Lipopolysaccharide로 유도된 RAW 264.7에서 수국차 추출물의 항염증 효과

최은영 · 장서인

대구한의대학교 바이오산업융합학부 화장품약리학과

The Anti-Inflammatory Effect from Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 of Extracts of *Hydrangea serrata* Seringe

Eun-Young Choi and Seo-In Jang

Department of Cosmeceutical Science, Division of Bio-Technology and Convergence, Daegu Haany University

ABSTRACT This study was undertaken to confirm the antioxidant effects (electron donating ability (EDA) and ABTS radical scavenging ability) of the water (HSW) and ethanol (HSE) extracts of *Hydrangea serrata* Seringe on the inhibition of nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and mitogen activating protein kinase (MAPK) phosphorylation, in LPS-induced RAW 264.7 cells. Results of the EDA test reveal that at 500 µg/mL, HSW demonstrates a good DPPH radical scavenging ability greater than 81.71%, whereas HSE demonstrates a scavenging ability greater than 89.56%. Evaluating the scavenging activity of ABTS radicals revealed that at 500 µg/mL, both HSW and HSE show superior scavenging activities of 99.4% and 96.1%, respectively. Determining the anti-inflammatory response showed that exposure to both HSW and HSE reduces the NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells in a concentration-dependent manner, as compared to the group treated only with LPS. Moreover, exposure to both HSW and HSE resulted in a concentration-dependent inhibition of iNOS and COX-2 protein expressions. It was further confirmed that phosphorylation in the signaling pathway of MAPK was also significantly inhibited in a concentration-dependent manner. Since inhibition of MAPK phosphorylation inhibits iNOS and COX-2, which subsequently induces the expression of NO, our results indicate that extracts of *Hydrangea serrata* Seringe inhibit and regulate the production of inflammation-related factors. There are few reports on the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Hydrangea serrata* Seringe extracts. Therefore, considering the data obtained in the current study, we propose that *Hydrangea serrata* Seringe extracts have the potential to be used as useful anti-inflammatory materials in foods and cosmetics.

Key words: *Hydrangea serrata* Seringe, COX-2, iNOS, MAPK, NO

서 론

염증(inflammation)은 조직이나 생체에 물리적 작용 또는 화학 물질, 유해 자극 등 외부 물질이 체내로 유입되었을 때 감염으로부터 신체를 보호하기 위해 일어나는 일차적인 생체 방어 반응이며(Choi 등, 2008), 면역반응에 관여하는 주요 세포로 잘 알려진 대식세포(macrophage)는 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 다양한 외부 자극에 대한 방어 기작에 의해 염증을 매개하는 nitric oxide(NO) 및 다양한 전염증성 cytokine(pro-inflammatory cytokine)을 방출함으로써 염증에 관여한다(Tursun 등, 2016). 그러나 비정상적인 염증반응이 일어나면 과도한 염증 매개 물질이 생성되

고 그 결과 만성염증 질환 및 종양 등을 유발하는 것으로도 알려져 있다(Arthur와 Ley, 2013; Hoffmann 등, 1999). LPS는 외부의 여러 이물질 중 toll like receptor-4(TLR-4)에 의해 인식되는 박테리아 내독소이며, 대식세포를 활성화하여 염증반응을 일으키는 주요한 인자 중 하나이다. 활성화된 TLR-4는 세포 내부의 여러 단계의 신호전달 과정을 활성화하며, 그중 활성화된 nuclear factor-κB(NF-κB)는 핵 내로 이동하여 cyclooxygenase(COX)-2, inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 같은 염증성 단백질의 유전자 발현을 증가시킨다(Tak과 Firestein, 2001). 특히 iNOS는 interferon-γ, LPS 및 전염증성 cytokine의 자극이 있을 때 발현되어 NO 생성을 촉진한다고 보고되었다(Barnes와 Liew, 1995). NO는 신경계의 생리학적 전달과 염증반응 및 세포의 분화나 세포 내 신호전달에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있으며, 혈관 이완, 혈소판 응집억제, 살균, 면역 등 다양한 생리기능을 하는 것으로 보고되었다(Choi 등, 2013). 하지만 NO는 라디칼로서 생체 내 독성을 가지고

있으며, 특히 지속적인 염증으로 인한 과발현은 류머티즘성 관절염(rheumatoid arthritis) 및 암(cancer)과 연관이 있다고 알려져 있다(Manzi와 Wasko, 2000). 그리고 LPS에 의해 자극받은 대식세포는 COX-2의 발현을 증가시켜 염증반응을 유지한다(Sinha 등, 2007). Mitogen activating protein kinase(MAPK) 신호전달 경로는 대식세포의 TLR-4와 MD-2 복합체가 LPS를 인식하면 염증인자의 발현을 조절하는 주요 경로로 알려져 있다(Park 등, 2017). MAPK family인 extracellular signal regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK), p38은 cytokine, growth factor 및 환경 스트레스에 의해 유발되는 신호의 조절자로서 역할을 하고 다양한 세포기능에 관여하는 것으로도 알려져 있으며(Park 등, 2017), 특히 대식세포에서 MAPK의 인산화 증가는 전사 번역 시 염증 매개체 합성 조절에 관여하여 염증반응을 증가시킨다고 보고되었다(Kaminska, 2005; Shin 등, 2012). MAPK 경로의 활성화는 NF- κ B와 같은 전사조절인자의 발현 조절을 통해 NO와 다양한 염증 매개 cytokine의 생성을 촉진한다. 이 과정에서 과다 생산된 NO와 cytokine은 심각한 조직 손상 및 패혈성 쇼크를 유발할 수 있으므로 염증반응을 조절하는 것이 중요하다(Nakano 등, 1998). 이러한 이유로 인해 MAPK의 인산화 억제제는 NO의 발현을 유도하는 iNOS와 COX-2를 억제하여 결국 항염증 효과를 유도할 수 있다는 것을 의미한다(Ci 등, 2010).

