광범위하게 사용된다(Kim, 2008; Lim et al., 2006).

고려엉겅퀴(*Cirsium setidens*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 '곤드레'라는 나물로 알려져 있다. 고려엉겅퀴는 강원지역에 분포하는 우리나라 특산식물의 하나로서 매년 5월에 채취하여 식용으로 사용되고 있으며, 맛이 부드럽고 향이 독특한 것이 특징이다(Lee et al., 2006). 특히 잎과 줄기에 단백질, 탄수화물, 지방, 회분, 무기질, 비타민 등의 영양성분이 많이 함유되어 있어 성인병 예방에 좋으며(Chang et al., 2012) 고유 독성이 없고, 토혈, 혈뇨, 대하, 간염, 고혈압 등의 치료 효능을 지니고 있어 건강기능식품으로서 가치가 매우 높다(Surh et al., 2009). 고려엉겅퀴에 관한 연구는 폭넓게 이루어져 있지 않으나 항산화 및 항노화, 항암효과의 가능성을 밝힌 일부 연구결과가 보고되고 있다. 고려엉겅퀴 추출물은 사람의 섬유아세포에서 자외선에 의해 유도된 MMP-1(Matrix Metalloproteinase-1) 발현을 저해하고, 피부의 탄력을 개선시키는 효과를 나타내었고(Sim et al., 2007), Hur et al.(2010)의 연구에 의하면 고려엉겅퀴 지상부 추출물에서 우수한 항산화능 및 멜라닌 생성 세포의 사멸효과를 나타내어 미백효과 면에서 기능성 화장품의 소재로 활용될 수 있을 것으로 보고하기도 하였다. 또한 고려엉겅퀴에서 분리해낸 화합물 중 terpenes류인 24-hydroperoxycycloart-25-en-3beta-ol 등은 사람의 암세포주에 대해 세포독성 효과를 나타내기도 하였다(Lee et al., 2002). Lee et al.(2009)의 연구에 의하면 고려엉겅퀴 뿌리로부터 추출된 Syringin이 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7세포에서 nitric oxide(NO)의 생성량을 감소시켰다고 하였다. 일반적으로 식품은 약제와 달리 과도한 면역 활성을 조절할 수 있는 방향으로 생리활성을 나타낼 수 있는 소재들이 많아 본 연구에서는 동의보감에 수록된 면역 관련 식품들 중 면역조절능을 갖는 소재의 하나로 고려엉겅퀴의 생리활성을 보고자 하였다. 이에 고려엉겅퀴 추출물이

대식세포주에서 항염 효능을 보이는지와 7주간의 추출물 섭취로 인하여 정상 Balb/c 마우스 및 OVA로 감작시킨 마우스에서 혈액의 면역글로불린 농도에 미치는 영향을 평가하고 항산화 효능의 지표로 DNA damage에 미치는 효과를 평가하였다.

## II. 연구방법

### 1. 고려영경귀 에탄을 추출물

강원도 인제군 소재의 영농조합법인에서 자연채취하여 일광건조한 고려영경귀 건나물을 구입하여 연구실에서 열풍건조하고 믹서에 곱게 갈아 분말화하였다. 고려영경귀 건조분말을 체에 쳐서 균일하게 한 후 1:9(w/v) 비율로 80% ethanol을 가하여 상온에서 24시간 추출한 다음, 여과(Whatman No.4, England), 감압농축(EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan), 동결건조(SFDSM12-60Hz, Samwon Freezing Engineering Co., Seoul, Korea) 후 -3°C 이하로 냉동보관 하여 사용하였다. 고려영경귀의 영양소 함량은 국가표준식품성분표를 활용하여 실험동물의 사료 제조에 활용하였다. 농촌진흥청에서 제시한 고려영경귀의 영양소 함량은 <Table 1>과 같다.

### 2. 세포배양 및 NO와 염증성 사이토카인 측정

Raw 264.7 cell은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA)과 antibiotics가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)배지로 배양하였다. Raw 264.7 세포는 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 희석하여 96 well plate에 100 µl씩 분주하고 24시간 배양 후 고려영경귀 에탄을 추출물을 농도별로 1 µl씩 처리해 주고 동시에 lipopolysaccharide (LPS)를 1 µg/ml 농도로 처리해 주었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

incubator에서 24시간 배양후 상층액 50 µl와 Griess reagent 50 µl를 혼합시켜 실온에서 10분간 암반응 시키고 ELIZA microplate reader(microplate absorbance spectrophotometer, Bio-Rad Inc., Hercules, California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 측정하였다. 사이토카인 측정시약은 mouse TNF ELIZA set(BD Biosciences, USA)와 mouse IL-1β ELIZA set (BD Biosciences, USA)를 사용하였다. 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 희석된 대식세포를 24 well plate에 500 µl씩 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 염증유도를 위해 TNF-α의 측정에서는 각 well에 100 µg/ml LPS를 5 µl씩 처리하였고 IL-1β의 측정에서는 각 well에 100 µg/ml LPS 5 µl와 1 ng/ml IFN-γ 5 µl를 처리하였다. Mitogen처리와 동시에 고려영경귀 시료를 5, 50, 500, 5,000 µg/ml의 농도로 5 µl씩 처리하고 24시간 배양 후 상층액을 수거하여 cytokines을 측정하였다.

