



RESEARCH ARTICLE

Open Access

A Study on Antioxidant and Anti-inflammatory of *Salvia microphylla* Ethanol Extract

Guen Won Choi¹, Hyeon Mi Jo¹, In Ho Choi^{1,2*}¹Department of Biomaterials Science, Gyeongsang National University, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, Korea²Department of Plant and Biomaterials Science, Gyeongsang National University, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, Korea

*Corresponding author: In Ho Choi,
Department of Plant and Biomaterials
Science, Gyeongsang National University,
33, Dongjin-ro, Jinju-si, Gyeongsangnam-do
52725, Korea
Tel.: +82 55 772 3228
Fax: +82 55 772 3771
Email: inhochoi@gnu.ac.kr

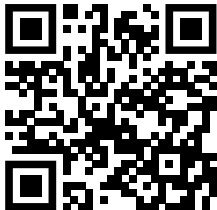
Guen Won Choi and Hyeon Mi Jo contributed
equally to this work.

Received July 31, 2023

Revised August 29, 2023

Accepted September 04, 2023

Published September 30, 2023



Abstract

Purpose: This study was aimed at investigating the anti-inflammatory and antioxidant properties of *Salvia microphylla* (SM) extract (SME). **Methods:** Powdered SM was treated with ethanol and decocted to acquire SME. The antioxidant activities of SME were assessed by evaluating its total polyphenolic, and flavonoid, contents and performing 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assays. The anti-inflammatory activities of SME were verified by examining the inhibition of nitric oxide (NO) production, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in lipopolysaccharide (LPS) activated RAW 264.7 macrophages. **Results:** The total polyphenol and flavonoid contents in SME were 102.26 ± 0.39 mg GAE/g and 377.42 ± 0.77 mg QUE/g, respectively. The DPPH and ABTS assays revealed the antioxidant activities of SME by exhibiting their ability to scavenge radicals in a concentration-dependent manner (50-1000 $\mu\text{g/mL}$). The cell viability of SME exceeded 99% at 50-1000 $\mu\text{g/mL}$. The concentration-dependent reduction in the expression of the inflammation mediator iNOS and subsequent NO production indicated an approximately 100% inhibition efficacy at 600 $\mu\text{g/mL}$ ($0.00 \pm 1.34\%$). These results confirmed the potential of SME as a component of cosmeceuticals. **Conclusion:** Based on the findings of this study, SME is explicitly acknowledged for its applicability as a natural preservative possessing antioxidant and anti-inflammatory activities as well as a raw material for cosmeceuticals intended to alleviate skin irritation.

Keywords: Anti-inflammatory, Antioxidant, iNOS, Nitric oxide, *Salvia microphylla*

Introduction

현대를 살고 있는 인류는 생활환경과 식습관의 변화로 생활습관병이 증가하고 생물학적, 화학적 위해 환경 등에 빈번히 노출되어 생체 내의 면역 조절 기능 이상으로 알러지, 아토피 등의 염증성 피부질환이 증가하고 있다(Kim *et al.*, 2022). 화학적으로 합성된 항염제제의 장기간 사용에 따른 부작용 사례들이 보고되면서 천연소재를 활용한 항염 활성 물질 탐색이 진행되고 있으며, 또한 항산화능을 가진 천연소재들은 페놀산과 플라보노이드 등을 함유하고 있으며, 이를 많이 함유하고 있는 천연소재들은 뛰어난 항염 효과가 보고된 결과들을 바탕으로 항산화 활성이 우수한 천연물질들의 항염 활성을 확인하는 연구들이 활발히 수행되고 있다(Kim *et al.*, 2017; Namiki, 1990).

염증반응은 다양한 유형의 감염으로 발생하거나 대물질 또는 외부의 물리적, 화학적 자극에 의한 손상으로부터 생체를 보호하기 위한 생체조직의 방어 기전으로 신체 손상을 회복하는 반응이다(Lee & Kim, 2018; Shim, 2018; Kim *et al.*, 2022). 염증반응에 관여하는 세포인 macrophage, monocyte, 비만세포 등은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종(reactive nitrogen species), prostaglandin E2 (PGE2), 염증성 cytokine 등의 염증 매개체들을 분비한다(Lee & Kim, 2018). 세포의 nitric oxide synthase (NOS)에는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS)이 있으며 이중 iNOS가 염증반응에 주로 관여하며, interferon- γ (IFN- γ), lipopolysaccharide (LPS), 염증성 사이토카인의 자극이 있을 때 발현된다. 염증 시 iNOS에 의해 생성된 NO는

염증반응을 촉진시킨다(Jung & Cho, 2011; Kim *et al.*, 2022). 따라서 NO의 생성이나 PGE2, ROS, 염증성 cytokine 등의 발현억제는 염증성 질환 치료 예방에 주요한 역할을 한다(Lee & Kim, 2018; Shim, 2018).