수국차는 *Hydrangea serrata* Seringe라고 하며 우리나라 16속 36종에 분포된 범의귀과(Saxifragaceae)의 낙엽지목으로(Kim 등, 2003), 수국차의 잎을 따서 만든 차를 감로차 혹은 이슬차라고 하는데 부드러운 단맛과 은은한 박하향이 특징이다(Zehnter와 Gerlach, 1995). 수국차는 수국과는 다른 종으로, 우리나라에서는 해발 700 m 이상의 고랭지에서 재배되며 중국의 침엽차(*Hydrangea aspera* DON)에 비해 독성이 없고 일본의 아마차(*Hydrangea macrophylla* var. *acumimata* MAKINO)에 있는 쓴맛과 불쾌한 뒷맛이 없이 설탕의 1,000배나 되는 청량한 단맛을 가지는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2003). 수국차에 함유된 썬버지놀(thunberginols)과 하이드라직에시드(hydrageic acid)는 항당뇨성을 가지며(Zhang 등, 2007), 그밖에 구강세균에 대한 항균성(Matsuda 등, 1999), 항알레르기성(Yoshikawa 등, 1992) 및 항궤양성(Yamahara 등, 1994)에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 아직 수국차에 대한 항염증 효과에 대한 연구는 미비하다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell에 다양한 농도의 수국차 추출물을 처리하여 iNOS, COX-2의 발현 및 MAPK 경로에서의 단백질 발현을 분석함으로써 수국차 추출물의 항염증 활성을 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시료의 추출

본 실험에 사용된 수국차 잎은 강원도 강릉시 소재 감로다원에서 재배되어 건조된 상태로 제공받았으며 열수 및 에탄올 추출을 실시하였다. 열수 추출(HSW)의 경우 시료 중량 10배 양의 증류수를 첨가하여 99°C에서 3시간 환류 냉각 추출하였으며, 에탄올 추출(HSE)의 경우 70% 에탄올에 침지하여 상온에서 24시간 방치한 후 상층액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 각 추출물은 여과지(Whatman No.2, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 여과한 후 농축·동결 건조하여 추출물을 얻었으며 냉장 보관하면서 실험에 사용되었다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 각 시료용액 100 μ L에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co.) 50 μ L를 넣어 잘 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시킨 다음 ELISA reader(PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH를 이용한 항산화 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거 활성의 측정은 Park 등(2016)의 방법에 의해 측정하였다. 7.4 mM ABTS[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Sigma-Aldrich Co.] 0.5 mL와 2.6 mM potassium persulfate($K_2S_2O_8$) 88 μ L를 섞은 용액 1 mL와 에탄올 88 mL를 혼합한 ABTS용액 1 mL를 1:1로 섞은 후 12시간 동안 라디칼을 형성시킨 용액을 99% 에탄올에 약 1:13의 비율로 섞어서 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.002 가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 100 μ L와 ABTS solution 100 μ L를 혼합하여 30초간 진탕한 후 1분간 상온에서 반응시키고 ELISA reader(PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc.)로 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical cation decolorization 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

세포의 배양

Mouse 유래 macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(Sigma-Aldrich Co.) 100 unit/mL가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, SANYO Co., Sakata, Japan)에서 배양하였고 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

세포 생존율

세포 생존율 측정은 Mosmann(1983)의 방법에 따라 측정하였다. RAW 264.7 cell을 96-well culture plate에 1×10^5 cells/mL가 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 형성된 formazan에 각 well당 0.1 mL의 dimethyl sulfoxide 용액을 가한 후 ELISA reader(PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 활성산소종 생성 측정

과산화수소(H₂O₂)에 의한 세포 손상으로 인한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 측정하기 위한 실험은 Wolfe와 Liu(2007)의 방법을 변형하여 진행하였다. RAW 264.7 cell을 3×10^4 cells/mL의 농도로 부유시켜 96-well culture plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 형광염료인 20 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Sigma-Aldrich Co.)를 90 μ L 처리한 후 20분간 배양하고 시료용액을 농도별로 선 처리한 다음 1시간 동안 배양하였다. DCFH-DA를 제거한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 washing 하고 나서 500 μ M의 과산화수소 100 μ L를 처리하고 30분간 다시 배양한 뒤 형광도를 측정하였다. DCF 형광도는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 infinite PRO(INFINITE F200 PRO, TECAN, Grödig, Austria)로 분석하여 측정된 ROS에 결합한 형광 DCF-DA를 측정하여 대조군에 대한 상대적인 수치로 나타내었다.