### 3. 동물실험

본 연구에서는 2회의 동물실험을 수행하였다. 첫 실험은 고려영경귀 추출물 투여효과를 보려는 목적이었고 두 번째 실험은 ovoalbumin(OVA)으로 감작된 mouse에서 추출물의 효능을 보고자 하는 실험이었다. 두 실험 모두 동물은 6주령의 수컷 Balb/c 마우스를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였으며 1주간 사육실 환경에 적응시킨 후 평균 체중이 비슷하게 임의로 군당 7마리씩 4~5 군으로 나누어 micro ventilation clean system에서 자유 급식하게 하였다. 식이는 대조군 식이로는 AIN 93G diet 를, 실험군 식이로는 고려영경귀 추출물을 각각 2.5% (G-2.5군), 5%(G-5군), 10%(G-10군) 함유하는 식이를 제조하여 실험에 사용하였다<Table 2>. 실험 식이 급여 기간은 모두 7주였으며 사육실은 23±2°C, 습도 50±5%, 12 시간 dark/light cycle 조건을 유지하였다. 고려영경귀의

<Table 1> Composition of dried *Cirsium setidens* (per 100g edible portion)

	Energy (kcal)	Moisture (%)	Protein (g)	Fat (g)	Fiber (g)	Ash (g)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Vit A (µg)	Vit B <sub>1</sub> (mg)	Vit B <sub>2</sub> (mg)	Niacin (mg)	Vit C (mg)
<b>Dried <i>Cirsium setidens</i></b>	229	10.6	20.5	3.9	13.0	11.1	88.0	111.0	2.7	226	0.03	0.07	0.7	1.0

〈Table 2〉 Composition of the experimental diet<sup>1)</sup> (% of diet)

Ingredient	C(NC)	SC	G-2.5	G-5	G-10
Casein	20.00	20.00	19.50	19.00	18.00
Cornstarch	39.75	39.75	38.95	38.14	36.49
Dyetrose	13.20	13.20	12.87	12.54	11.88
Sucrose	10.00	10.00	9.75	9.50	9.00
Cellulose	5.00	5.00	4.68	4.37	3.78
Soybean Oil	7.00	7.00	6.83	6.65	6.30
Mineral Mix <sup>2)</sup>	3.50	3.50	3.41	3.33	3.15
Vitamin Mix <sup>3)</sup>	1.00	1.00	0.98	0.95	0.90
L-Cystine	0.30	0.30	0.29	0.29	0.27
Choline Bitartrate	0.25	0.25	0.24	0.24	0.23
Dried <i>Cirsium setidens</i> powder	-	-	2.50	5.00	10.00

<sup>1)</sup> The experimental groups were as follows :

C : Normal diet (AIN-93G diet), which is used in experiment I

NC : Normal diet (AIN-93G diet) + sterile PBS(i.p.), which is used in experiment II

SC : Normal diet (AIN-93G diet) + OVA(i.p.), which is used in experiment II

G-2.5 : 2.5% *Cirsium setidens* was mixed with the normal diet + OVA(i.p.)

G-5 : 5% *Cirsium setidens* was mixed with the normal diet + OVA(i.p.)

G-10 : 10% *Cirsium setidens* was mixed with the normal diet + OVA(i.p.)

<sup>2)</sup> AIN 93 Mineral mixture

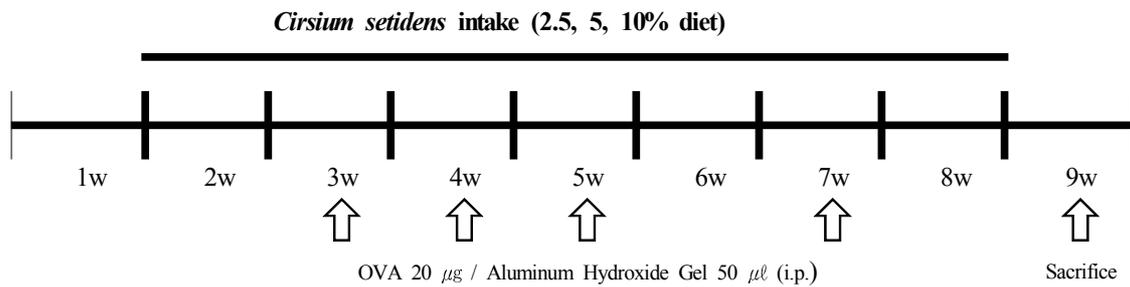
<sup>3)</sup> AIN 93 Vitamin mixture

식이섭유소 양은 국가표준식품성분표를 참고하였으며, 고려영성분 분말과 혼합한 식이의 최종 식이섭유소 양은 AIN 93G 식이의 배합율에 준하여 5%로 조절하였다. 제조한 식이는 4℃에 보관하면서 1-2일에 한번씩 신선한 식이를 제공하였다.

실험 2에서는 mouse를 ovalbumin으로 감작시켰으며 그 방법은 선행연구를 참고하여 다음과 같이 실시하였다 (Park. et al., 2005). 정상대조군(NC군)을 제외하고 나머지 4군(감작대조군(SC군), 추출물 투여군 G-2.5, G-5, G-10군)에 대하여 3주째부터 1주 간격으로 3회, 2주 간격으로 1회 mouse당 20μg의 ovalbumin(Grade V, Sigma chemical., St Louis, MO, USA)을 PBS 0.2mL에 녹인 aluminium hydroxide gel 2mg과 혼합하여 복강 투여하여 총 7주 동안 4회에 걸쳐 알레르기를 유도하였으며,

adjuvant로서 2 % aluminium hydroxide gel을 사용하였다[Figure 1]. NC군에는 OVA항원용액 대신에 동량의 멸균 PBS를 복강주사 하였다.