*Salvia microphylla*는 멕시코가 원산지인 꿀풀과(Lamiaceae) *Salvia*속에 속하는 식물이며 "Hotlip sage" 라고도 불린다(Fair *et al.*, 2012). *Salvia microphylla* 차는 전통적으로 복통과 설사와 같은 위장 문제를 치료하고 불면증 치료에 사용되어왔다(Jenks & Kim, 2013; Pérez-Nicolás *et al.*, 2018). 부인과 질병에 사용되었으며(Jenks & Kim, 2013), 항산화(Cha *et al.*, 2009), 항종양제(Mathew & Thoppil, 2012) 항박테리아, 리파아제 억제제, 유리라디칼 억제제(Villa-Ruano *et al.*, 2013), 살충효과(Zavala-Sánchez *et al.*, 2013; Romo-Asunción *et al.*, 2016) 등에 효과가 있다고 보고되었다. 그러나 SME에 대한 RAW 264.7 cell의 염증 완화에 관련된 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 LPS에 의해 자극이 유발된 RAW 264.7 cell에 SME의 항산화 활성과 항염 효과를 확인하여 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

Methods

1. 추출물 제조

본 실험에서 분석을 위해 사용된 *S. microphylla*는 경상남도 거창군 가조면에 소재하는 플라워쉐프 농장에서 채취하였다. 추출물은 *S. microphylla* 파우더 20 g과 50% 에탄올 400 mL을 용매로 상온에서 7일간 정치하여 추출하였으며, 추출물은 여과지(Whatman No.2; GE Healthcare, UK)를 사용하여 2회 여과하고, 감압 하에서 Rotary Evaporator (Eva-5; DAIHAN Scientific, Korea)로 농축하고, 용매를 제거한 후 본 실험에 사용할 때까지 냉동 보관하였다.

2. 세포 배양

본 실험에 사용된 마우스 대식세포 계열 RAW 264.7 cell (murine macrophage cell line) 은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 cell는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, USA)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL)을 넣은 Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM; HyClone, Cytiva, USA)에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 일부 변형하여 분석하였다(Ainsworth & Gillespie, 2007). 총 polyphenol을 측정하기 위해 gallic acid (Daejung chemicals & metals Co., LTD., Korea)를 농도별(0-800 µg/mL)로 희석하여 사용하였다. SME 또는 gallic

acid 50 µL와 50% Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, USA) 50 µL를 혼합 후 3 min 반응하였다. 그 후 2% Na₂CO₃ 1 mL과 혼합 후 30 min 반응시키고, 700 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 건조추출물 무게에 대한 gallic acid의 표준곡선과 비교하여 mg GAE/g로 표현하였다.

4. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 aluminum chloride colorimetric 방법을 일부 변형하여 분석하였다(Zhishen *et al.*, 1999). 총 flavonoid를 측정하기 위해 quercetin (Sigma-Aldrich)을 농도별(0-1 mg/mL)로 희석하여 사용하였다. SME 또는 quercetin 25 µL, 증류수 125 µL, 5% NaNO₂ 10 µL를 혼합 후 5 min 반응하였다. 반응 후 10% AlCl₃ 15 µL를 첨가하고 6 min 반응시켰다. 그 후 1 M NaOH 50 µL를 첨가한 후, 510 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정한다. 총 flavonoid 함량은 건조 추출물 무게에 대한 quercetin의 표준곡선과 비교하여 mg QUE/g로 표현하였다.

5. DPPH radical 소거능 측정

항산화능 분석을 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Alfa Aesar, USA) radical을 일부 변형하여 측정하였다(Blois, 1958). 0.2 mM의 DPPH용액 60 µL에 농도별(50-1000 µg/mL)로 희석한 시료 120 µL를 96 well plate에 처리하였다. 암실에서 15 min 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거활성 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성되는 ABTS free radical이 항산화제에 의해 소거되어 청색이 사라지는 것을 이용하여 측정하였다(Re *et al.*, 1999). 7 mM 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; WAKO, Japan) 시약 100 µL에 농도별(50-1000 µg/mL)로 희석한 시험물질 50 µL를 96-well plate에 처리하였다. 암실에서 5 min 반응시킨 뒤 microplate reader로 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 통해 확인하였다. RAW 264.7 cell를 96 well plate (3×10³ cells/well)에 분주한 다음, 16-24 h 동안 배양하였다. 그 후 추출물을 50-1000 µg/mL로 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24 h 배양하였다. 세포의 생존율을 확인하기 위해서 well 당 MTT (Sigma-Aldrich) (5 mg/mL)를 10 µL 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30 min 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 형성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO;

