大韓本草學會誌 제38권 제4호(2023년 7월)
Kor. J. Herbol. 2023 ; 38(4) : 21-29

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2023.38.4.21

강원도 가시오갈피의 식물 부위 또는 추출 용매 조건에 따른 항염증 효과

박준규[1#], 부민아[1#], 안수진[2], 신수진[3], 박진봉[4], 최호영[5], 이경진[5*]

1 : 경희대학교 대학원 한의과대학 기초한의과학과 석사과정생, 2 : 경희대학교 한의과대학 한의학과 학사과정생
3 : 경희대학교 한의과대학 한의학과 박사과정생, 4 : 경희대학교 한의과대학 약리학교실
5 : 경희대학교 한의과대학 본초학교실

Anti-inflammatory Effect of *Eleutherococcus senticosus* Extracts from Gangwon-do by Plant parts or Solvents

Junkyu Park[1#], Mina Boo[1#], Soojin An[2], Sujin Shin[3], Jinbong Park[4]
Ho-Young Choi[5] and Kyungjin Lee[5*]

1 : Master's degree student, Department of Science in Korean Medicine, College of Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University, Republic of Korea
2 : Bachelor's degree student, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Republic of Korea
3 : Ph.D. student, Department of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Republic of Korea
4 : Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Republic of Korea
5 : Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Republic of Korea

ABSTRACT

Background : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory properties of stems and leaves of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (ES) from Gangwon-do.

Methods and Results : Stems and leaves of ES were collected from two areas in Gangwon-do: Cheorwon-gun and Samcheok-si. Samples were extracted with water by using the pressurized liquid extraction method and with 70% prethanol A by using the heat reflux extraction method.

The anti-inflammatory effects of ES were evaluated through the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), lactate dehydrogenase(LDH) assay, nitric oxide(NO) assay, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), and Western blot analysis in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS).

Results showed that ES leaf extractions were not cytotoxic at a concentration of up to 30 ㎍/㎖. The leaves of 70% prethanol A extractions of ES(30 ㎍/㎖) inhibited NO, interleukin-6(IL-6), and tumor necrosis factor-α(TNF-α) production and decreased the protein level of cyclooxygenase 2(COX-2). There was no significant change in the protein level of inducible nitric oxide synthase(iNOS). The stem extractions of ES did not exhibit anti-inflammatory effects.

*Corresponding author : Kyungjin Lee, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea.
· Tel : +82-2-961-0332 · E-mail : niceday@khu.ac.kr
#Co-First author : Junkyu Park, Department of Science in Korean Medicine, College of Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea.
· Tel : +82-2-961-0325 · E-mail : ojeoksan@khu.ac.kr
Mina Boo, Department of Science in Korean Medicine, College of Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea
· Tel : +82-2-961-9191 · E-mail : asdfk042311@naver.com
· Received : 26 May 2023 · Revised : 27 June 2023 · Accepted : 25 July 2023

Conclusions : In this study, the leaves of 70% prethanol A extractions of ES demonstrated anti-inflammatory effect on RAW 264.7 macrophages. The 70% prethanol A extractions have a relatively higher anti-inflammatory effect on RAW 264.7 macrophages than water extractions.

Key words : *Eleutherococcus senticosus,* Anti-inflammation, COX-2, Inducible nitric oxide synthase, Nitric oxide, RAW 264.7

Ⅰ. 서 론

가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim.; ES)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 시베리아 원산의 다년생 목본으로 한국, 일본, 중국, 러시아 등에서 자생하고 있다[1]. 두릅나무과의 오갈피나무속 식물들은 잎, 열매, 줄기, 뿌리 등 다양한 부위가 약용으로 사용되며, 공통적으로 유효 활성 물질인 eleutheroside B, E 등을 함유하고 있다[2,3]. 가시오갈피는 염증 억제, 면역조절, 혈당 저하, 항 스트레스 및 신경 보호 효과가 각각 보고[4-8]되어 있으며, 가시오갈피의 종자, 잎, 줄기 및 뿌리 모두에서 항산화 효과가 있다고 알려져 있다[9].

가시오갈피는 식용으로 줄기, 순, 잎, 열매 및 뿌리를 사용 가능하다. 약용으로 사용되는 刺五加는 가시오갈피의 뿌리 및 뿌리줄기를 건조한 것으로, 補腎强腰, 益氣安神, 活血通絡의 효능이 있어 腎虛體弱이나 腰膝酸軟, 脾虛乏力 등을 치료하는데 사용된다[10]. 가시오갈피가 주로 사용되고 연구되는 부위는 약용부위인 뿌리 및 뿌리줄기에 한정되어 있고, 지상부에 대한 연구와 활용은 부족한 편이다. 본 연구는 가시오갈피의 잎과 줄기에 대한 효능 연구를 통해, 가시오갈피의 비약용부위인 잎과 줄기도 의약품이나 기능성 식품으로 응용할 수 있는 가능성을 확인하고자 한다.

가시오갈피는 국내에서 1978년부터 태백산맥에서 자생하던 것을 식재하여 강원도를 중심으로 재배하였으며, 강원도에 춘천, 정선 태백, 삼척, 철원, 양구 등에서 재배되고 있다[11]. 그러나 현재 강원도의 특산물인 가시오갈피를 활용한 식 · 의약 제품 및 건강기능식품 개발은 거의 이루어지지 않고 있다. 강원도의 생리활성 우수 소재인 가시오갈피의 기능성을 확인하고 상품 개발을 위한 기초 자료를 마련하기 위하여 강원도 삼척시, 철원군의 농가에서 채취한 시료를 대상으로 연구를 진행하였다.