실험기간 동안 체중은 주 2회 측정하였으며, 희생 직전 측정된 체중을 마지막 체중으로 정하였다. 희생하기 전 약 12시간 이상 공복을 유지한 상황에서 DNA fragmentation을 측정하기 위한 전혈은 희생 하루 전 날 heparinized capillary tube를 이용하여 안와채혈로 수집하였고 희생 당일 날 심장 채혈하여 혈청을 분리하여 -70℃에서 냉동 보관하면서 cytokines 분석에 사용하였다. 심장 채혈 후 즉시 개방하여 간과 신장, 비장을 취해 PBS로 세척하여 흡습지에서 수분을 제거한 후 신장은 지방과 막을 제거한 후 무게를 측정하였다.



[Figure 1] Experimental design

#### 4. 혈청의 면역글로불린 측정

실험 1에서는 mouse 혈청의 IgE와 IgG를 각각 Bethyl 사(Moutgomery, TX)의 Mouse IgE ELISA Quantitation Set (Cat NO. E90-115)와 Mouse IgG1 ELISA Quantitation Set (Cat NO. E90-105)를 이용하여 측정하였다. 실험 2에서는 mouse 혈청의 OVA-specific IgE와 OVA-specific IgG1를 각각 Biolegend사 mouse specific IgE ELISA kit와 Shibayagi사의 mouse anti-OVA IgG1 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

#### 5. DNA damage 측정

혈액 백혈구 세포에서의 DNA 손상정도를 측정하기 위하여 Tice et al.(2000)의 방법을 이용하여 Comet assay (Single Cell Gel Electrophoresis)를 실시하였다. 시료로 전혈 5  $\mu\text{L}$ 를 취해 0.5% normal melting agarose (NMA)가 도포된 slide 위에 분주하고 cover glass로 덮어 굳힌 후 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM Tris)를 처리하여 DNA의 이중나선을 풀어주었다. Lysis가 끝난 DNA 시료에 대하여 20분간 전기영동을 실시하여 DNA를 unwinding 시켰다. Comet 분석을 위해 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide로 형광 염색한 후 광학현미경(light microscope DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였으며, Komet 5.5 image analyzing system (Andor, UK)으로 분석하여 손상된 DNA분절이 핵으로부터 이동해서 생긴 꼬리 부분의 DNA 비율(tail DNA), tail length (TL), 그리고 tail DNA와 tail length로부터 산출된 tail moment (TM)로 나타내었다.

#### 6. 통계 처리

실험결과는 SPSS/Windows 21.0을 이용하여 통계처리하였고, 평균  $\pm$  표준편차를 구하였다. 다섯군 간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 한 후, Duncan's multiple range test로 변인 간의 차이를 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은  $\alpha=0.05$  수준에서 검증하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Raw 264.7 세포에서 고려영경귀 에탄올 추출물의 항염효능

고려영경귀 에탄올 추출물의 세포 독성 여부를 확인하기 위하여 WST assay를 실시한 결과는 [Figure 2a]에 나타내었다. 고려영경귀 에탄올 추출물을 24시간 처리한 결과 15.6 - 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 모두 95% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포 독성이 나타나지 않았다.

고려영경귀 에탄올 추출물을 24시간 동안 처리한 결과, LPS 처리한 군에 비하여 추출물을 15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 함께 처리한 군에서 NO 생성량이  $455.9 \pm 34.2 \mu\text{M}$ 로 유의하게 감소하였다. 그러나 추출물의 농도 31.2 - 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 NO 생성량이 감소하는 경향만을 나타내어 NO생성량을 억제하는 효과는 크지 않았다[Figure 2b].

고려영경귀 에탄올 추출물이 Raw 264.7 세포의 TNF- $\alpha$ 의 생성능에 미치는 영향은 [Figure 2c]에 나타내었다. LPS만 단독처리하였을 때( $4.20 \pm 0.36 \text{ ng}/\text{ml}$ ) 보다 LPS와 고려영경귀 에탄올 추출물 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 동시에 처리하였을 때 TNF- $\alpha$  생성량이  $1.85 \pm 0.12 \text{ ng}/\text{ml}$ 로

유의하게 감소하였다.

고려엉겅퀴 에탄올 추출물이 Raw 264.7 세포의 IL-1 $\beta$ 의 생성능에 미치는 영향은 [Figure 2d]에 나타내었다. 고려엉겅퀴 에탄올 추출물을 24시간 처리한 결과 LPS만 단독처리하였을 때(40.09  $\pm$  4.18 pg/ml) 보다 LPS와 고려엉겅퀴 에탄올 추출물 250  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml의 농도로 동시에 처리하였을 때 IL-1 $\beta$  생성량이 각각 16.00  $\pm$  3.21 pg/ml, 17.82  $\pm$  1.11 pg/ml로 유의하게 감소하였다.

