

## 인삼에 함유된 페놀성 성분의 신경세포보호 및 항염증 효과

공연희 · 이영철 · 최상윤\*

한국식품연구원

(2009년 4월 24일 접수; 2009년 6월 16일 수정; 2009년 6월 16일 수리)

### Neuroprotective and Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds in *Panax ginseng* C.A. Meyer

Yeon Hee Kong, Young Chul Lee and Sang Yoon Choi\*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

(Received April 24, 2009; Revised June 16, 2009; Accepted June 16, 2009)

**Abstract :** The six phenolic-compound (ascorbic acid, maltol, esculetin, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, and quercetin) contents of *Panax ginseng* C.A. Meyer were determined in this study. The results showed that the ascorbic acid, cinnamic acid, and esculetin contents of *Panax ginseng* C.A. Meyer are higher than those of the other ingredients. Among these compounds, ascorbic acid and cinnamic acid significantly inhibited LPS-induced nitric oxide production in the RAW 264.7 cells. Cinnamic acid also effectively inhibited the oxidative damages in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Although this study examined the neuroprotective and anti-inflammatory activities using only one kind of cells, its results suggest that cinnamic acid potently contributes to the neuroprotective and anti-inflammatory properties of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

**Key words :** ginseng, phenolic compound, nitric oxide, antioxidant

## 서 론

인삼의 약효는 사포닌을 중심으로 많은 연구들이 이루어졌고, 중추신경계, 각종 스트레스, 항당뇨 작용, 심혈관계 장애 개선 작용 등에 관한 약리작용이 밝혀졌다.<sup>1-4)</sup> 또한, 사포닌 이외에도 인삼의 비사포닌계 성분인 polyacetylene 성분들이 암세포 증식을 억제하는 것이 밝혀지면서 사포닌 이외 유효 성분의 생리활성에 대한 연구가 이루어지게 되었다.<sup>5)</sup> 인삼의 비사포닌계 성분으로는 항당뇨 효과와 혈압강하 효과와 관련 있는 유리 아미노산, 항산화 효과가 뛰어난 phenolic compounds 등이 있다.<sup>6-9)</sup> 인삼의 페놀성 성분은 salicylic acid, vanillic acid, ascorbic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, gentisic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, maltol, cinnamic acid, protocatechuic acid, syringic acid, esculetin, quercetin 등이 존재하는 것으로 보고되어 있으며 이들은 다양한 생리활성을 나타내는데 ferulic acid는 정상세

포에는 무독한 반면 암세포에는 강한 독성을 보이는 것으로 보고되어 있어 인삼의 항암 효과에 대한 원인 물질로 간주되며,<sup>10)</sup> maltol은 강한 활성산소 소거작용을 가지는 것으로 보고되어 있다.<sup>11)</sup> 활성산소는 슈퍼옥사이드 라디칼 (super-oxide radical,  $\cdot O_2$ ), 하이드록시 라디칼 (hydroxyl radical,  $\cdot OH$ ), 과산화수소 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ), 일중항산소 (singlet oxygen,  $^1O_2$ )와 같은 산소화합물을 총칭하는 것으로, 정상적인 대사과정에서 생산되고 유용한 기능을 수행하지만, 허혈이나 외상에 의한 조직손상 등으로 인해 과다하게 생성된 활성산소는 세포내 핵산의 DNA 염기서열에 문제를 일으킨다.<sup>12)</sup> 활성산소는 다양한 질병과 연관이 있는데, 특히 금속 이온이 풍부한 뇌와 같은 신경조직에서의 신경퇴행질환, 심장혈관질환, 만성감염질환, 암 발생의 중요한 요인이다.<sup>13)</sup> 또한 무기 저분자 라디칼인 nitric oxide (NO)는 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 여러 세포에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 (IL-1)과 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )등의 자극에 의해 NO가 필요이상으로 생성

\*Corresponding author. E-mail: sychoi@kfri.re.kr  
Phone: 031-780-9307, Fax: 031-709-9876

되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.<sup>14-17</sup> 본 연구에서는 인삼 및 인삼에 함유되어 있는 페놀성 성분의 SH-SY5Y 신경모세포종에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 손상에 대한 신경세포보호활성 및 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에서의 NO 저해도 측정을 통하여 인삼 페놀성 성분의 항염증 효과를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험시료

본 연구에 사용된 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 2008 년에 농협에서 제조된 백삼을 구입하여 사용하였고, 표준물질인 esculetin, *p*-coumaric acid, quercetin, maltol, cinnamic acid, ascorbic acid는 Sigma-Aldrich Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 유효성분 추출

인삼을 마쇄한 후 80% 에탄올을 사용하여 상온에서 교반기로 2시간씩 총 3회 교반하여 추출한 후 얻어진 상등액을 감압 농축하여 추출물을 제조하였다.