최근 천연물에 대한 관심도가 커짐에 따라 의약품에서 식품에 이르기까지 다양한 방면으로 연구가 이루어지고 있다. 한약재 및 천연물들을 이용한 항염증 연구 결과들이 다수 발표되었고, 다양한 천연물들을 이용한 기초 연구의 필요성이 높아지고 있다[12]. 이전에 발표된 가시오갈피의 논문에 따르면 추출물과 단일성분에 대한 항염증 효과들은 보고[13,14]되어 있지만, 강원도 가시오갈피의 지역별(철원 또는 삼척 농가), 부위별(줄기 또는 잎) 및 용매별(물 또는 70% 주정) 추출물에 대한 항염증 활성 비교에 대한 논문은 현재 보고된 바가 없기에 본 연구에서는 RAW 264.7 대식세포를 기반으로 강원도에서 자생하는 가시오갈피의 항염증 효과에 대한 기초자료를 제시하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출 방법

본 연구는 식품 원료로 사용하기 전 기초실험단계로써 항염증 실험에 대한 활성을 세포 수준에서 확인하고자 하였으며, 사용한 가시오갈피는 철원 또는 삼척 농가에서 재배한 것을 사용하였다. 주식회사 하람에서 가시오갈피의 부위를 나눈 뒤 제조 및 공정 과정을 거쳤으며, 철원과 삼척에서 재배된 가시오갈피를 각각 수집하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 가시오갈피는 2022년도 강원지역에서 재배되는 2곳(철원 또는 삼척 농가)에서 재배하여 줄기와 잎으로 나누어 건조한 후 물(정제수)과 70% 주정 추출을 시행하였으며, 물 추출은 압력(125℃에서 4시간) 추출 방법으로 수행하였고, 70% 주정 추출의 경우 환류(95℃에서 4시간) 추출 방법으로 진행하였다. 모든 추출물의 경우 325 mesh(44 μ m)에서 여과되었으며, 농축 및 분말화 과정까지 주식회사 하람 중앙연구소(충북 청주시)에서 진행한 뒤 경희대학교에 제공되어 본 실험에 사용되었다. 동결건조된 샘플은 실험 전까지 -20℃에서 냉동 보관하였다.

2. 시약 및 용액

세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)배지와 Fetal bovine serum (FBS)는 GIBCO(Grand Island, NY, USA), penicillin/streptomycin(HyClone, Logan, UT, USA)에서 구매하였고, 산화질소(NO)를 측정하기 위한 kit은 Promega(WI, USA)에서 구입하였다. A murine enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit for TNF-α와 IL-6는 R&D Systems(Minnesota, USA)에 구입하여 사용하였다. Antibodies 종류는 Cell Signaling Technology (COX-2, β-actin, Goat Anti-Rabbit IgG; Boston, USA)와 Abcam(iNOS; Cambridge, UK) 제품을 사용하였다. Lipopolysaccharide 및 그 외의 제품은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3. 세포 배양

마우스 대식세포 세포주인 RAW 264.7 대식세포는 한국세포주 은행에서 구매를 하였으며, 이를 37℃에서 5% 이산화탄소(CO_2)의 조건하에서 10% FBS, 100 U/㎖ penicillin 과 100 ㎍/㎖ streptomycin이 보충된 DMEM에서 배양하여 실험에 사용하였다.

4. 세포독성 측정

가시오갈피의 세포 생존력은 MTT와 LDH분석에 의해 측정되었다. RAW 264.7 대식세포(1×10^4 cell/well)를 37℃에서 가습된 5% CO_2에서 24시간 동안 96-well plate에 세포를 하루 동안 부착시켰으며, 이후 10, 30 및 100 ㎍/㎖ 범위의 농도를 1시간 전에 처리하고 LPS(1 ㎍/㎖)를 23시간 동안 반응시켰다. 각 웰에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 또는 Lactate dehydrogenase(LDH) 시약을 넣고, 2시간 후 각 well의 흡광도를 마이크로플레이트 리더로 570 또는 450 ㎚의 파장에서 측정되었다.

5. NO, TNF-α와 IL-6 생성량 측정

RAW 264.7 대식세포를 96-well plate에 seeding하고 1시간 동안 30 ㎍/㎖ 농도에서 전처리한 다음 LPS(1 ㎍/㎖)를 23시간 동안 반응시켰다. 이후, 상층액을 사용하여 NO는 NO kit로, TNF-α와 IL-6는 ELISA에 의해 측정되었다. 실험에 사용된 kit은 제조회사에서 제시한 방법대로 시행하였으며, 흡광도는 마이크로플레이트 리더로 520 또는 450 nm의 파장에서 측정되었다.

6. 웨스턴 블롯 분석

단백질 발현은 웨스턴 블롯을 통해 분석되었다. RAW 264.7 대식세포를 seeding하고 1시간 동안 가시오갈피(10, 30 및 100 ㎍/㎖)로 전처리한 다음, 23시간 동안 LPS(1 ㎍/㎖)로 반응하였다. 이어서, 수확된 세포를 RIPA 용해 완충액에 용해시켜 단백질을 수득하고, Bradford 단백질 정량방법을 사용하여 그 농도를 정량하였다. 동일한 양의 단백질(15 ㎍)을 8% SDS-PAGE 겔을 통해 전기영동하고 PVDF 또는 NC 막(Billerica, MA, USA)으로 단백질을 이동시킨 뒤, 1차항체(iNOS, COX-2 및 β-actin; 1:1,000)로 면역 블롯팅을 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 이후 반응된 막을 씻어내고 2차 항체(1:10,000)에서 반응시켰으며, 2차에 반응된 잔여 단백질을 세척한 후, EZ-western Lumi Femto kit(DoGen, Seoul, Korea)에 의해 측정되었다. 밴드의 이미지는 정량을 위해 Image J 1.47v 소프트웨어(National Institutes of Health)를 사용하였고, β-actin 수준으로 정규화되었다.