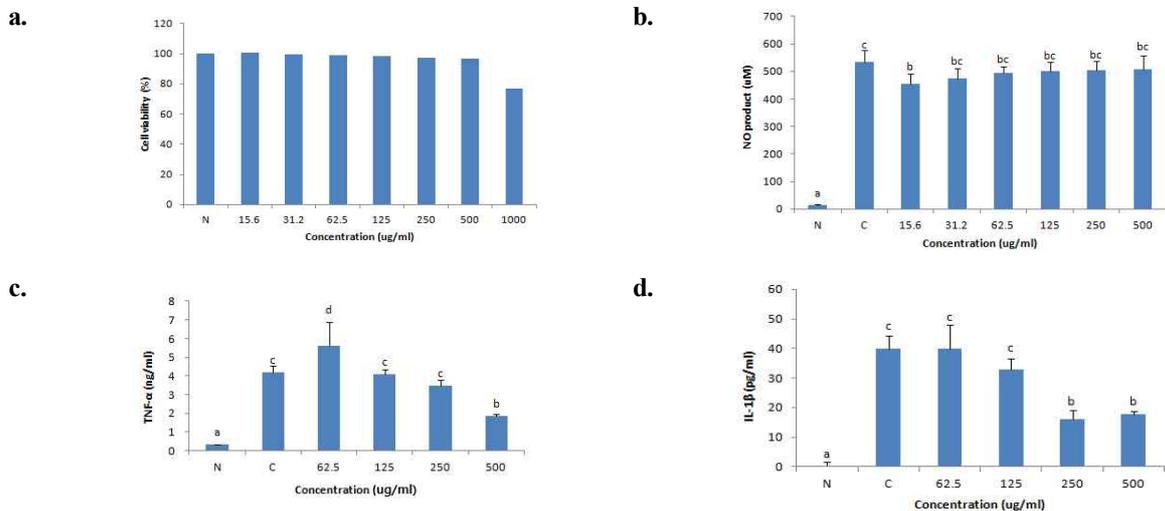
Lee et al.(2009) 은 고려엉겅퀴 뿌리의 부탄올 및 에탄올 추출물이 강력한 항염효능을 보였고 이러한 효과는 syringin이라는 성분과 관련이 있다고 보고하였으나 본 연구에서 사용한 시료는 고려엉겅퀴의 aerial part로서 뿌리 부분의 성분과 차이가 있을 수 있으며 추출조건에도 차이

가 있어 결과가 다르게 나온 이유로 볼 수 있다. NO의 생성량에는 큰 영향을 보이지 않았으나 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성능에는 125~250  $\mu$ g/ml의 농도에서 유의한 차이를 보여 항염증의 가능성을 보여주었다.

## 2. Balb/c mouse에서 고려엉겅퀴 에탄올 추출물 섭취효과

### 1) 체중 및 장기무게

체중 및 체중 100 g당 장기무게는 대조군과 고려엉겅퀴 식이(G-2.5, G-5, G-10)군 간의 유의한 차이를 보이지 않았다<Table 3>.



[Figure 2] Effect of *Cirsium setidens* ethanol extract on the viability of macrophages and NO, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  releases from LPS/IFN- $\gamma$ -stimulated Raw 264.7 macrophages. The values are presented as mean  $\pm$  S.E.

<Table 3> Body and organ weights

Group <sup>1)</sup>	Body weight (g)	Organ weight (g/100 g BW)		
		Liver	Kidney	Spleen
C(n=7)	30.57 $\pm$ 1.51 <sup>2)</sup>	4.57 $\pm$ 0.26	1.53 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.07
G-2.5(n=7)	30.07 $\pm$ 2.97	4.62 $\pm$ 0.14	1.54 $\pm$ 0.11	0.41 $\pm$ 0.04
G-5(n=7)	29.74 $\pm$ 1.96	4.70 $\pm$ 0.21	1.58 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.04
G-10(n=7)	29.45 $\pm$ 2.72	4.69 $\pm$ 0.27	1.62 $\pm$ 0.12	0.43 $\pm$ 0.03
p-value	0.835	0.710	0.341	0.851

<sup>1)</sup> Refer to the footnote of Table 2, n: sample size

<sup>2)</sup> Mean  $\pm$  S.D

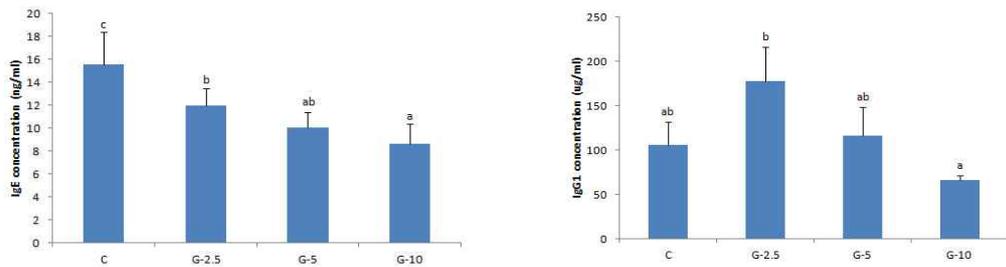
2) 혈청 IgE, IgG1의 농도

고려엉겅퀴 추출물의 섭취가 혈중 항체 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 serum IgE와 IgG1의 수준을 측정된 결과는 [Figure 3]에 제시하였다. 혈중 IgE의 농도는 대조군 15.5 ng/ml 에 비하여 고려엉겅퀴 추출물 섭취군에서 유의하게 감소하였으며, G-2.5, G-5, G-10군에서 각각 12.0 ng/ml, 10.1 ng/ml, 8.6 ng/ml로 농도의존적으로 나타났다. 따라서 고려엉겅퀴 추출물의 섭취는 혈중 IgE의 농도를 낮추어 면역과잉반응을 예방할 수 있음을 시사한다. IgG1의 경우, 대조군(106.2 µg/ml)에 비하여 고려엉겅퀴 추출물들의 섭취 군들에서 유의한 차이를 보이지 않았다. IgG1은 독성물질이나 바이러스를 없애며, 백혈구의 식균, 살균작용을 보조하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Shin & Kim, 2009). B세포가 생산하는 항체에 의한 체액성 면역반응은 항원과 접촉하면 형질세포

(plasma cell)로 분화되면서 여러 가지 항체를 생성하여 분비하게 된다. IgE는 알레르기성 질환 및 특정 선천성 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 항원이 결합했을 시 mast cell을 자극하여 히스타민과 같은 물질을 분비하게 하고, 감염원을 배출하기 위한 하나의 물질로서 작용한다(Lee et al., 2012), 따라서 식물 추출물의 투여가 혈중 IgE의 농도를 낮출 수 있다는 것은 항알레르기 효능이 있음을 시사한다.