Sigma-Aldrich) 150 µL로 녹이고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. NO 생성 억제능 측정

NO 생성 억제능을 확인하기 위하여 24 well plate에 RAW 264.7 cell를 2.5×10⁵ cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에 24 h 배양한 후 실험에 사용하였다. 배양시킨 cell을 1 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich)가 포함된 배지로 교환 후, SME를 농도별(50-1000 µg/mL)로 첨가하여 24 h 배양하였다. 배양 후 상층액을 얻어, 세포배양액 중으로 분비한 NO 양을 griess reagent system (Promega, USA)를 이용하여 측정하였다. 생성된 NO 양은 sodium nitrite (NaNO₂)를 이용하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다

9. Western blot 분석을 통한 단백질 발현 측정

항염 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 cell (1×10⁶ cells)을 100 mm 배양접시에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에 24 h 동안 배양 후, 상층액 제거, phosphate buffer saline (PBS)로 세척 후, SME를 농도별로 1 h 처리한 뒤 LPS 1 µg/mL 처리 후에 24 h 추가 배양하였다. 배양 후 Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer; Cell signaling, USA)를 이용하여 용해한 후, 원심분리기(Centrifuge 5430R; Eppendorf, Germany)를 이용하여 원심분리(10,000×g, 10 min)로 단백질을 분리하였으며, BCA protein assay kit (iNtron Biotechnology, Inc., Korea)로 단백질을 정량하였다. 12% polyacrylamide SDS gel에서 전기영동 한 후, polyvinylidene fluoride (PVDF; Sigma-Aldrich) membrane으로 이동시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer (3% skim milk; BD Difco, USA) 로 2 h blocking하고 primary antibody (CST, USA) 를 blocking buffer에 희석하여 4°C에서 overnight 하였다. PBS-T (0.05% Tween 20 in PBS)로 washing 후 secondary antibody (CST, USA)를 blocking buffer에 희석하여 실온에서 반응시켰다. PBS-T 로 washing하고 West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)에 반응 후, Chemiluminescent imaging system (Fusion Solo S, VILBER, France)을 이용하여 단백질 발현을 측정하였다. Image J program (National Institutes of Health, USA)을 사용하여 상대적인 단백질 발현을 정량하였다.

10. 통계처리

실험결과는 mean±SD로 표기하였으며, Graphpad Prism software (version 5.00 for Windows, USA) 프로그램을 이용한 one

way ANOVA를 실시한 후 Tukey's test 방법을 사용하여 그 결과 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

Results and Discussion

1. S. microphylla 에탄올추출물의 항산화 효과

가. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 평가

페놀 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있으며, 다양한 구조와 분자량을 가지고 있는 2차 대사산물로서 phenolic hydroxy기를 가지고 있어 단백질과 같은 큰 분자들과 결합하는 성질이 있으며, 항산화의 생리활성 기능을 가지고 있다(Park & Ryu, 2022).

플라보노이드는 식물의 꽃, 줄기 및 열매 등에 많이 함유되어 있으며, 항산화, 항염 효과, 면역개선, 항바이러스 등 여러 생리활성 작용이 있다(Park & Na, 2020). 세이지 종들은 페놀 화합물에 기반한 항산화 특성으로 널리 사용되고 있다(Poulios et al., 2020).

SME의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 각각 102.26±0.39 mg GAE/g과 377.42±0.77 mg QUE/g으로 확인되었다(Table 1). 플라보노이드는 ROS를 제거하여 항산화 효능이 우수하다고 보고되어졌으며, 폴리페놀과 같이 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 보고되어졌다(Kim et al., 2012).

나. DPPH radical 소거능 평가

SME의 DPPH radical 소거능을 측정한 전자공여능(EDA) 결과를 Figure 1에 나타내었다. DPPH는 radical 소거능을 평가하기 위하여 일반적으로 사용된다. DPPH radical 소거능은 보라색의 DPPH가 항산화 물질에 의해 환원되면서 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 산화 방지제 활성을 측정하며 그 측정 방법이 비교적 간단하여 여러 시료로부터 항산화 활성을 탐색할 때 유용하다(Huang et al., 2005). SME는 50-1000 µg/mL에서 농도의존적으로 소거활성을 나타내었다. 200 µg/mL에서 79.00±0.16%, 400 µg/mL에서 85.91±0.17%, 600 µg/mL에서 86.12±1.00% 및 1000 µg/mL에서 88.20±0.39%의 소거활성을 나타내었다. 세이지 종인 Salvia officinalis L 60% 에탄올 추출물은 200 µg/mL에서 66.3±2.2%의 DPPH radical 소거능이 보고되었다(Cha et al., 2009). 따라서 SME의 DPPH radical 소거능이 우수하다고 판단할 수 있었다.