NO 저해능 측정

RAW 264.7 cell에서 생성되는 NO의 양은 Green 등(1982)의 방법에 따라 측정하였다. 세포를 6-well culture plate에 1×10^5 cells/mL가 되게 seeding 한 후 24시간 동안 배양하여 confluence가 80%일 때 PBS로 2번 세척하고 무혈청 배지를 사용하여 24시간 동안 배양한 뒤 시료를 농도별로 처리하였다. 4시간 후에 LPS(Sigma-Aldrich Co.) 1 μ g/mL를 대조군(Non)을 뺀 모든 well에 넣어 4시간 동안 자극한 후 상층액을 모아 동량의 Griess reagent로 10분간 반응시키고 NO의 생성량을 ELISA reader(PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

단백질의 발현을 보기 위해 RAW 264.7 cell을 96-well culture plate에 1×10^6 cells/mL로 seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화했다. 배지를 제거한 후 시료를

농도별로 처리하고 30분간 반응시킨 뒤 LPS를 1 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 후에 상층액을 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. Cell을 harvest 하여 Radio-immuno-precipitation assay lysis buffer 200 μ L에 cell을 용출시켜 단백질을 수확·원심분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하고 SDS-PAGE에서 전기영동 하여 분리하였다. Gel을 3시간 동안 polyvinylidenedifluoride membrane(Sigma-Aldrich Co.)에 옮긴 다음 4°C에서 4시간 동안 5% skim milk로 blocking 한 후, primary antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 한 뒤 TBST로 30분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복하고 각각의 HRP-conjugated secondary antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 희석하여 상온에서 1시간 동안 처리하고 다시 TBST로 10분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복한 뒤 ECL 용액을 가한 후 Western imaging system(EZ-Capture MG, ATTO, Amherst, NY, USA) 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

통계처리

실험 결과에 대한 통계처리는 SPSS 25.0(IBM SPSS Inc., New York, NY, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 이용하여 유의성을 확인한 후, Duncan's multiple range test($P < 0.05$)로 다중비교를 실시하여 분석하였다.

결과 및 고찰

전자공여능 활성 결과

항산화 활성을 확인하기 위한 대표적인 실험법인 전자공여능에서 사용되는 DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼의 성질을 가지며, 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다(Ancerewicz 등, 1998). 만일 시료가 항산화 활성을 가지고 있다면 DPPH가 가진 지질산화에 관여하는 자유라디칼의 비공유결합을 소거하여 DPPH의 환원성을 높일 것이고, 환원이 많이 될수록 보라색을 잃게 되어 UV 측정 시 그 수치도 낮아진다(Heo 등, 2006). 본 실험에서는 양성대조군으로 butylated hydroxy anisole(BHA)이 사용되었으며, BHA는 국내에서 사용이 허용된 대표적인 합성항산화제로서 가격이 저렴하고 효과가 우수하지만 생체 효소 및 독성으로 인해 안전성에 대한 논란이 있어 현재는 이러한 합성항산화제를 대체할 천연항산화제를 연구하고 있는 추세이다(Chan 등, 1993). 수국차 추출물에 대한 전자공여능 활성 결과를 Table 1에 나타내었다. HSW와 HSE 모두 농도의존적으로 소거효능이 증가했음을 알 수 있으며, 특히 500 μ g/mL 농도에서 HSW는 $81.71 \pm 5.96\%$ 의 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 보였고 같은 농도에서 HSE는 $89.56 \pm 1.54\%$

Table 1. DPPH radical scavenging activity of *Hydrangea serrata* Seringe extracts (%)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Samples		
	HSW	HSE	BHA
10	27.44 $\pm$ 9.28 ^{c1)}	13.85 $\pm$ 7.47 ^d	62.85 $\pm$ 0.85 ^c
50	59.10 $\pm$ 9.72 ^b	41.65 $\pm$ 5.01 ^c	94.83 $\pm$ 2.25 ^b
100	73.87 $\pm$ 1.87 ^a	54.40 $\pm$ 3.43 ^b	96.95 $\pm$ 0.78 ^a
500	81.71 $\pm$ 5.96 ^a	89.56 $\pm$ 1.54 ^a	97.22 $\pm$ 0.70 ^a
1,000	81.81 $\pm$ 4.52 ^a	91.43 $\pm$ 0.92 ^a	97.48 $\pm$ 1.44 ^a

HSW: water extract of *Hydrangea serrata* Seringe, HSE: 70% ethanol extract of *Hydrangea serrata* Seringe, BHA: butylated hydroxy anisole (positive control).

Results are mean $\pm$ SD of triplicate data.