3) DNA damage

Comet assay 결과는 <Table 4>에 나타내었다. 본 실험결과 Tail DNA의 값은 네 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았으나 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 반면, tail length는 대조군(60.40±6.40 µm)에 비해 G-5군(51.74±13.03 µm)과 G-10군(49.99±5.03 µm)에서 각각



[Figure 3] Effect of *Cirsium setidens* diet on the serum IgE and IgG1 levels determined by ELISA and presented as mean ± S.D Bars with different letters show significant differences between groups

<Table 4> Effects of the *Cirsium setidens* diet on tail-DNA, tail length and tail moment of blood lymphocyte in Balb/c mice

Group <sup>1)</sup>	Tail DNA(%)	Tail length(µm)	Tail moment
C(n=7)	15.06 ± 1.76 <sup>2)</sup>	60.40 ± 6.40 <sup>ab3)</sup>	7.03 ± 1.15 <sup>bc</sup>
G-2.5(n=7)	14.35 ± 1.27	63.66 ± 7.08 <sup>b</sup>	7.41 ± 0.97 <sup>c</sup>
G-5(n=7)	13.22 ± 1.78	51.74 ± 13.03 <sup>a</sup>	6.12 ± 1.21 <sup>ab</sup>
G-10(n=7)	12.67 ± 1.25	49.99 ± 5.03 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.60 <sup>a</sup>
F-value	2.965	3.677 <sup>*4)</sup>	4.914 <sup>*</sup>

<sup>1)</sup> Refer to the footnote of Table 2, n: sample size

<sup>2)</sup> Mean ± S.D

<sup>3)</sup> Mean with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test at α=0.05

<sup>4)</sup> \* p<0.05

14.3%, 17.2% 감소하였다. Tail moment는 대조군( $7.03 \pm 1.15$ )과 G-2.5군( $7.41 \pm 0.97$ )은 차이가 없었지만 G-10군( $5.38 \pm 0.60$ )은 대조군이나 G-2.5군에 비해 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ). Lee et al.(2003)의 연구에서는 HCl, ethanol 및 indomethacin으로 유도한 급, 만성 위점막 손상에서 영경귀 추출물이 용량에 따라 위 점막손상을 억제하였다고 하였으며, Kang et al.(2013b)은  $FeCl_3$ 로 유도한 혈관 내피 손상에서 영경귀 추출물이 대조약물로 사용한 아스피린과 비슷한 수준으로 혈관손상의 개선에 효과를 보여 영경귀가 손상된 세포를 회복시킬 수 있음을 보고하였다. 세포의 DNA fragmentation의 감소를 유도하는 효과는 세포 보호 작용의 일환으로 볼 수 있다.

### 3. Ovoalbumin으로 알레르기를 유도한 Balb/c mouse에서 고려영경귀 에탄올 추출물 섭취효과

#### 1) 체중 및 장기무게

체중 및 장기무게, 사료효율은 <Table 5>에 제시하였다. 본 실험 결과, OVA항원용액의 투여가 체중에는 아무런 영향을 주지 않았으며, 체중대비 장기무게 중 NC군에 비하여 OVA군에서 간무게가 증가하였으나, 고려영경귀 섭취군에서 낮아지는 경향을 보였다. 비장무게는 NC군에 비하여 OVA 투여군에서 유의하게 증가하였는데, 이러한 결과는 비장의 경우 항원에 의한 면역 활성화 또는 비장의 과민반응에 의한 것으로 보인다. 그러나 고려영경귀 사료섭취에 의한 비장 무게의 변화는 보이지 않았다.

<Table 5> Body and organ weights

Group <sup>1)</sup>	Body weight (g)	Organ weight (g/100 g BW)		
		Liver	Kidney	Spleen
NC(n=7)	$29.36 \pm 0.43$ <sup>2)</sup>	$4.64 \pm 0.08$	$1.53 \pm 0.07$	$0.37 \pm 0.03$ <sup>3)</sup>
SC(n=7)	$29.74 \pm 0.72$	$5.05 \pm 0.11$	$1.51 \pm 0.02$	$0.48 \pm 0.03$ <sup>b</sup>
G-2.5(n=7)	$29.04 \pm 0.53$	$4.87 \pm 0.14$	$1.41 \pm 0.03$	$0.47 \pm 0.02$ <sup>b</sup>
G-5(n=7)	$29.57 \pm 0.39$	$4.88 \pm 0.12$	$1.47 \pm 0.04$	$0.47 \pm 0.02$ <sup>b</sup>
G-10(n=7)	$30.26 \pm 0.92$	$4.85 \pm 0.09$	$1.44 \pm 0.04$	$0.45 \pm 0.02$ <sup>b</sup>
F-value	0.520	1.814	1.239	3.653 <sup>*3)</sup>