7. 통계처리

본 연구의 실험의 각 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 얻은 평균 ± 표준편차(mean ± standard deviation(S.D.))로 나타내었다. 모든 통계분석은 GraphPad Software Inc(version 9.0, San Diego, CA, USA)를 이용하여 일원분산분석(one-way ANOVA)과 t-검정(t-test)을 통해 통계적인 분석을 시행하였으며, 각 평균치 간의 차이는 $p < 0.05$의 수준에서 유의성을 확인하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 추출 수율

모든 추출물 샘플의 약어는 Table 1에 기재된 내용을 바탕으로 본 논문에 사용되었다. 철원의 가시오갈피 추출물인 CSW과 CS70은 각각 11.9, 8.5%, CLW과 CL70은 26.9, 29.0%의 수득률을 얻었다. 그리고 삼척의 추출물인 SSW과 SS70은 12.1, 8.9% 얻었으며, SLW과 SL70은 37.6, 33.6%의 비율로써 추출물을 얻었다. 모든 추출물에 대한 수율은 줄기보다 잎에서 더 높은 수율을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Extraction yields of various plant *E. senticosus* (ES) by water and 70% prethanol A solvents.

Area	Plant part	Solvent	Abbreviation	Yield (%)
Cheorwon-gun	Stem	Water	CSW	11.9
		70% prethanol A	CS70	8.5
	Leaf	Water	CLW	26.9
		70% prethanol A	CL70	29.0
Samcheok-si	Stem	Water	SSW	12.1
		70% prethanol A	SS70	8.9
	Leaf	Water	SLW	37.6
		70% prethanol A	SL70	33.6

2. 가시오갈피 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향

가시오갈피 추출물의 각 시료에 대한 대식세포의 세포 생존율을 확인하기 위해 MTT(Fig. 1A, B)와 LDH assay(Fig. 1C, D)로 나누어 평가하였다(Fig. 1).

먼저, MTT assay로부터 1차 세포 생존율을 확인하였으며, 물

추출물을 10, 30, 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하였을 때 모든 샘플군의 100 ㎍/㎖에서 통계적으로 유의하게 세포사를 나타내었고(Fig. 1A), 70% 주정 추출물을 처리한 Fig. 1B.에서는 100 ㎍/㎖의 철원의 줄기(CS70)와 삼척의 잎(SL70)에서만 세포사를 나타내었다.

1차에서 세포사가 나타난 군을 제외한 나머지 군에 한 해 LDH assay로 2차 세포사에 대한 검증을 시도하였으며, 공통적으로 30 ㎍/㎖ 이하의 농도 군에서는 세포사를 나타내지 않은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C, D).

본 연구는 삼척시와 철원군의 가시오갈피에서 부위별 및 추출물별 항염증 활성을 비교하는 것이기 때문에 비교가 가능한 그룹만을 선별(CS70 및 SS70 군 제외)하여 최대 농도를 30 ㎍/㎖으로 설정하여 실험을 진행하였다.

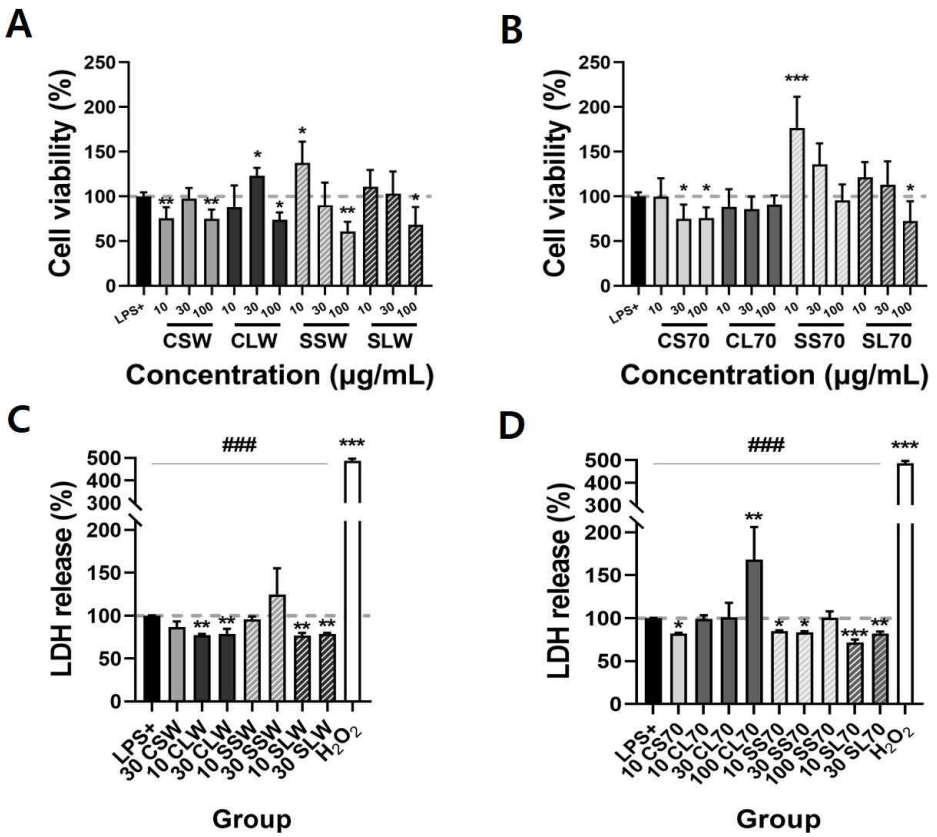

Fig. 1. Cell viability and LDH release of ES on LPS-induced RAW 264.7 cells. Murine macrophage cell line(2×10^4) was incubated for 24 h with three varying concentrations(10, 30, and 100 ㎍/㎖) of ES. Effect of A; water and B; 70% prethanol A extracts on cell viability by MTT assay(n=5). Effect of C; water and D; 70% prethanol A extracts on cell viability by LDH assay(n=3). All data represent the mean ± S.D. of experiments. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ versus LPS treated group(LPS+) and $^{\#\#\#}p < 0.001$ versus H_2O_2 group. CSW, ES stem water extract from Cheorwon-gun; CLW, ES leaf water extract from Cheorwon-gun; SSW, ES stem water extract from Samcheok-si; SLW, ES leaf water extract from Samcheok-si; CS70, ES stem 70% prethanol A extract from Cheorwon-gun; CL70, ES leaf 70% prethanol A extract from Cheorwon-gun; SS70, ES stem 70% prethanol A extract from Samcheok-si; SL70, and ES leaf 70% prethanol A extract from Samcheok-si.