¹⁾Values with different letters (a-d) are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

의 소거능을 보였다. 합성항산화제인 BHA가 같은 농도에서 약 97.22 $\pm$ 0.70%의 소거능을 보인 것과 비교하여 유의할만한 효과라고 볼 수 있다(10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 HSW는 27.44 $\pm$ 9.28%, 59.10 $\pm$ 9.72%, 73.87 $\pm$ 1.87%, 81.71 $\pm$ 5.96%, 81.81 $\pm$ 4.52%, HSE는 13.85 $\pm$ 7.47%, 41.65 $\pm$ 5.01%, 54.40 $\pm$ 3.43%, 89.56 $\pm$ 1.54%, 91.43 $\pm$ 0.92%, BHA는 62.85 $\pm$ 0.85%, 94.83 $\pm$ 2.25%, 96.95 $\pm$ 0.78%, 97.22 $\pm$ 0.70%, 97.48 $\pm$ 1.44%). Lim 등(2008)은 감잎차와 녹차의 침출액을 1%(w/v)의 농도로 추출하여 전자공여능 실험을 했고 그 결과 감잎차는 65.7 $\pm$ 3.7%, 녹차는 68.4 $\pm$ 0.3%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다고 보고하였으며, Jo 등(2017)은 그라비올라 잎 추출물이 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 55.33%의 소거 활성을 보고한 것과 비교했을 때 수국차 추출물의 소거 활성이 매우 우수함을 알 수 있었다. Jeong 등(2011)이 보고한 비파나무잎차 열수 추출물에서의 DPPH 라디칼 소거능이 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 89.09%의 효과가 있었다고 한 것과 비교했을 때 HSW(81.71%)와 HSE(89.56%)의 결과와 유의할만한 결과임을 알 수 있었다.

ABTS 라디칼 소거 활성 결과

ABTS 라디칼을 이용한 항산화력의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 자유라디칼이 추출물 내의 항산화력 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 측정 방법이다. 본 실험에서는 양성대조군으로 butylated hydroxy toluene (BHT)이 사용되었으며, BHA와 마찬가지로 가격이 저렴하고 효과가 우수한 대표적인 합성항산화제이나 생체 효소 및 독성으로 인해 안전성에 대한 논란이 있어 현재는 이러한 합성항산화제를 대체할 천연항산화제를 연구하고 있는 추세이다(Chan 등, 1993). 수국차 추출물에 대한 ABTS 라디칼 소거 활성 결과는 Table 2에 나타내었다. HSW와 HSE 모두 농도 의존적으로 소거 효능이 증가하였으며, 특히 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 각각 99.41 $\pm$ 0.63%와 96.06 $\pm$ 5.48%의 우수한 소거능을 나타내었다. 이는 대조군인 BHT가 같

Table 2. ABTS radical scavenging ability of *Hydrangea serrata* Seringe extracts (%)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Samples		
	HSW	HSE	BHT
10	18.48 $\pm$ 3.06 ^{d1)}	12.44 $\pm$ 2.53 ^d	36.86 $\pm$ 1.55 ^d
50	52.09 $\pm$ 4.93 ^c	39.26 $\pm$ 2.81 ^c	83.33 $\pm$ 4.25 ^c
100	75.05 $\pm$ 8.50 ^b	58.17 $\pm$ 6.53 ^b	91.05 $\pm$ 2.25 ^b
500	99.41 $\pm$ 0.63 ^a	96.06 $\pm$ 5.48 ^a	99.22 $\pm$ 0.13 ^a
1,000	100.14 $\pm$ 0.70 ^a	100.03 $\pm$ 0.65 ^a	99.67 $\pm$ 0.52 ^a

HSW: water extract of *Hydrangea serrata* Seringe, HSE: 70% ethanol extract of *Hydrangea serrata* Seringe, BHT: butylated hydroxy toluene (positive control).

Results are mean $\pm$ SD of triplicate data.

¹⁾Values with different letters (a-d) are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

은 농도에서 99.22 $\pm$ 0.13%의 활성을 보인 것과 비교하여 유의할만한 효과라고 볼 수 있다(10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 HSW는 18.48 $\pm$ 3.06%, 52.09 $\pm$ 4.93%, 75.05 $\pm$ 8.50%, 99.41 $\pm$ 0.63%, 100.14 $\pm$ 0.70%, HSE는 12.44 $\pm$ 2.53%, 39.26 $\pm$ 2.81%, 58.17 $\pm$ 6.53%, 96.06 $\pm$ 5.48%, 100.03 $\pm$ 0.65%, BHT는 36.86 $\pm$ 1.55%, 83.33 $\pm$ 4.25%, 91.05 $\pm$ 2.25%, 99.22 $\pm$ 0.13%, 99.67 $\pm$ 0.52%). Jeong 등(2011)은 비파나무잎차 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 실험한 결과 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 61.23%의 활성을 보였다고 보고했으며, Jeong 등(2008)은 조릿대 잎의 80% 메탄올 추출물에 대한 ABTS 라디칼 소거 활성이 1.25 mg/mL의 농도에서 83.85%의 결과를 나타내었다고 보고하였다. 이러한 연구 결과와 비교했을 때 수국차 추출물의 항산화 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