<sup>1)</sup> Refer to the footnote of Table 2, n: sample size

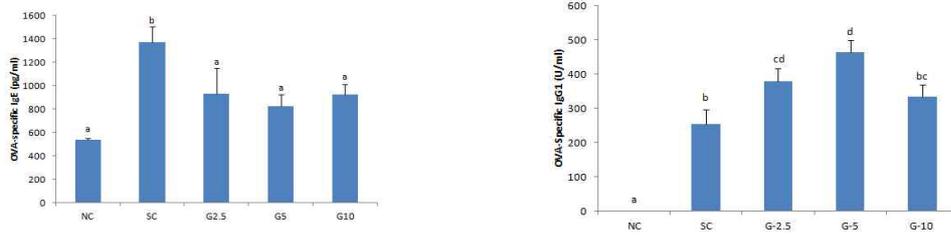
<sup>2)</sup> Mean  $\pm$  S.E

<sup>3)</sup> Different letters within the same column indicate significant differences among groups by Duncan's multiple range test

<sup>3)</sup> \* :  $p < 0.05$

#### 2) 혈청 OVA-specific IgE과 IgG1 농도

혈청의 OVA-specific IgE와 OVA-specific IgG1의 수준을 ELISA법으로 측정하여 [Figure 4]에 나타내었다. SC군의 OVA-specific IgE 생성량( $1,373.37 \text{ pg/ml}$ )에 비하여 G-2.5군에서는 OVA-specific IgE 생성량이  $930.9 \text{ pg/ml}$ , G-10군에서는 OVA-specific IgE 생성량이  $926.2 \text{ pg/ml}$ , G-5군에서는  $824.2 \text{ pg/ml}$ 로 OVA-specific IgE 생성이 가장 많이 감소하였다. 본 실험에서 OVA-specific IgE 생성량이 식이에 혼합한 고려영경귀 추출물의 용량에 의존적으로 감소하는 것은 아니었으나, SC군에 비하여 고려영경귀 추출물을 섭취시킨 군 모두에서 유의하게 분비가 감소하였다. 따라서 알레르기를 유발시킨 감작대조군에 비하여 고려영경귀 식이군에서 유의하게 OVA-specific IgE 생성량이 감소함으로써 고려영경귀의 항알레르기 효과를 기대할 수 있었다. 반면, NC군에서 OVA-specific IgG1의 생성량이 거의 없었고, SC군에서는  $253.7 \text{ U/ml}$  이었으며, G-2.5군에서  $379.9 \text{ U/ml}$ , G-5군에서  $464.0 \text{ U/ml}$ 로 IgG1 생성량이 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 G-10군에서는  $333.3 \text{ U/ml}$ 의 생성량을 나타내어 고려영경귀의 농도에 의존적으로 나타나지 않았다. IgG1은 type II와 type III 알레르기 반응에 관여하는 항체로 알려져 있으며 OVA-specific IgE와는 다른 기전에 의하여 면역반응을 조절한다. IgG1은 항체 중 가장 많은 비율을 차지하는 아형으로 Th2세포에서 분비되는 IL-4에 의하여 유도되는 항체로 알려져 있다. 본 연구에서 고려영경귀 추출물을 투여한 일부 군에서 OVA-specific IgG1이 증가한 결과에 대해서는 좀 더 연



[Figure 4] Effect of *Cirsium setidens* on the serum OVA-specific IgE and IgG1 levels. Antibody levels determined by ELISA and presented as mean ± S.E. Bars with different letters show significant differences between groups at α=0.05.

구가 필요할 것으로 사료된다.

3) DNA damage

OVA 항원용액으로 알레르기 반응을 유도한 마우스에서 고려영경귀 식이의 섭취가 산화적 스트레스에 대처하는 영향을 검토하기 위하여 Comet assay를 이용하여 DNA fragmentation을 측정하였다<Table 6>. 본 실험결과 SC군에 비하여 고려영경귀 섭취군에서 tail DNA, tail length, tail moment값이 유의하게 감소하였다. Tail DNA는 SC군이 18.40 ± 1.39%이며, G-2.5군이 13.33 ± 1.51%, G-5군과 G-10군이 각각 13.21 ± 0.83%, 13.82 ± 1.68%로 고려영경귀 섭취군에서 유의한 감소를 나타내었으며(p<0.05), tail length는 SC군이 74.51 ± 9.33 μm이며, G-2.5군이 55.25 ± 6.43 μm, G-5군과 G-10군이 각각 48.14 ± 2.98

μm, 49.21 ± 6.16 μm으로 고려영경귀 섭취군에서 유의한 감소를 나타내었다(p<0.05). Tail moment는 SC군에 비하여 G-2.5군에서 33.8% 감소하였고, G-5군과, G-10군에서 각각 41.5%, 39.4% 감소하였다(p<0.05). 따라서 고려영경귀 에탄올 추출물의 섭취는 OVA로 감작된 Balb/c 마우스에서 산화적 손상을 억제하는 것으로 보인다. 이와 관련된 선행연구로는 D- Galactosamine으로 유도된 SD계 rat 간염모델에서 고려영경귀의 추출물에서 얻은 pectolarin, pectolarin- genin을 경구투여 하였을 때, GSH(glutathione peroxidase)와 SOD(superoxide dismutase)가 모두 증가하였다는 결과가 있었으며(Yoo et al., 2008) 고려영경귀의 부위별(뿌리, 잎, 줄기) 추출물 및 분획물을 이용한 Lee et al.(2003)의 연구에서도 ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물에서 강한 항산화 활성을 보였다고 보고하여 몇몇의

<Table 6> Effects of the *Cirsium setidens* on tail-DNA, tail length and tail moment of blood lymphocyte in OVA-sensitized mice