다. ABTS radical 소거능 평가

ABTS radical 소거능은 항산화 측정방법으로 단기간에 측정이 가

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents of Salvia microphylla ethanol extract

Sample	Total phenolic content (mg GAE/g)	Total flavonoid content (mg QUE/g)
SME	102.26±0.39	377.42±0.77

SME, Salvia microphylla ethanol extract. The values are then expressed as mean±SD of three independent experiments.

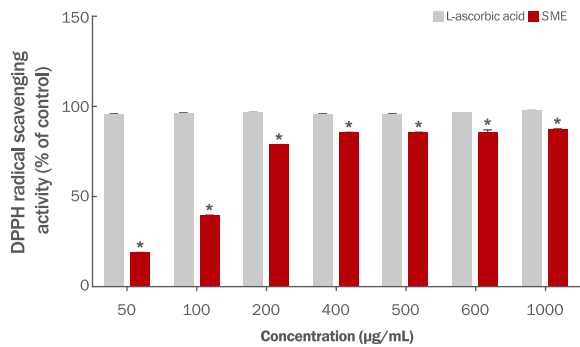


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of *Salvia microphylla* ethanol extract.

DPPH radical scavenging assays were conducted to investigate the antioxidant effects of SME at various concentration. The values are then expressed as mean±SD of three independent experiments (**p*<0.05). SME, *Salvia microphylla* ethanol extract.

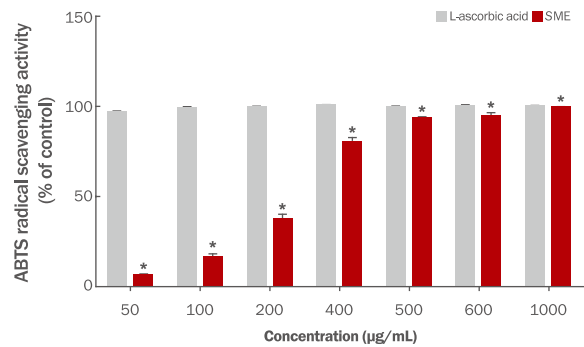


Figure 2. ABTS radical scavenging activity of *Salvia microphylla* ethanol extract.

ABTS radical scavenging assays were conducted to investigate the antioxidant effects of SME at various concentration. The values are then expressed as mean±SD of three independent experiments (**p*<0.05). SME, *Salvia microphylla* ethanol extract.

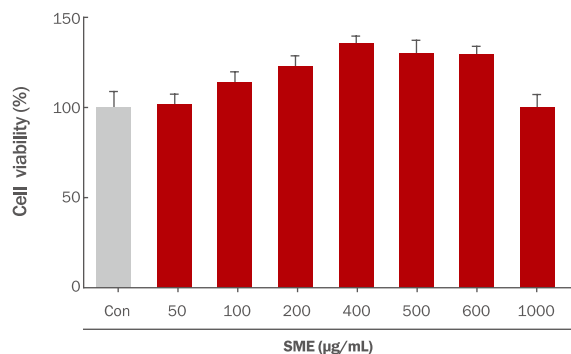


Figure 3. Effect of *Salvia microphylla* ethanol extract on cell viability of RAW 264.7 cell.

RAW 264.7 cells were treated with various concentration of SME (50–1000 µg/mL) using MTT assay. The responses in the control in each test are expressed as 100%. Each value expresses the mean±SD of three independent experiments. Con, none treated control; SME, *Salvia microphylla* ethanol extract.

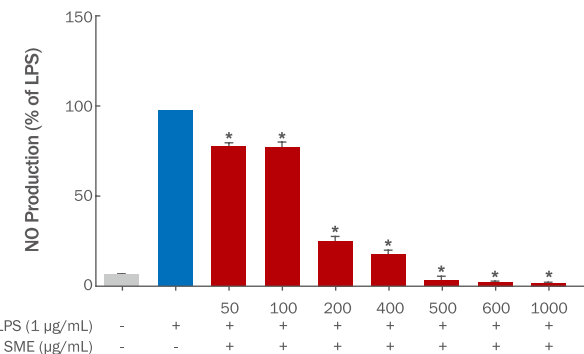


Figure 4. Effect of *Salvia microphylla* ethanol extract on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cell.

RAW 264.7 cells were treated with SME and LPS (1 µg/mL). Each value expresses the mean±SD of three independent experiments (**p*<0.05). LPS, lipopolysaccharide treated control; SME, *Salvia microphylla* ethanol extract.