세포 생존율 측정 결과

Yellow tetrazolium salt MTT는 담황색 기질로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 reductase에 의해 환원되어 formazan을 생성하는데, 죽어있는 세포에서는 형성되지 않고 살아있는 세포의 수가 많을수록 formazan의 생성도 많아지고 세포의 성장을 측정할 수 있다(Gross와 Lapiere, 1962). 수국차 추출물을 농도별(10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 RAW 264.7 cell의 생존율을 확인하기 위해 MTT assay를 실시했으며, 그 결과는 Fig. 1에 나타내었다. RAW 264.7 cell에 대하여 HSW와 HSE 모두 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 각각 88.86%와 82.33% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. Yoo와 Lee(2020)는 애플망고 잎의 열수와 에탄올 추출물을 RAW 264.7 cell에 처리한 후의 세포 생존율을 확인한 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 열수의 경우 90% 이상의 생존율을 보였고 에탄올의 경우에는 80% 이상의 생존율을 보인 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 수국차 추출물과 비슷한 결과임을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 세포의 NO 소거능 실험은 추출물 자체의 세포독성으로 인한 지시세포 사멸의 가능성을 배제할 수 있도록 100

Fig. 1. Cell viability assay on macrophage RAW 264.7 of *Hydrangea serrata* Serrige extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of *Hydrangea serrata* Serrige extracts. Non: not treated any extract, HSW: water extract of *Hydrangea serrata* Serrige, HSE: 70% ethanol extract of *Hydrangea serrata* Serrige. Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

µg/mL 이하의 농도까지 처리하여 진행하였다.

세포 내 ROS 생성 소거 결과

체내에서 정상적인 대사과정 중에 생성되는 ROS는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase와 같은 체내의 항산화 효소들에 의해 제거된다(Aniya와 Naito, 1993). 그러나 과도하게 생성된 ROS는 세포들의 산화적 손상을 유발할 뿐만 아니라 염증반응의 신호전달계와 연결되어 암, 치매, 당뇨병, 류마티스 관절염과 같은 퇴행성 질환이나 노화를 촉진한다고 알려져 있다(Knowles와 Moncada, 1994). DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산하여 세포 안의 esterase에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해되고, 이후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띠는 DCF로 빠르게 산화하며, DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다(Choi 등, 2016). 세포에 DCF-DA를 적용한 후 과산화수소를 이용하여 ROS를 발현시켜 수국차

추출물의 ROS 발현에 대한 영향을 실험한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 과산화수소 비처리군(Non)에서의 ROS 생성은 약 31.98%였으며 500 µM의 과산화수소 단독처리군(Con)과 비교해서 수국차 추출물들은 대부분 농도 의존적으로 ROS의 생성이 억제되었고, 특히 HSW와 HSE 100 µg/mL의 농도에서 Con에서의 ROS 생성량 대비 각각 49.30%와 52.40%의 억제 효과를 나타내었다. Kim 등(2012)은 왕귀뽕나무잎 에탄올 추출물에서의 ROS 소거 활성을 실험하였는데, 그 결과 LPS를 처리한 대조군에서는 36.55%로 현저히 증가하였고 왕귀뽕나무잎 에탄올 추출물을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소하였으며 특히 0.05 mg/mL의 농도에서 23.86%의 양을 보였다고 보고하였다. 이는 약 38.72%의 생성 억제 효과가 있는 것으로 볼 수 있으며, 이러한 결과는 수국차 추출물의 ROS 소거 활성이 더욱 더 우수함을 보여준다.

Fig. 2. Reactive oxygen species scavenging ability of *Hydrangea serrata* Serrige extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of *Hydrangea serrata* Serrige extracts before treatment with H_2O_2 (500 µM) for 30 min. Non: not treated any extract and H_2O_2 , Con: only treated H_2O_2 , HSW: water extract of *Hydrangea serrata* Serrige, HSE: 70% ethanol extract of *Hydrangea serrata* Serrige. Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

<i>Hydrangea serrata</i> Serrige	-	-	+	+	+	+
H_2O_2 (500 µM)	-	+	+	+	+	+

NO 저해 활성 측정 결과

염증반응에 관여하는 주요 세포로 잘 알려진 대식세포는 조직과 장기에 존재하는 면역세포로서 손상된 부위를 회복 시키기 위해 여러 자극에 의해 활성화되어 NO와 전염증성 cytokine들의 생성을 촉진하여 감염 초기의 생체 방어에 중요한 역할을 한다(Jeong 등, 2012b; Yeom 등, 2004). 이러한 전염증성 cytokine들과 NO와 같은 염증인자들은 통증, 부종, 열과 같은 염증반응을 일으키며, 염증 부위로부터 면역세포의 이동을 촉진한다(Kim 등, 2012). 즉, 그람음성균의 세포막에 존재하는 내독소인 LPS를 마우스 대식세포주의 일종인 RAW 264.7 cell에 처리하면 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되며, 이에 의한 세포독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하므로 염증반응과 관련된 조직 손상에 NO와 iNOS의 발현이 증가함이 보고되어 있다(Mori, 2007). 본 연구에서는 RAW 264.7 cell에 LPS를 처리하여 자극하고 수국차 추출물을 첨가했을 때 NO 생성의 억제 정도를 알아보고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. LPS 단독처리군(Con)을 기준으로 LPS와 함께 HSW와 HSE를 처리했을 때 두 추출물 모두 농도 의존적으로 NO의 생성량이 감소하였으며, 100 µg/mL의 농도에서 HSW와 HSE는 Con에서의 NO 생성량 대비 약 24.87%와 31.35%의 감소 효과를 나타내었다. Yoo와 Lee(2020)는 애플망고 잎의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 NO 저해 활성을 측정한 결과를 보고하였는데, LPS 처리군에 비해 열수와 에탄올 추출물을 처리한 군이 100 µg/mL의 농도에서 약 70%와 65%의 NO가 생성된 것을 확인했다고 하였으며, 이는 수국차 추출물과 비교하여 약간 우수한 결과 값이고 유의할만한 수준이라고 판단된다. 또한 Koh 등(2009)은 민들레 잎을 온도별로 열수 추출하여 NO 생성의 저해 활성을 분석하였는데, 60°C에서 추출했을 때 가장 우수한 저해 효능을 보였고 250, 500, 1,000 µg/mL의 농도에