Group <sup>1)</sup>	Tail DNA (%)	Tail length (μm)	Tail moment
NC(n=7)	13.32 ± 1.03 <sup>2)a3)</sup>	59.18 ± 6.50 <sup>ab</sup>	6.87 ± 0.79 <sup>ab</sup>
SC(n=7)	18.40 ± 1.39 <sup>b</sup>	74.51 ± 9.33 <sup>b</sup>	9.65 ± 1.41 <sup>b</sup>
G-2.5(n=7)	13.33 ± 1.51 <sup>a</sup>	55.25 ± 6.43 <sup>ab</sup>	6.39 ± 0.99 <sup>a</sup>
G-5(n=7)	13.21 ± 0.83 <sup>a</sup>	48.14 ± 2.98 <sup>a</sup>	5.65 ± 0.43 <sup>a</sup>
G-10(n=7)	13.82 ± 1.68 <sup>a</sup>	49.21 ± 6.16 <sup>a</sup>	5.85 ± 1.05 <sup>a</sup>
F-value	2.969 <sup>*4)</sup>	2.664 <sup>*</sup>	3.122 <sup>*</sup>

<sup>1)</sup> Refer to the footnote of Table 2, n: sample size

<sup>2)</sup> Mean ± S.E

<sup>3)</sup> Mean with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test at α=0.05

<sup>4)</sup> \* : p<0.05

선행연구에서 고려영경귀의 항산화능이 일관되게 보고되고 있음을 알 수 있다.

### Ⅲ. 요약 및 결론

본 연구에서는 고려영경귀 에탄올 추출물의 항염, 항산화 효능을 스크리닝 하기 위하여 Raw 264.7 세포주와 정상 Balb/c 마우스 및 ovalbumin으로 감작시킨 Balb/c 마우스에서의 혈액의 면역글로불린과 DNA damage에 미치는 영향을 검토하였다. Raw 264.7 세포주에서 고려영경귀 에탄올 추출물은 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 독성을 나타내지 않았으며 mitogen으로 활성화된 대식세포에 처리한 고려영경귀 추출물은 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 TNF- $\alpha$ 를 감소시켰고 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  부터 IL1 $\beta$ 의 생성량을 감소시켰다. 7주간 고려영경귀 에탄올 추출물을 각각 2.5%, 5%, 10%을 섭취한 Balb/c 마우스의 체중 및 장기무게에 대한 영향은 없었으며 대조군에 비해 고려영경귀 추출물 섭취군에서는 IgE의 농도가 유의하게 감소되었고 IgG1에 대한 영향은 보이지 않았다. 추출물을 투여한 쥐의 백혈구 세포 DNA damage 측정 결과 tail length는 추출물 5, 10% 섭취군에서 tail moment는 10% 섭취군에서 유의하게 낮았다. 또한 고려영경귀 에탄올 추출물의 섭취는 OVA항원으로 상승된 혈청의 OVA-specific IgE 농도를 유의하게 감소시켰으며, 혈청의 OVA-specific IgG1의 농도는 G-2.5와 G-5군에서 증가하였다. 추출물을 투여한 쥐의 백혈구 세포 DNA damage 측정 결과, SC군에 비하여 G-5군과 G-10군에서 tail length가 유의하게 감소하였으며, 추출물을 투여한 모든 군에서 tail DNA와 tail moment가 유의하게 감소하였다.

고려영경귀 에탄올 추출물은 mitogen으로 활성화한 대식세포에서 염증관련 지표인 TNF- $\alpha$ 나 IL1 $\beta$ 를 감소시켰으며 정상 Balb/c 마우스와 OVA로 알레르기를 유발한 Balb/c 마우스의 혈청에서 알레르기와 관련된 항체인 IgE의 생성을 억제시켰다. 또한 두 동물실험 모두에서 DNA 손상을 감소시킴으로써 산화적 손상을 억제시켜주어 고려영경귀 추출물은 allergen으로 변화된 면역능을 회복시킬 수 있는 가능성을 보여주었다.

주제어: 고려영경귀 에탄올 추출물, 항염활성, 항산화활성

본 연구는 충남대학교 CNU 학술연구비 지원을 통하여 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Abul, K. A., Andrew, H., & Shiv, P. (2008). Cellular and molecular immunology 6th ed. USA: E.Publib. Inc.
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews. Immunology*, 3(9), 745-756.
- Byun, J. H., Kang, Y. S., Kim, S. S., Kim, D. H., Hwang, D. R., SHin, M. K., & Song, H. J. (2003). The effect of water extract from *Tripterygium regelii* on allergy. *The Korea Journal of Herbology*, 18(2), 189-199.
- Chang, S. Y., Song, J. H., Kwak, Y. S., & Han, M. J. (2012). Quality characteristics of gondre tofu by the level of *cirsium setidens* powder and storage. *Journal of The Korean Society of Food Culture*, 27(6), 737-742.
- Heo, Y., & Kim, H. A. (2008). Correlation between skin prick test and enzyme-linked immunosorbent assay using serum for identification of subjects positive to major respiratory allergens. *Journal of Environmental Health Sciences*, 34(5), 369-378.
- Hur, S. J., Park, E. Y., Ann, M. J., Jang A. R., Yang, K. S., & Whang, W. K. (2010). A study on the whitening effects and HPLC pattern analysis of *Cirsium setidens* Nakai. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 8(4), 203-211.
- Jo, S. Y., Lee, U. Y., Kim, E. Y., Lee, S. J., Her, J. W., & Yoon, T. J. (2010). A syudy on the anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Salvia plebeia* R. extracts. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 41(1), 31-37.
- Kang, S. Y., Jung, J. K. Lee, S. K., Lee, S. H., & Park, Y. K. (2013a). Effects of the ethanol extract of codonopsis pilosulae radix on ovalbumin-induced allergic responses in mice. *The Korea Journal of Herbology*, 28(2), 9-15.