능하며, 시료의 황산화제가 potassium persulfate과 반응하여 생성된 ABTS radical을 제거한다는 점을 이용하여 지용성과 수용성 물질을 모두 측정할 수 있다(Um & Ryu, 2022).

Cha *et al.* (2009) 연구에서는 세이지 종인 *Salvia officinalis* L 60% 에탄올 추출물은 200 µg/mL에서 97.6±0.1%의 ABTS radical 소거능이 보고되었다. SME의 ABTS radical 소거능은 50–1000 µg/mL에서 농도의존적으로 소거활성을 나타내었다. 400 µg/mL에서 80.87±0.54%, 600 µg/mL에서 94.92±0.87% 및 1000 µg/mL에서 99.27±0.13%의 소거활성을 나타내었다(Figure 2). 이와 같이 SME는 농도의존적으로 ABTS radical 소거능이 우수하다고 판단할 수 있었다.

2. 세포 생존율

SME가 대식세포인 RAW 264.7 cell에 미치는 생존율을 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. SME를 50–1000 µg/mL 농도로 처리하여 24 h 배양시킨 후 대조군과 비교하였다. SME는 50 µg/mL에서 101.03±5.12%, 200 µg/mL에서 122.04±4.89%, 400 µg/mL에서 134.20±3.88% 및 1000 µg/mL에서 99.09±6.51%의 세포생존율을 나타내었다(Figure 3). 세포 생존율은 50–1000 µg/mL의 전체 농도에서 99% 이상으로 ISO 10993–5 기준에 의거하여 본 실험에 사용된 SME의 실험농도에서는 세포독성이 나타나지 않은 것으로 확인되었다. 따라서 이후 실험은 99% 이상의 생존율을 나타내는 50–1000 µg/mL 농도에서 진행하였다.

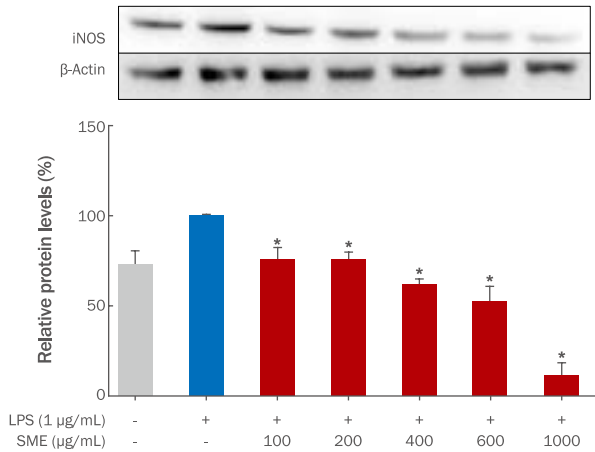


Figure 5. Effect of *Salvia microphylla* ethanol extract on iNOS protein expression in RAW264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated SME at various concentration (100-1000 µg/mL) for 1 h and then treated LPS (1 µg/mL) for 24 h. iNOS protein expression was determined in RAW 264.7 cells treated with SME. Each value expresses the mean±SD of three independent experiments (**p*<0.05). LPS, lipopolysaccharide treated control; SME, *Salvia microphylla* ethanol extract.

3. NO 생성 억제능 평가

NO의 생성이나 PGE2, ROS, 염증성 cytokine 등의 발현억제는 염증성 질환을 치료하거나 노화 예방에 주요한 역할을 한다(Lee & Kim, 2018; Shim, 2018). NO는 조직과 신경 손상을 유발하고, 유전자 변이를 유도하거나, 부종을 유발하는 등 과도한 염증반응을 일으킨다(Shim, 2018).

LPS만 처리한 대조군의 NO 생성량을 기준(100%)으로 SME의 NO 생성은 50-1000 µg/mL에서 농도의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. 600 µg/mL에서는 0.00±1.34%로 100%에 가까운 억제효과를 나타내어 SME의 항염 활성이 우수한 것으로 판단할 수 있었다(Figure 4).

4. Western blot 분석을 통한 iNOS 단백질 발현억제 효과

염증 관련 인자인 NOS는 3가지의 isoform으로 NOS I (neuronal NOS, nNOS), NOS II (inducible NOS, iNOS), NOS III (endothelial NOS, eNOS)가 알려져 있으며, nNOS와 eNOS는 항상 발현되어 있어서 constitutive NOS (cNOS)라하며, iNOS는 대식세포 등에서 cytokine, LPS와 같은 내독소의 자극에 의해 발현되어 NO 생성을 촉진시켜 세포독성, 염증성 질환 등의 작용이 발생한다(Yim, 2010; Cossenza *et al.*, 2014). 이러한 염증 관련 인자에 대한 억제효과를 확인하여 항염 활성을 확인하고자 하였다.