서 각각 약 7.5%, 19.5%, 29.8%의 저해 효과가 나타났다고 보고하였다. 이는 본 연구 결과에서 보여준 수국차 추출물의 저해 효능이 더욱 우수한 결과라고 볼 수 있다.

iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 결과

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적인 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복하고 재생하려는 기전이다(Tizard, 2012). 자극이 가해지면 국소적으로 염증성 성분과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발하며, 지속적인 염증반응은 점막 손상을 촉진하고 그 결과 여러 질환을 발생시킬 수 있다(Willoughby, 1975). 염증 반응에 의해 생성되는 NO는 매우 반응성이 큰 물질로 iNOS로부터 생산되며 그 자체로 조직 손상과 염증을 유발할 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 악화시키는 것으로 알려져 있다(Albina와 Reichner, 1995). COX는 cyclooxygenase와 peroxidase 활성을 모두 가지고 있는 효소이다. Cyclooxygenase 기능으로는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변환하고 peroxidase 기능으로는 endoperoxide를 prostaglandin으로 변환시키며, prostaglandin은 prostaglandins, thromboxane 및 prostacyclins의 전구체로 사용된다(Yun 등, 2008). 이 또한 유사 형태가 2가지 존재하는데, COX-1은 정상세포의 항상성을 유지하기 위해 거의 모든 조직에 발현되어 있고 prostaglandin을 생산하여 신장의 혈액 흐름을 조절하거나 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적인 기능을 조절한다. 반대로 COX-2의 경우는 미생물에 의한 감염이나 손상 혹은 여러 요인의 스트레스에 반응한 대식세포에서 발현된다(Hume 등, 2007). 특히 급성 염증반응에서 prostaglandins의 합성에 관여하고 LPS 및 cytokine에 의해 발현이 유도된다(Hume 등, 2007). 즉, iNOS와 COX-2의 발현과 NO,

Fig. 3. Nitric oxide inhibition assay on macrophage RAW 264.7 of *Hydrangea serrata* Seringe extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of *Hydrangea serrata* Seringe extracts. Non: not treated any extract and LPS, Con: only treated LPS, HSW: water extract of *Hydrangea serrata* Seringe, HSE: 70% ethanol extract of *Hydrangea serrata* Seringe. Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

Fig. 4. iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 of *Hydrangea serrata* Serrige extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of *Hydrangea serrata* Serrige extracts before treatment with LPS (1 µg/mL) for 24 h and the suppression of iNOS and COX-2 were assayed by western blot. Non: not treated any extract and LPS, Con: only treated LPS. (A) HSW: water extract of *Hydrangea serrata* Serrige, (B) HSE: 70% ethanol extract of *Hydrangea serrata* Serrige. Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

PGE₂는 면역세포의 대표적인 염증인자이다(Yun 등, 2008). 그리고 Jeong 등(2012a)은 iNOS의 단백질 발현억제가 NO 생성 억제에 영향을 주는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 RAW 264.7 cell에 LPS를 1 µg/mL 농도로 처리한 후 수국차 추출물을 농도별로 주입했을 때의 iNOS와 COX-2 발현의 억제 정도를 western blot을 통해 확인하였다(Fig. 4). 염증발현인자인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현은 농도 의존적으로 억제되었음을 알 수 있었고, iNOS의 경우 HSW와 HSE 모두 100 µg/mL의 농도에서 Con과 비교하여 매우 우수한 억제 효과(약 71.33%와 73.98%)를 나타내었다($P<0.05$). Yoo와 Lee(2020)는 애플망고 잎 열수와 에탄올 추출물에 대하여 iNOS와 COX-2의 저해 효과를 확인하였고, 그 결과 50 µg/mL의 농도에서 열수 추출물은 40.3%와 29.7%, 에탄올 추출물은 78.9%와 32.8%의 저해를 나타내었음을 보고하였다. 이는 본 연구에서 수국차 추출물의 저해 활성이 유의할만한 결과임을 보여준다.