- Kang, H. J., Kim, H. S., Jeon, I. H., Mok, J. Y., Jeong, S. I., Shim, J. S., & Jang, S. I. (2013b). Ameliorative effect of the water extract from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* leaves on blood circulation in a rat model of topical ferric chloride-induced carotid artery damage. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 44(2), 131-137.
- Kim, S. H., Son, J. H., & Lee, S. H. (2009). Inhibitory effects of water extract of *Lindera obtusiloba* on the mast cell-mediated allergic inflammation. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 40(3), 233-237.
- Kim, S. J. (2008). Immune suppression effect of bovine lactoferrin in ovalbumin-induced allergy. Unpublished master's thesis, Konyang graduated school, Daejeon
- Kim, Y. J., Kang, S. C., Namkoong, S., Choung, M. G., & Sohn, E. H. (2012). Anti-inflammatory effects by *Arctium lappa* L. root extracts through the regulation of ICAM-1 and nitric oxide. *Korean Journal of Plant Resources*, 25(1), 1-6.
- Lee, M. H., Jeong, J. H., Jeong, M. S., Chang, S. H., & Her, E. (2010). Anti-inflammatory function of the *sophora japonica* extract rutin: the inhibitory effect of rutin of korean *sophora japonica* on the productions of NO and TNF-alpha from mouse peritoneal macrophages. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 18(2), 105-112.
- Lee, J. B., Yang, H. M., Min, Y. K., & Seo, H. S. (2009). The role of chemokine in a in vivo model for food allergy research: in the rats. *Journal of Korean Living Environment System*, 16(6), 675-682.
- Lee, A. N., Park, S. J., Jeong, A. R., Lee, J. R., Park, H. J., Kim, S. J., Min, I. S., & Youn, H. S. (2011). Ovalbumin induces cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 43(1), 110-113.
- Lee, H. K., Kim, J. S., Kim, N. Y., Kim, M. J., Park, S. U., & Yu, C. Y. (2003). Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 11(1), 53-61.
- Lee, S. H., Jin, Y. S., Heo, S. I., Shim, T. H., Sa, J. H., Choi, D. S., & Wang, M. H. (2006). Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 38(4), 571-576.
- Lee, S., Jung, M. J., Heo, S., & Wang, M. (2009). Anti-inflammatory effect and hplc analysis of extract from edible *Cirsium setidens*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(5), 437-442.
- Lee, W. B., Kwon, H. C., Cho, O. R., Lee, K. C., Choi, S. U., Baek, N. I., & Lee, K. R. (2002). Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Archives of Pharmacal Research*, 25(5), 628-635.
- Lee, Y. S., Kyung, H. J., & Kim, Y. H. (2012). Anti-allergic effects of *gagam-yanggyeoksan* on RBL-2H3 mast cells and OVA/alum sensitized mice. *The Journal of Korean Oriental Pediatrics*, 26(4), 10-23.
- Lim, K. M., Kang, H., Park, S. M., Shim, B. S., Kim, S. H., Choi, S. H., & Ahn, K. S. (2006). Effect of Bulhwangeumjeonggi-san on cytokine levels of mouse Th1/Th2 cells and anti-allergic activity in ovalbumin-sensitized allergic inflammation model. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, 20(6), 1467-1476.
- Park, E., Kim, B., Eo, H., Park, K., Kim, Y., Lee, H.

- J., Son, M., Chang, Y., Cho, S., Kim, S., Jin, M. (2005). Control of IgE and selective TH1 and TH2 cytokines by PG102 isolated from *Actinidia arguta*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(5), 1151-1157.
- Pyo, M. Y., Hyun, S. M., & Yang, K. S. (2001). Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. *The Journal of Applied Pharmacology*, 9(3), 194-200.
- Rodeberg, D. A., Chaet, M. S., Bass, R. C., Arkovitz, M. S., & Garcia, V. F. (1995). Nitric oxide: an overview. *The American Journal of Surgery*, 170(3), 292-303.
- Shin, G. R. & Kim, Y. W. (2009). Effect of chamomile german oil application of IgG1 and IgE 1 to atopic dermatitis in NC/Nga mice model. *Korean Journal of Human Ecology*, 18(2), 501-507.
- Sim, G. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Lee, B. C., Lee, G. S., & Pyo, H. B. (2007). The inhibition of UVA-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and the improvement of skin elasticity by *Cirsium setidens* extract. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 33(3), 181-187.
- Sung, G. D., Son, W. M., & Baek, Y. H. (2012). Effects of aerobic exercise and a protein diet on serum lipid profiles, liver function, and immunoglobulin in rats. *Journal of Life Science*, 22(1), 92-97.
- Surh, J. H., Kim, J. O., Kim, M. H., Lee, J. C., Lee, B. Y., Kim, M. Y., Yang, H. W., Yun, S. J., & Jeong, H. R. (2009). Nutritional properties, as food resources for menu development, of cubed snailfish, shaggy sea raven, and two kinds of wild vegetables that are staple products in samcheok. *Korean Journal of Food and Cookery Science*, 25(6), 690-702.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., & Sasaki, Y. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Yoo, Y. M., Nam, J. H., Kim, M. Y., Choi, J. W., & Park, H. J. (2008). Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-galactosamine via an antioxidant mechanism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(4), 760-764.
- Yu, A. R., Park, H. Y., Kim, Y. S., Ha, S. K., Hong, H. D., & Choi, H. D. (2012). Immuno-enhancing effect of seed extracts on a raw 264.7 macrophage cell line. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41(12), 1671-1676.

Received 17 November 2017;

1st Revised 4 December 2017;

Accepted 8 December 2017