SME에 대해 iNOS의 단백질 발현은 Western blot을 통해 측정 한 결과를 Figure 5에 나타내었다. iNOS의 단백질 발현량은 100 µg/mL (74.84±5.95%), 200 µg/mL (74.68±3.53%), 400 µg/mL (60.43±2.87%), 600 µg/mL (50.72±7.64%) 및 1000 µg/mL

(10.08±5.78%)로 농도의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. 결과와 같이 SME는 NO 소거능과 iNOS 발현억제에 의한 항염 효과가 있을 것으로 판단되었다.

세이지 중에는 가장 중요한 생물학적 활성 화합물로 quercetin, rosmarinic acid, caffeic acid, linalool, luteolin-7-glucoside, camphor, 1,8-cieole, α-pinene이다(Poulios *et al.*, 2020). 이 중 caffeic acid 및 유도체는 항염 작용으로 NO 소거능뿐만 아니라, iNOS 발현 억제가 보고되었다(Da Cunha *et al.*, 2004).

Conclusion

최근 현대 사회는 도시화와 산업의 발전으로 유해 환경으로부터의 수 많은 노출과 식생활 변화 등에 의한 생체 면역 조절 이상으로 알러지, 아토피 및 염증 등의 질환이 증가하고 있다(Kim *et al.*, 2022).

본 연구에서는 SME의 항산화 활성 및 항염 활성 등을 평가하여 SME의 피부질환 개선 기능성 소재로서 이용 가능성을 확인하고자 하였다. 항산화 활성은 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, DPPH 및 ABTS를 이용하여 확인하였다. 그 결과, SME의 총 폴리페놀과 플라보노이드는 각각 102.26±0.39 mg GAE/g과 377.42±0.77 mg QUE/g, DPPH radical 소거활성은 농도의존적인 활성을 나타내었으며, 200 µg/mL에서 75% 이상의 소거능을 확인하였다. 또한 ABTS radical 소거활성도 농도의존적인 반응을 나타내었으며, 400 µg/mL에서 80% 이상의 소거능을 확인하였다. 전체적인 농도로 보았을 때 SME의 항산화 활성이 뛰어난 것으로 확인되었다. 세포 생존율은 50-1000 µg/mL에서 99% 이상의 세포 생존율을 나타내어 SME의 세포 독성이 없음을 확인하였다. 항염 활성은 SME의 NO 생성억제와 iNOS 단백질 발현억제 효과를 확인하여 항염 활성을 확인하였다. SME의 NO 생성억제 활성은 50-1000 µg/mL에서 농도의존적인 감소를 나타내었고, 600 µg/mL에서 0.00±1.34%로 100%에 가까운 NO 생성억제효과를 확인하였다. 염증 관련 인자인 iNOS 단백질 발현량도 600 µg/mL에서 50.72±7.64%, 1000 µg/mL에서 10.08±5.78%로 감소하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로부터 SME는 NO 소거능뿐만 아니라 iNOS 발현억제에 의한 염증 억제능이 있는 것으로 판단되어 *S. microphylla* 에탄올추출물이 화장품에서 항산화 및 항염 활성이 있는 기능성화장품 원료로서 유용하게 활용 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2021R1G1A1094165).

Author's contribution

IHC designed all the experimental investigations.

Biological activity experiments were conducted together by GWC and HMJ, and IHC oversaw the project and contributed to all aspects of analysis and experimental design.

Author details

Guen Won Choi (Graduate Student), Department of Biomaterials Science, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52725, Korea; Hyeon Mi Jo (Graduate Student), Department of Biomaterials Science, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52725, Korea; In Ho Choi (Professor) Department of Plant and Biomaterials Science, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52725, Korea.