MAPK의 발현 및 인산화 저해 효과

MAPK family인 ERK, JNK, p38은 cytokine, growth factor 및 환경 스트레스에 의해 유발되는 신호의 조절자로서 역할을 하고, 다양한 세포기능에 관여하는 것으로도 알려져 있다(Park 등, 2017). 또한 대식세포에서 MAPK의 인산

화 증가는 전사 번역 시 염증 매개체 합성 조절에 관여하여 염증반응을 증가시킨다고 보고되었다(Kaminska, 2005; Shin 등, 2012). ERK 신호전달 경로에서 인산화된 p-ERK는 자극인자에 의하여 광범위하게 활성화되는 반면, p38 및 JNK는 stress 반응경로를 구성하여 염증성 cytokine 같은 인자로 유도된 세포 스트레스에 의해 인산화된다고 보고되었다(Tizard, 2012). 본 연구에서는 수국차 추출물의 NO 생성 억제 활성이 ERK, JNK, p38의 인산화 억제와 관련이 있는지 확인하기 위해 LPS(1 µg/mL)로 자극한 RAW 264.7 cell에 다양한 농도의 수국차 추출물을 처리하여 ERK, JNK, p38의 인산화를 확인하였다(Fig. 5). HSW의 경우는 LPS 처리한 후의 ERK, JNK, p38의 인산화가 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 ERK의 인산화가 Con과 비교하여 약 41.8%가 억제되었다. HSE 또한 ERK, JNK, p38의 인산화가 농도 의존적으로 감소하였으며, 100 µg/mL의 농도에서의 발현 정도가 LPS 비처리군(Non)과 비교하여 유의한 억제 효과(35.37%, 38.28%, 51.01%)를 보였다($P<0.05$). Cho 등(2017)은 그라비올라 잎 에탄올 추출물에 대한 MAPK 인산화 억제 실험을 진행하였고, 그 결과 250 µg/mL의 농도에서 ERK, JNK, p38의 인산화가 각각 약 5%, 39.1%, 42.3% 저해되어 항염증 효과를 기대함을 보고하였다. 본 연구에서도 수국차 추출물의 MAPK의 인산화가 억제되므로 NO의

Fig. 5. Suppression effects of MAPK phosphorylations in LPS-stimulated RAW 264.7 of *Hydrangea serrata* Serrige extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of *Hydrangea serrata* Serrige extracts before treatment with LPS (1 µg/mL) for 24 h and the suppression of phosphorylations of ERK, JNK, and p38 were assayed by western blot. Non: not treated any extract and LPS, Con: only treated LPS. (A) HSW: water extract of *Hydrangea serrata* Serrige, (B) HSE: 70% ethanol extract of *Hydrangea serrata* Serrige. Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

생성을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 수국차 추출물에 대한 항산화 효과와 LPS에 유도된 RAW 264.7 cell에서 발현되는 염증인자인 NO 및 iNOS와 COX-2의 억제와 MAPK의 인산화 억제를 확인하고자 하였다. 전자공여능 실험과 ABTS 라디칼 소거 활성 실험의 결과, HSW와 HSE는 모두 500 µg/mL의 농도에서 우수한 소거능을 보였다. ROS 소거 활성능 결과 또한 HSW와 HSE 모두 100 µg/mL의 농도에서 과산화수소 단독처리군(Con)에서의 ROS 생성량 대비 각각 49.30%와 52.40%의 저해 효과를 나타내었다. 항염증 실험의 결과 HSW와 HSE 모두 LPS에 유도된 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성

은 LPS 단독처리군(Con)을 기준으로 농도 의존적으로 감소하였으며, iNOS와 COX-2의 단백질 발현의 경우도 HSW와 HSE 모두 농도 의존적으로 억제되었음을 알 수 있었다. MAPK의 신호전달 경로에서 ERK, JNK, p38의 인산화 또한 농도 의존적으로 매우 유의하게 억제되었다. 이러한 MAPK의 인산화 억제는 NO와 PGE₂의 발현을 유도하는 iNOS와 COX-2를 억제하므로 결국 수국차 추출물이 염증 관련 인자들의 생성을 억제 및 조절할 것으로 판단된다. 아직 수국차 추출물에 대한 항산화 및 항염증에 관한 연구보고는 극히 미비하므로 본 연구 결과를 바탕으로 수국차 추출물이 식품과 화장품 분야에 유용한 항염증 소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 향후 수국차 추출물의 유효성분에 관한 연구를 지속해 나가고자 한다.