3. NO 생산에 대한 가시오갈피의 영향

NO는 염증유발을 일으키는 활성산소 중 하나이며, NO의 생성에 30 ㎍/㎖의 가시오갈피 추출물이 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. RAW 264.7 대식세포에 각 추출물과 LPS(1 ㎍/㎖)를 처리하여 24시간 배양한 결과, NO의 양은 LPS 단독처리(LPS+)군이 100.0 ± 1.32%($^{\#\#\#}p < 0.001$)일 때, 70% 주정 추출물(30 CL70; 92.5 ± 1.79%, 30 SL70; 94.0 ± 1.15%, $^{**}p < 0.01$)의 효과가 물 추출물(30 CLW; 96.7 ± 1.62%, $^{*}p < 0.05$)보다 좋았으며, 물 추출물을 기준으로 확인하였을 때, 줄기(CSW와 SSW)보다 잎(CLW와 SLW)에서 NO 감소 효과가 나타나는 경향성을 확인하였다 (Fig. 2).

4. TNF-α 및 IL-6 생산에 대한 가시오갈피 추출물의 효과

Macrophage가 분비하는 TNF-α 및 IL-6과 같은 사이토카인들은 주로 면역세포의 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자이다. 이를 조절하게 되면 염증성 질환의 원인 규명과 치료에 매우 중요하기에 우리는 pro-inflammatory cytokine의 대표적인 TNF-α와 IL-6의 생성에 30 ㎍/㎖의 농도의 가시오갈피 추출물이 가지는 활성을 알아보았다(Fig. 3).

먼저, TNF-α는 LPS+ 군에서 40.7 ± 1.29 ng/㎖($^{\#\#\#}p < 0.001$)일 때, 물 추출물은 모든 군에서 통계적으로 유의하지 않으며, 70% 주정 추출물에서 효과가 유의함을 나타내었다 (30 CL70; 36.4 ± 0.62%, 30 SL70; 37.7 ± 0.35%, $^{**}p < 0.01$, Fig. 3A).

그리고, IL-6는 LPS+ 군에서 671.1 ± 12.62 pg/㎖ ($^{###}p < 0.001$)일 때, 물 추출물을 기준으로 확인하였을 때, 줄기(CSW와 SSW)보다 잎(CLW($^{**}p < 0.01$)와 SLW($^{*}p < 0.05$))에서 IL-6 감소 효과가 나타났으며, 70% 주정 추출물에서 효과가 통계적으로 가장 유의하게 감소한 것을 나타내었다(30 CL70; 618.7 ± 4.21 pg/㎖($^{***}p < 0.001$), 30 SL70; 614.0 ± 14.98 pg/㎖($^{**}p < 0.01$), Fig. 3B).

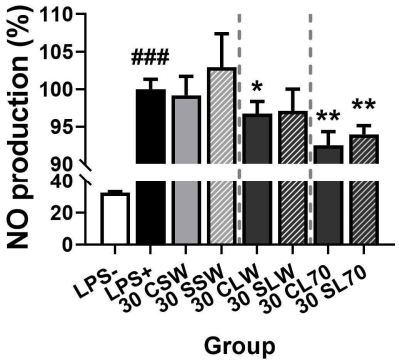

Fig. 2. Effect of ES on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. NO production was measured using the NO kit(n=3). All data represent the mean ± S.D. of experiments. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ versus LPS treated group(LPS+) and $^{###}p < 0.001$ versus non-treated group (LPS-). 30 CSW, Stem water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Cheorwon-gun; 30 SSW, Stem water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Samcheok-si; 30 CLW, Leaf water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Cheorwon-gun; 30 SLW, Leaf water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Samcheok-si; 30 CL70, Leaf 70% prethanol A extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Cheorwon-gun; 30 SL70, Leaf 70% prethanol A extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Samcheok-si.

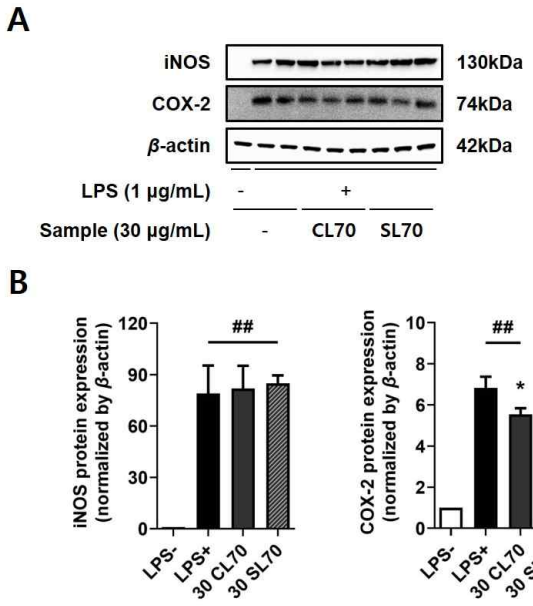

Fig. 4. Effects of ES on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. iNOS and COX-2 protein expression was measured using Western blot analysis (n=3). All data represent the mean ± S.D. of experiments. $^{*}p < 0.05$ versus LPS treated group(LPS+) and $^{#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$ versus non-treated group (LPS-). 30 CL70, Leaf 70% prethanol A extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Cheorwon-gun; 30 SL70, Leaf 70% prethanol A extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Samcheok-si.