References

- Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2: 875-877, 2007.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200, 1958.
- Cha WS, Ju IS, Yun DH, Chun SS, Kim JH, Cho YJ. Biological activity of extracts from cherry sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Life Science*, 19: 390-396, 2009.
- Cossenza M, Socodato R, Portugal CC, Domith IC, Gladulich LF, Encarnacao TG, Calaza KC, Mendoca HC, Campello-Costa P, Paes-de-Carvalho R. Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects. *Vitamin & Hormones*, 96: 79-125, 2014.
- Da Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, Calixto JB. Caffeic acid derivatives: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties. *Free Radical Research*, 38: 1241-1253, 2004.
- Fair BA, Whipker, B, McCall I, Buhler W. Height control of 'hot lips' hybrid sage to flurprimidol substrate drench. *HortTechnology*, 22: 539-541, 2012.
- Huang D, Ou B, Prior RL. Review of major theories of skin aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856, 2005.
- Jenks AA, Kim SC. Medicinal plant complexes of *Salvia subgenus* Calospathace: an ethnobotanical study of new world sages. *Journal of Ethnopharmacol*, 146: 214-224, 2013.
- Jung JE, Cho EJ. Enhancement of anti-inflammatory effect of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* fruits by fermentation. *Cancer Prevention Research*, 16: 263-268, 2011.
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean Journal of Food Science Technology*, 44: 337-342, 2012.
- Kim HM, Yoo DH, Lee IC. Verification of anti-inflammatory efficacy of apple mango (*Mangifera indica* L.) peel in LPS-activated macrophage. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 50: 337-346, 2022.
- Kim SH, Choi SC, Youn YH, Ko CI, Ha YS, Lee IA. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Dioscorea japonica* and *Chenopodium album*. *Journal of the Society Cosmetic Scientists of Korea*, 43: 337-347, 2017.
- Lee JN, Kim TS. The effects of *Paeonia lactiflora* Pallas on inhibition of oxygen free radical, anti-inflammation and MMP-1 inhibitory activity. *Journal of Oil & Applied Science*, 35: 797-806, 2018.
- Mathew J, Thoppil JE. Investigation of the antimutagenic activity of three *Salvia* extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4: 225-230, 2012.
- Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29: 273-300, 1990.
- Park JS, Na HS. Comparison of the antioxidative activities of green and red leaves teas of blueberry. *Journal of the Korean Tea Society*, 26: 56-61, 2020.
- Park RJ, Ryu MJ. Antioxidant and antimicrobial effect of rosemary, parsley, thyme, chive, and dill extracts. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 20: 305-314, 2022.
- Pérez-Nicolás M, Vibrans H, Romero-Manzanares A. Can the use of medicinal plants motivate forest conservation in the humid mountains of northern Oaxaca, Mexico?. *Botanical Sciences*, 96: 267-285, 2018.
- Poulios E, Giaginis C, Vasios GK. Current state of the art on the antioxidant activity of sage (*Salvia* spp.) and its bioactive components. *Planta Medica*, 86: 224-238, 2020.
- 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 Biology and Medicine*, 26: 1231-1237, 1999.
- Romo-Asunción D, Ávila-Calderón MA, Ramos-López MA, Barranco-Florido JE, Rodríguez-Navarro S, Romero-Gomez S, Aldeco-Pérez EJ, Pacheco-Aguilar JR, Rico-Rodríguez MA. Juvenomimetic and insecticidal activities of *Senecio salignus* (Asteraceae) and *Salvia microphylla* (Lamiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 99: 345-351, 2016.
- Shim JH. Anti-inflammatory effect of *Galium aparine* extract in RAW264.7 cells. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 16: 223-242, 2018.
- Um TS, Ryu MJ. Antioxidant and elastase, tyrosinase, α -glucosidase inhibitory effects of five types of mint extracts. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 20: 295-304, 2022.
- Villa-Ruano N, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Betancourt-Jiménez MG, Cruz-Durán R, Duque-Bautista H. Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biological Research*, 46: 153-160, 2013.
- Yim CY. Nitric oxide and cancer. *The Korean Journal of Medicine*, 78: 430-436, 2010.
- Zavala-Sánchez MA, Pérez Gutiérrez S, Romo-Asunción D, Cárdenas-Ortega NC, Ramos-López MA. Activity of four *Salvia* species against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Southwestern Entomologist*, 38: 67-73, 2013.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64: 555-559, 1999.

국문초록

Salvia microphylla 에탄올추출물의 항산화 및 항염에 관한 연구최근원¹, 조현미¹, 최인호^{1,2*}¹경상국립대학교 바이오신소재과학과, 경상남도 진주시, 한국²경상국립대학교 향노화신소재과학과, 경상남도 진주시, 한국

목적: 본 연구는 *Salvia microphylla* 에탄올추출물(SME)의 항산화 활성 및 항염 활성을 확인하는 목적으로 진행되었다. **방법:** 본 연구에서 SME는 50% 에탄올을 용매로 상온에서 7일간 정치하여 추출하였다. 항산화 활성은 총 폴리페놀, 플라보노이드, DPPH 및 ABTS radical 소거능 방법을 사용하여 측정하였다. 항염 활성은 LPS 처리된 RAW 264.7 세포로부터 NO 생성 감소와 iNOS 단백질 발현량 감소를 확인하여 검증하였다. **결과:** 본 연구에서는 SME의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 102.26±0.39 mg GAE/g, 377.42±0.77 mg QUE/g를 나타내었다. DPPH와 ABTS는 50–1000 µg/mL에서 농도의존적 항산화 활성을 나타내었다. SME의 세포생존율은 50–1000 µg/mL에서 99% 이상으로 세포독성은 없는 것으로 나타내었다. SME는 농도의존적으로 NO 생성을 감소 효과를 나타내었으며, 600 µg/mL에서 0.00±1.34%로 100%에 가까운 NO 생성 억제 효과를 확인하였다. 더욱이 염증관련 인자인 iNOS의 단백질 발현량은 농도의존적인 감소 효과로 항염 활성을 확인하였다. SME이 코스메슈티컬의 성분으로 잠재력을 확인할 수 있었다. **결론:** 본 연구는 이와 같은 결과들로부터 SME는 화장품에서 항산화 및 항염 활성이 있는 천연방부제 및 피부 자극 완화와 관련된 원료로서 유용하게 활용 가능할 것으로 사료된다.