REFERENCES

- Albina JE, Reichner JS. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz.* 1995. 3:46-64.
- Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1998. 25:113-120.
- Aniya Y, Naito A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharmacol.* 1993. 45:37-42.
- Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013. 13:679-692.
- Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today.* 1995. 16:128-130.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958. 181:1199-1200.
- Chan KM, Decker EA, Means WJ. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J Food Sci.* 1993. 58:1-4.
- Cho EJ, Lee JH, Sung NY, Byun EH. Anti-inflammatory effects of *Annona muricata* leaf ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2017. 46:681-687.
- Choi EY, Kim EH, Lee JB, Do EJ, Kim SJ, Kim SH, et al. Mechanisms for anti-wrinkle activities from fraction of black chokeberries. *J Life Sci.* 2016. 26:34-41.
- Choi HJ, Eun JS, Park YR, Kim DK, Li R, Moon WS, et al. Ikariside A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2008. 601:171-178.
- Choi KH, Nam HH, Choo BK. Effect of five Korean native *Taraxacum* on antioxidant activity and nitric oxide production inhibitory activity. *Korean J Med Crop Sci.* 2013. 21:191-196.
- Ci X, Ren R, Xu K, Li H, Yu Q, Song Y, et al. Schisantherin A exhibits anti-inflammatory properties by down-regulating NF-kappaB and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Inflammation.* 2010. 33:126-136.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982. 126:131-138.
- Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962. 48:1014-1022.
- Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, et al. Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food Preserv.* 2006. 13:83-87.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999. 284:1313-1318.
- Hume DA, Wells CA, Ravasi T. Transcriptional regulatory networks in macrophages. *Novartis Found Symp.* 2007. 281:2-18.
- Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf tea. *Korean J Food Sci. Technol.* 2008. 40:586-592.
- Jeong CH, Kim IH, Shim KH, Bae YI. Nutritional components and antioxidant activities of commercial loquat (*Eryobotrya japonica*) leaf tea. *J Agric Life Sci.* 2011. 45:105-112.
- Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012a. 41:888-894.
- Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J Plant Res.* 2012b. 25:299-307.
- Jo EH, Kim IH, Lee JH. Antioxidant and skin whitening effect of graviola (*Annona muricata*) leaf extracts. *Appl Chem Eng.* 2017. 28:198-205.
- Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta.* 2005. 1754:253-262.
- Kim IH, Chung NH, Han D, Lee CH, Oh SW. Extraction condition of beverage base for the processing of *Hydrangea serrata* Seringe. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2003. 32:1168-1171.
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012. 41:1205-1210.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994. 298:249-258.
- Koh YJ, Park YK, Kim YS, Cha DS, Choi HD. Preparation of hot water extracts of dandelion leaves to increase anti-inflammatory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009. 38:391-395.
- Lim JH, Kim BK, Park CE, Park KJ, Kim JC, Jeong JW, et al. Antioxidative and antimicrobial activities of persimmon leaf tea and green tea. *J East Asian Soc Diet Life.* 2008. 18:797-804.
- Manzi S, Wasko MC. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2000. 59:321-325.
- Matsuda H, Shimoda H, Yamahara J, Yoshikawa M. Effects of phyllostulcin, hydrangenol, and their 8-O-glucosides, and thunberginols A and F from *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO on passive cutaneous anaphylaxis reaction in rats. *Biol Pharm Bull.* 1999. 22:870-872.
- Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr.* 2007. 137:1616S-1620S.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983. 65:55-63.
- Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, et al. Differential regulation of IκB kinase α and β by two upstream kinases, NF-κB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95:3537-3542.
- Park JY, Ham H, Han SI, Oh SH, Song YC, Cho JH, et al. Comparison of antioxidant components and antioxidant activities of colored rice varieties (*Oryza sativa* L.) cultivated in southern plain. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016. 45:1214-1220.
- Park S, Shin HJ, Shah M, Cho HY, Anwar MA, Achek A, et al. TLR4/MD2 specific peptides stalled *in vivo* LPS-induced immune exacerbation. *Biomaterials.* 2017. 126:49-60.
- Shin JS, Kim JM, An WG. Anti-inflammatory effect of red ginseng through regulation of MAPK in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2012. 26:293-300.
- Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007. 67:4507-4513.
- Tak PP, Firestein GS. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001. 107:7-11.

- Tizard IR. Veterinary immunology: an introduction. 9th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, PA, USA. 2012. p 480.
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, et al. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Biomol Ther*. 2016. 24:184-190.
- Yamahara J, Matsuda H, Shimoda H, Ishikawa H, Kawamori S, Wariishi N, et al. Development of bioactive functions in *hydrangeae dulcis folium*. II. Antiulcer, antiallergy, and cholegaic effects of the extract from *hydrangeae dulcis folium*. *Yakugaku Zasshi*. 1994. 114:401-413.
- Yeom MJ, Choi BH, Han DO, Lee HJ, Shim I, Kim SH, et al. In vitro inhibition of pro-inflammatory mediator mRNA expression by nephrite in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2004. 18: 1622-1627.
- Yoo DH, Lee IC. Antioxidant effect and iNOS, COX-2 expression inhibition on RAW 264.7 cell of *Mangifera indica* L. leaves. *J Life Sci*. 2020. 30:783-790.
- Yoshikawa M, Uchida E, Chatani N, Murakami N, Yamahara J. Thunberginol A, B, and F, new antiallergic and antimicrobial principles from *hydrangeae dulcis folium*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992. 40:3121-3123.
- Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim CH, Kim BW, Park SD. Anti-inflammatory effect of injinho-tang in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol*. 2008. 23:169-178.
- Willoughby DA. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis*. 1975. 34:471-478.
- Wolfe KL, Liu RH. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing anti-oxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2007. 55:8896-8907.
- Zehnter R, Gerlach H. Enantiodifferentiation in taste perception of the phylodulcins. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1995. 6:2779-2786.
- Zhang H, Matsuda H, Kumahara A, Ito Y, Nakamura S, Yoshikawa M. New type of anti-diabetic compounds from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (*Hydrangeae Dulcis Folium*). *Bioorg Med Chem Lett*. 2007. 17:4972-4976.