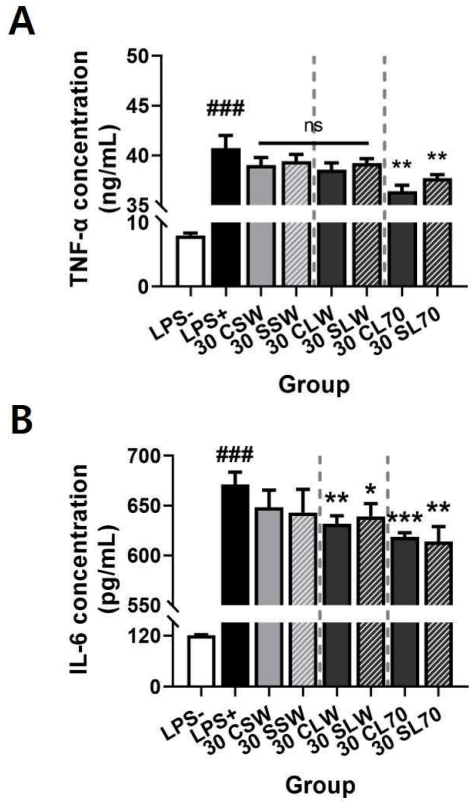

Fig. 3. Effects of ES on TNF-α and IL-6 production in LPS-induced RAW 264.7 cells. TNF-α and IL-6 production were measured using the ELISA kits (n=3). All data represent the mean ± S.D. of experiments. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ versus LPS treated group(LPS+) and $^{###}p < 0.001$ versus non-treated group(LPS-). 30 CSW, Stem water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Cheorwon-gun; 30 SSW, Stem water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Samcheok-si; 30 CLW, Leaf water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Cheorwon-gun; 30 SLW, Leaf water extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Samcheok-si; 30 CL70, Leaf 70% prethanol A extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Cheorwon-gun; 30 SL70, Leaf 70% prethanol A extract at a concentration of 30 ㎍/㎖ from Samcheok-si.

5. iNOS와 COX-2 단백질 발현에 대한 가시오갈피 추출물의 효과

염증 유발 인자인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제효과를 확인하기 위해 western blot을 통해 확인하였다. 본 연구에서 사용한 internal control은 β-actin으로써 단백질 변화에 대한 상대적인 측정치로 정규화를 시행하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

iNOS의 경우 LPS+ 군에서 79.0 ± 16.32 fold($^{##}p < 0.01$)일 때, 30 CL70과 30 SL70군에서는 통계적인 유의성이 나타나지 않았다(not significant, Fig. 4A, B). 그리고 COX-2의 경우 LPS+ 군에서 6.8 ± 0.55 fold($^{##}p < 0.01$)일 때, 30 CL70 (5.5 ± 0.31 fold, $^{*}p < 0.05$)과 30 SL70(4.1 ± 0.92 fold, $^{*}p < 0.05$)군에서 COX-2 단백질 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A, C).

Ⅳ. 고 찰

급성 염증반응에 반응하는 대식세포는 주로 병원성 미생물을 포식하는 면역세포 중 하나이며, 이는 미생물을 식균작용(phagocytosis)으로 제거하기 위해 많은 염증매개물질(inflammatory mediators)을 생성한다[15]. 염증매개물질이란 내피세포, 침윤된 염증세포 또는 면역세포 등에서 분비되어 염증반응을 매개하게 되는데, 주로 아라키돈산 대사산물(arachidonic acid metabolites), 사이토카인, 활성산소(oxygen free radicals) 및 산화질소(nitric oxide, NO) 등을 일컫는다[16,17]. 사이토카인은 일련의 면역조절 분자로 특정 사이토카인 억제제 및 가용성 사이토카인 수용체와 함께 작용하여 인간 면역 반응을 조절하며, 그 종류에는 항염증성(anti-inflammatory) 과 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)이 있다[18]. COX는 arachidonic acid를 프로스타글란딘(prostaglandin, PG)로 전환시키는 효소로써, 기능이 다른 동형(isoform)으로 2가지가 존재한다. 정상적인 생리기능을 유지하는 기능을 하는 COX-1과 pro-inflammatory cytokines, 박테리아 독소(bacterial toxin) 및 종양 촉진제(tumor promoter) 등에 의해 유도되어 통증과 염증을 발생시키는 COX-2로 나뉜다[19,20]. Pro-inflammatory cytokine은 주로 활성화된 대식세포에 의해 생성되고, tumor necrosis factor-α(TNF-α) 및 interleukin-6(IL-6)와 같은 사이토카인들의 분비로 인한 염증반응의 상향조절(upregulation)에 관여[21,22]하며, 동시에 신경 세포 전달 물질(neurotransmitter)로 바이러스를 포함한 세포 내 병원체를 제어하기 위해 감염부위에 대한 면역세포의 성장, 분화 및 활성화를 하는 역할을 한다[23,24]. 체내 염증성 변화에 있어서 산화적 스트레스(oxidative stress)는 염증반응이 일어나기 때문에 오랜 기간 방치하면 만성 염증을 유도하게 되어 빠르게 제어하는 것이 질병 예방뿐 아니라 난치성 환자들에 있어 병의 진행을 막고, 합병증 등을 예방할 수 있다[25].

염증반응이 일어나면 대식세포에서 inflammatory mediators인 NO, prostaglandin E2(PGE2) 및 cytokine 등이 생성되며 염증반응의 역할을 한다[26]. 이들과 같은 inflammatory mediators들에 의해 선천적 면역반응(innate immune response)을 유도하여 세포 및 조직에 손상을 주게 되는데 주로 DNA 손상, 단백질 변이, 신경 손상, 세포 노화 및 산화 등을 일으키게 된다[27]. 자유라디컬(free radical)의 생성을 억제하는 항산화제로는 부틸레이티드 화합물(BHA와 BHT), ascorbic acid, α-tocopherol 등이 알려져 있으나, 이들은 소량의 독성이 있다고 보고되었으며, 동시에 다량의 항산화제를 사용하면 환자에게 악영향을 미친다는 논문이 있기에 보다 안전한 천연 항산화제에 대한 기초연구를 진행해야 하는 바이다[28-32].

RAW 264.7 대식세포에 대한 가시오갈피의 항염증 효능은 이전에도 연구된 바 있으나, 각각 가시오갈피의 줄기 껍질과 뿌리의 물 추출물에 대한 평가만이 이루어졌다[33,34]. 본 실험은 기존에 연구되지 않은 부위인 가시오갈피의 줄기와 잎을 두 가지 용매(물 또는 70% 주정)로 추출하여 항염증 효능을 평가했다는 점에서 차별점이 있다.