핵심어: *Salvia microphylla*, 항산화, 항염, NO, iNOS

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2021R1G1A1094165).

참고문헌

- 김신애, 최수철, 윤영한, 고창인, 하영순, 이인아. 참마와 명아주의 항산화 및 항염 효과. *대한화장품학회지*, 43: 337–347, 2017.
- 김은진, 최주연, 유미리, 김미영, 이상현, 이복희. 자생식물과 생약자원 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 탐색. *한국식품학회지*, 44: 337–342, 2012.
- 김효민, 유단희, 이인철. LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 애플망고 껍질(*Mangifera indica* L. Peel)의 항염 효능 검증. *한국미생물생명공학회지*, 50: 337–346, 2022.
- 박량주, 유민정. 로즈마리, 파슬리, 타임, 차이브, 딜 추출물의 항산화 및 항균효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 20: 305–314, 2022.
- 박정숙, 나환식. 블루베리 잎차의 항산화 활성 비교. *한국차학회지*, 26: 56–61, 2020.
- 심중현. 갈퀴덩굴 추출물에 의한 RAW 264.7 세포에서의 항염 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 16: 233–242, 2018.
- 엄태순, 유민정. 민트류 5종 추출물의 항산화 및 elastase, tyrosinase, α-glucosidase 저해효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 20: 295–304, 2022.
- 이재남, 감영삼. 적작약 꽃 추출물의 활성산소 억제와 항염 및 MMP-1 발현억제능 효과에 관한 연구. *오일 및 응용과학학회지*, 35: 797–806, 2018.
- 임창열. Nitric oxide와 종양. *대한내과학회지*, 78: 430–436, 2010.
- 정지은, 조은주. 발효에 의한 대추의 항염증 증진 효과. *대한암예방학회지*, 16: 263–268, 2011.
- 차원섭, 주인식, 윤동혁, 천성숙, 김정환, 조영제. 체리세이지(*Salvia officinalis* L.) 추출물의 생리활성 탐색. *생명과학회지*, 19: 390–396, 2009.

中文摘要

櫻桃鼠尾草 (*Salvia microphylla*) 乙醇提取物的抗氧化以及抗炎研究

崔根源¹, 趙賢美¹, 崔仁鎬^{1,2*}

¹庆尚国立大学生物新素材科学科, 庆尚南道晋州市, 韩国

²庆尚国立大学抗衰老新素材科学科, 庆尚南道晋州市, 韩国

目的: 本研究旨在研究櫻桃鼠尾草 (*Salvia microphylla*, SM) 提取物 (SME) 的抗炎和抗氧化特性。**方法:** 将SM粉末用乙醇处理, 煎煮得SME。通过评估其总多酚和黄酮类化合物的含量, 并测定DPPH和ABTS自由基清除活性来评估SME的抗氧化活性。通过检测脂多糖 (LPS) 激活的RAW 264.7巨噬细胞中一氧化氮 (NO) 产生和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达的抑制作用, 验证了SME的抗炎活性。**结果:** SME中总多酚和黄酮含量分别为 102.26 ± 0.39 mg GAE/g和 377.42 ± 0.77 mg QUE/g。DPPH和ABTS检测通过显示SME以浓度依赖性方式 (50-1000 μ g/mL) 清除自由基的能力, 揭示了SME的抗氧化活性。SME在50-1000 μ g/mL时, 细胞活力超过99%。炎症介质iNOS表达和随后的NO产生呈浓度依赖性减少, 表明600 μ g/mL时的抑制功效约为100% ($0.00 \pm 1.34\%$)。这些结果证实了SME作为药妆品成分的潜力。**结论:** 根据本研究的结果, SME因其作为具有抗氧化和抗炎活性的天然防腐剂以及旨在减轻皮肤刺激的药妆原料的适用性而得到明确认可。

关键词: 抗炎, 抗氧化剂, iNOS, 一氧化氮, 櫻桃鼠尾草