본 실험에서는 MTT assay, LDH assay를 통해 가시오갈피 줄기, 잎의 세포 독성을 확인하였다. MTT assay는 수용성 황색 염료인 MTT를 미토콘드리아 환원 효소의 작용으로 보라색 포르마잔으로 환원시키는 원리를 이용하며, 가장 많이 사용되는 세포 생존율 분석법이다[35]. LDH assay는 손상된 세포에서 상등액으로 배출된 효소인 LDH의 활성을 측정하여 세포 생존율을 분석하는 기법으로, 죽은 세포를 측정할 수 있다[36]. MTT assay의 결과로 CSW, CLW, SSW, SLW, CS70, SL70 군은 100 ㎍/㎖ 농도에서 세포사가 나타났고, LDH assay의 결과로 CL70 군은 100 ㎍/㎖ 농도에서 세포사가 나타났다. 세포 증식이 일어난 SS70과 세포 사멸이 일어난 CS70을 제외한 나머지 군에서 MTT assay, LDH assay 모두에서 세포 독성을 보이지 않은 30 ㎍/㎖ 농도로 항염증 실험을 진행하였다.

가시오갈피가 RAW 264.7 대식세포에서 세포 독성을 나타내는 농도 범위는 부위나 추출 조건에 따라 서로 다르게 나타난다. 가시오갈피의 줄기 껍질 물 추출물의 경우, 1,000 ㎍/㎖까지 세포 독성을 나타내지 않았다고 보고되며, 뿌리 60% 에탄올 추출물은 100 ㎍/㎖까지 세포 독성을 나타내지 않았다[37-39]. 가시오갈피의 추출 조건의 차이로 인하여 같은 용매를 사용하더라도 다른 농도에서 세포 독성이 나타날 수 있다. 가시오갈피 잎 에탄올 추출물에서는 500 ㎍/㎖까지 세포 독성이 없었다는 연구 결과가 있으나, 고압 에탄올 추출물의 경우에는 100 ㎍/㎖에서 세포 독성을 나타내었다[40]. 본 연구에서 물 추출물은 압력 추출하였고, 70% 주정 추출물은 환류 추출하였다. 물 추출물의 경우 압력 추출로 인해 기존의 연구들보다 낮은 농도인 100 ㎍/㎖에서 세포 독성을 나타냈을 수 있다.

가시오갈피 잎 주정 추출물(CL70, SL70)과 잎 물 추출물(CLW)은 30 ㎍/㎖ 농도에서 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 대식세포로부터의 산화 질소 생성을 유의하게 억제하였다. LPS로 염증이 유발될 시, RAW 264.7 대식세포의 산화질소 생성량은 급격하게 증가하는 것으로 알려져 있다. 산화질소는 대식세포 내의 iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의해 생성되며, iNOS는 외부 병원체에 대항하여 생체 방어를 위해 산화질소를 세포외로 방출시킨다. 세포 외 산화질소 방출량과 세포 내 iNOS 발현량의 증가는 선천면역계의 중요한 전염증성 면역 작용이다. 그러나 적당한 수준의 산화질소는 바이러스를 죽이고 병원성 미생물에 대항하는 보호 작용을 하지만, 과도한 산화질소는 오히려 급성 또는 만성의 염증과 조직의 손상을 유발하는 병리적 작용을 한다[41]. LPS의 내독소 작용으로 인해 RAW 264.7 대식세포로부터 방출되는 산화질소의 증가는 과도한 염증 작용을 유발하게 된다. CL70, SL70, CLW 군이 산화질소 생성을 억제한 실험 결과는 가시오갈피 추출물에 항염증 효과가 있음을 시사한다.

가시오갈피 잎 주정 추출물(CL70, SL70)은 TNF-α의 세포외 방출량을 유의하게 감소시켰고, 가시오갈피 잎 추출물(CLW, SLW, CL70, SL70)은 IL-6의 세포외 방출량을 유의하게 감소시켰다. TNF-α는 급성기 반응(acute-phase response; APR) 상황의 대식세포에서 주로 생성되며, 혈관 이완, 부종 유발, 백혈구의 접착 촉진, 면역세포의 조절, 종양의 괴사를 유도하는 물질이다. 또한 TNF-α 염증성 질환의 발병 기전에 가장 중요한 역할을 하는 인자 중 하나로 알려져 있어 그 조절에 문제가 생길 시 다양한 질병을 유발하게 된다. IL-6 역시 조직의 손상이나 감염에 반응하는 숙주 면역 반응을

통해 급성기 반응 상황의 대식세포에서 주로 생성된다. 감염 상황에서 IL-6는 염증 반응을 보다 촉진시키며 면역세포의 항체 생산을 자극하고, T cell 분화를 유도하는 작용을 한다. 그러나 IL-6의 생성이 조절되지 못하고 과잉된다면 염증성 질환, 만성질환이나 자가면역질환을 유발할 수 있다. IL-6와 TNF-α의 세포외 방출량 억제를 통해 가시오갈피 잎 추출물의 염증 억제제로서의 가능성을 확인하였다.

염증을 유발하는 iNOS, COX-2 단백질의 RAW 264.7 대식세포 내 발현량을 western blot을 통해 측정하였다. iNOS 발현량은 LPS로 자극한 군에서 모두 증가하였으나, 가시오갈피 추출물로 인한 감소 효과는 확인되지 않았다. 가시오갈피를 처리한 군에서 세포 외로 배출된 산화질소의 양이 감소한 것과 달리 세포 내 iNOS 단백질 수준에서는 유의한 차이가 없었다. COX-2는 정상 생리상태일 때 COX-1에 비해 상대적으로 적은 양만 발현되다가, LPS와 같은 전염증성 자극에 의해 그 발현량이 크게 증가한다. COX-2의 발현은 염증매개물질인 prostaglandin(PG)의 일종인 PGE2의 생성을 유도하며, PGE2는 대식세포로부터 생산되어 혈관 확장, 부종, 통증, 발열을 유발한다[42]. 세포 내 COX-2 단백질 발현량 감소를 통해 가시오갈피 잎 에탄올 추출물 또한 천연물 기반 COX-2 억제제로 작용할 수 있음을 실험을 통해 확인하였다.

가시오갈피의 염증 마커에 대한 억제 효과는 줄기 추출물보다 잎 추출물에서 더 뛰어났다. 잎 추출물은 30 ㎍/㎖ 농도에서 세포내 COX-2 생성량, 세포외 산화질소와 염증성 사이토카인 TNF-α와 IL-6의 방출량을 모두 감소시켰다. 줄기 추출물의 경우, 같은 농도에서 유의한 항염 효과를 확인할 수 없었다. 특히 잎 주정 추출물(CL70, SL70)은 잎 물 추출물(CLW, SLW)에 비하여 산화질소 생성량을 감소시키고 TNF-α 방출량 줄이는 효과가 더 컸다. 가시오갈피의 항염 효과를 지역(철원 또는 삼척 농가)에 따라 비교하였을 때, 산화질소 생성량, 전염증성 사이토카인 방출량, iNOS 및 COX-2 단백질 생성량에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ($p>0.05$).

Ⅴ. 결 론

본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에 철원군, 삼척시에서 수집한 가시오갈피 줄기, 잎 추출물을 처리하여 항염증 효능을 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 가시오갈피 추출물을 30 ㎍/㎖ 이하 농도로 처리하였을 때, SS70, CS70을 제외한 모든 군에서 공통적으로 세포독성이 없었다.

2. 가시오갈피 추출물을 30 ㎍/㎖ 농도으로 처리하였을 때, CLW, CL70, SL70 군에서 산화질소 생성량이 유의성 있게 감소하였다.

3. 가시오갈피 추출물을 30 ㎍/㎖ 농도으로 처리하였을 때, CL70, SL70군에서 TNF-α의 세포외 방출량이 유의성 있게 감소하였고, CLW, SLW, CL70, SL70 군에서 IL-6의 세포외 방출량이 유의성 있게 감소하였다.

4. 가시오갈피 추출물을 30 ㎍/㎖ 농도으로 처리하였을 때, CL70, SL70군에서 COX-2 단백질의 세포내 발현량이 유의성 있게 감소하였다.

이러한 실험 결과들을 통해 강원도 가시오갈피 잎 추출물은 항염증 효과가 있음을 확인하였고, 추출 용매는 물보다 주정을 이용하는 것이 효과적이었으며, 철원과 삼척의 지역에 따른 항염증 효능 차이는 없었음을 확인하였다.

감사의 글

본 성과물(논문)은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01704503)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice. Journal of Ethnopharmacology. 2004;95:447-453. doi: 10.1016/j.jep.2004.08.027
2. Shrestha SK., Song J, Lee SH, Lee D, Kim H, Soh Y. *Eleutherococcus sessiliflorus* induces differentiation of prechondrogenic ATDC5 Cells. The Korea Journal of Herbology. 2022;37(1): 51-59. doi: 10.6116/kjh.2022.037.1.51.
3. Song MK, Kim MY, Kim HC. Standardization of Eleutherococcus species and HPLC Method Validation for Quantitative Analysis. The Korea Journal of Herbology. 2011;26(1):103-110. doi:10.6116/kjh.2011.26.1.103
4. Jung CH, Jung H, Shin YC, Park JH, Jun CY, Kim HM, Ko SG. *Eleutherococcus senticosus* extract attenuates LPS-induced iNOS expression through the inhibition of Akt and JNK pathways in murine macrophage. Journal of Ethnopharmacology. 2007;113:183-187. doi: 10.1016/j.jep.2007.05.023
5. Kwon HO, Lee M, Kim YJ, Kim E, Kim OK. Beneficial Effects of *Acanthopanax senticosus* Extract in Type II Diabetes Animal Model via Down-Regulation of Advanced Glycated Hemoglobin and Glycosylation End Products. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. The Korean Society of

Food Science and Nutrition. 2016;45:929-937. doi: 10.3746/jkfn.2016.45.7.929
6. Lee D, Park J, Yoon J, Kim MY, Choi HY, Kim H. Neuroprotective effects of *Eleutherococcus senticosus* bark on transient global cerebral ischemia in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2012;139:6-11. doi: 10.1016/j.jep.2011.05.024
7. Lim SH, Park YH, Kwon CJ, Ham HJ, Jeong HN, Kim KH, Ahn YS. Anti-diabetic and Hypoglycemic Effect of Eleutherococcus spp.. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. The Korean Society of Food Science and Nutrition. 2010;29: 1761-1768. doi : 10.3746/jkfn.2010.39.12.1761
8. Zhang N, Van Crombruggen K, Holtappels G, Bachert C. A herbal composition of *Scutellaria baicalensis* and *Eleutherococcus senticosus* shows potent anti-inflammatory effects in an ex vivo human mucosal tissue model. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2012:673145. doi: 10.1155/2012/673145
9. Heo SJ, Ahn HY, Kang MJ, Lee JH, Cha JY, Cho YS. Antioxidative Activity and Chemical Characteristics of Leaves, Roots, Stems and Fruits Extracts from *Acanthopanax senticosus*. Journal of Life Science. 2011;21:1052-1059. doi: 10.5352/JLS.2011.21.7.1052
10. Professors of Herbology in Korea. Herbology. Seoul. Younglim Press. 2020:723.
11. Han JS, *Eleutherococcus senticosus* cultivation technology. 2002 July 26 [cited 2023 May 15]; Available form : URL : https://www.ares.gangwon.kr/gwares/know_how/research/cultivation?articleSeq=32533
12. Yoon KR, Kim YJ, Lee E, Lee JM. Anti-inflammatory Effect of Coptidis Rhizoma. The Korea Journal of Herbology. 2009;24(3):79-86. doi: 10.6116/KJH.2009.24.3.079
13. Kim MJ, Wang HS, Lee MW. Anti-Inflammatory Effects of Fermented Bark of *Acanthopanax sessiliflorus* and Its Isolated Compounds on Lipopolysaccharide-Treated RAW 264.7 Macrophage Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2020:6749425. doi: 10.1155/2020/6749425
14. Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. Improvement of Anticancer Activation of Ultrasonificated Extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, Ephedra sinica Stapf, Rubus coreanus Miq. and Artemisia capillaris Thunb. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2004;12:273-278.
15. Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. EMBO Molecular Medicine. 2013;5:661-674.
16. Drenjančević I, Jukić I, Mihaljević Z, Matić A and Kibel A. The Metabolites of Arachidonic Acid in Microvascular Function. Microcirculation Revisited - From Molecules to Clinical Practice. IntechOpen. 2016.
17. Xu M, Wang X, Li Y, Geng X, Jia X, Zhang L, Yang H. Arachidonic Acid Metabolism Controls Macrophage Alternative Activation Through Regulating Oxidative Phosphorylation in PPARγ Dependent Manner. Frontiers in Immunology. 2021;12:618501. doi: 10.3389/fimmu.2021.618501
18. Seymour RM, Henderson B. Pro-inflammatory-anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. Mathematical Medicine and Biology: A Journal of the IMA. 2001;18:159-192. doi: 10.1093/imammb/18.2.159
19. Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tsichlis PN. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. The EMBO Journal. 2002;21:4831-40. doi: 10.1093/emboj/cdf478
20. Williams JA, Shacter E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. Journal of Biological Chemistry. 1997;272:25693-9. doi: 10.1074/jbc.272.41.25693
21. Liu X, Yin S, Chen Y, Wu Y, Zheng W, Dong H, Bai Y, Qin Y, Li J, Feng S, Zhao P. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF-κB, STAT3 or AP-1 activation. Molecular Medicine Reports. 2018; 17:5484-5491. doi: 10.3892/mmr.2018.8542
22. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A, Margioris AN. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015;335:1254-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.197
23. Filgueira L, Larionov A, Lannes N. The Influence of Virus Infection on Microglia and Accelerated Brain Aging. Cells. 2021;10:1836. doi: 10.3390/cells10071836
24. Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, Cho JH, Kuk YI, Hyun KH, Cho HW. Inhibitory Effect of *Alopecurus aequalis* Sobol Ethanol Extracts on LPS-induced Inflammatory Response in RAW 264.7 Cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2014;22:98-104. doi:

10.7783/KJMCS.2014.22.2.98
25. Kirkham P. Oxidative stress and macrophage function: a failure to resolve the inflammatory response. Biochem Soc Trans. 2007;35:284-7. doi: 10.1042/BST0350284
26. Debprasad C, Hemanta M, Paromita B, Durbadal O, Kumar KA, Shanta D, Kumar HP, Tapan C, Ashoke S, Sekhar C. Inhibition of NO2, PGE2, TNF-α, and iNOS Expression by *Shorea robusta* L.: An Ethnomedicine Used for Anti-Inflammatory and Analgesic Activity. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012;254849. doi: 10.1155/2012/254849
27. Nastasi C, Mannarino L, D'Incalci M. DNA Damage Response and Immune Defense. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21:7504. doi: 10.3390/ijms21207504.
28. Abdullah M, Jamil RT, Attia FN. Vitamin C (Ascorbic Acid). 2022 [cited 2023 May 15]; Available form : URL : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499877/
29. Jayalakshmi CP, Sharma JD. Effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on rat erythrocytes. Environ Res. 1986; 41:235-8. doi: 10.1016/S0013-9351(86)80185-2
30. Maliakel DM, Kagiya TV, Nair CK. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and alpha-tocopherol. Exp Toxicol Pathol. 2008;60:521-7. doi: 10.1016/j.etp.2008.04.015
31. Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. Food and Chemical Toxicology. 1999; 37:1027-38. doi: 10.1016/s0278-6915(99)00085-x
32. Yoo NH, Kim HK, Lee CO, Park JH, Kim MJ. Comparison of Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities of Methanolic Extracts Obtained from Different Parts of *Cotoneaster wilsonii* Nakai. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2019;27: 194-201. doi: 10.7783/KJMCS.2019.27.3.194
33. Lin QY, Jin LJ, Cao ZH, Xu YP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by *Acanthopanax senticosus* extract in RAW264.7 macrophages. J Ethnopharmacology. 2008;118(2):231-236. doi: 10.1016/j.jep.2008.04.003
34. Yoon TK, Jo SY. Effect of *Acanthopanax senticosus* Extracts on Alcohol Degradation and Anti-Inflammatory Activity in Mice. The Korean Journal of Food And Nutrition. 2010; 23(4), 542-548.
35. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harbor protocols. 2018(6):10. doi: 10.1101/pdb.prot095505
36. Kabakov AE, Gabai VL. Cell Death and Survival Assays. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2018;1709:107-127. doi: 10.1007/978-1-4939-7477-1_9
37. Lin QY, Jin LJ, Cao ZH, Xu YP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by *Acanthopanax senticosus* extract in RAW264.7 macrophages. J Ethnopharmacology. 2008;118(2):231-236.
38. Lin QY, Jin LJ, Ma YS, Shi M, Xu YP. *Acanthopanax senticosus* inhibits nitric oxide production in murine macrophages in vitro and in vivo. Phytotherapy research. 2007;21(9):879-883. doi: 10.1002/ptr.2171
39. Liu S, Chen Y, Gu L, Li Y, Wang B, Hao J, Kitanaka S, Li H. Purification of eleutherosides by macroporous resin and the active fractions of anti-inflammatory and antioxidant activity from *Acanthopanax senticosus* extract. Analytical Methods. 2013;5(15):3732-40. doi: 10.1039/C3AY40164B
40. Lee SH, Oh HY, Leem JY, Yoon S. Antioxidant and NO-scavenging Activities of *Acanthopanax senticosus* var. subinermis Leaf Extracts Prepared Using Ethanol and Extrusion Processing. Food Science and Biotechnology. 2009;18.5:1124-1131.
41. Stern AM, Zhu J. An introduction to nitric oxide sensing and response in bacteria. Advances in applied microbiology. 2014;87:187-220. doi: 10.1016/B978-0-12-800261-2.00005-0
42. Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tsichlis PN. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. The EMBO Journal. 2002;21:4831-40. doi: 10.1093/emboj/cdf478