### 3. 페놀성 성분 정량

페놀성 성분의 정량은 HPLC system (Jasco Co. Japan)를 사용하여 분석하였다. *p*-Coumaric acid, maltol, cinnamic acid, quercetin, esculetin의 5종은 bondapak C18 column (4 µm, 300×3.9 mm)을 사용하여 이동상은 2% acetic acid가 함유된 증류수 (용매 A)와 0.5% acetic acid가 함유된 50% acetonitrile (용매 B)를 gradient를 주어 용출하였다. 용출속도는 0.8 mL/min, column의 온도는 40°C로 유지 하였으며 시료의 검출은 280 nm에서 측정하였다. Ascorbic acid는 bondapak C18 (4 µm, 300×3.9 mm) column을 사용하여 용매는 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 함유된 증류수를 phosphoric acid로 pH 2.8로 맞추어 사용하였고 용출속도는 0.4 mL/min로, column의 온도는 40°C로 유지 하였으며 시료의 검출은 254 nm에서 측정하였다. 또한 분석용 시료는 농축된 추출물을 10 mg/mL로 메탄올에 녹인 후 0.45 µm syringe filter (Millipore)로 여과하여 사용하였다.

### 4. 세포배양

Human neuroblastoma인 SH-SY5Y 세포와 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Gibco)와 1%

antibiotic-antimycotic (Gibco)가 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 5. 신경세포 보호활성 측정

SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> 개 접종시키고 48 시간 후 배지를 제거하고 PBS 로 세척한 다음 시험시료 및 2.3 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 serum free media와 함께 처리하였다. 이를 24시간 배양한 후 세포생존율을 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 독성에 대한 방어효과를 검정하였다.

### 6. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay법을 이용하여 측정하였다. 세포 배양 후 10 methylthiazol-2.5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 4시간 동안 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 7. NO 생성 저해활성 측정

96 well plate에 well 당 3×10<sup>5</sup> 개의 RAW 264.7 세포를 접종한 후 24시간 동안 배양하고 배지제거 후 PBS로 세척한 다음 2 µg/mL의 LPS와 시험시료가 포함된 배지를 첨가하고 다시 24시간 동안 배양하였다. RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포배양 상등액 100 µL와 Griess시약 (0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine · 2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O) 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.<sup>18)</sup>

### 8. 통계방법

각 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며 유의성 검정은 Student's *t*-test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 페놀성 화합물의 함량

인삼에 함유된 phenolic 성분 (*p*-coumaric acid, maltol, cinnamic acid, quercetin, esculetin, ascorbic acid) 함량을 HPLC를 이용하여 정량한 결과는 Table 1과 같다. 표준물질인 ascorbic acid와 maltol, esculetin, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, quercetin을 메탄올에 녹여 재료 및 방법에 제시된 조건으로 용출시켰을 때 각각 8.9분과 16.2, 28.8, 31.5, 53.4, 67.2분에서 검출되었다. 인삼시료 분석결과는 ascorbic acid가

**Table 1.** Contents of phenolic ingredients in ginseng.

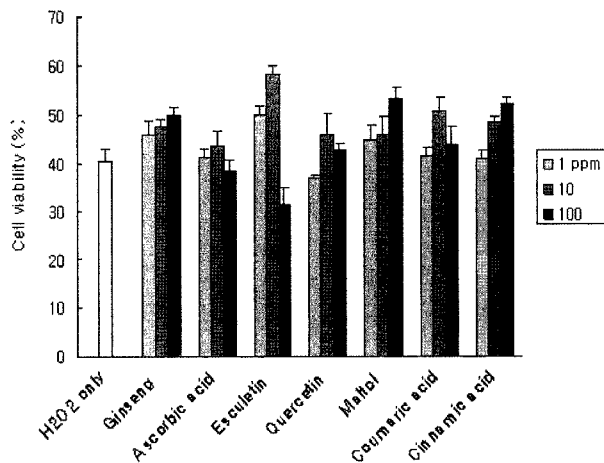
Phenolic ingredients	Contents (%)
Ascorbic acid	0.0104
Esculetin	0.0014
Quercetin	0.0006
Maltol	0.0001
<i>p</i> -Coumaric acid	0.0005
Cinnamic acid	0.0013

Data present % in white ginseng. The contents of phenolic ingredients were determined by HPLC analysis as described in materials and methods.

0.0104%로 가장 많이 함유되어 있었고, 다음으로 esculetin이 0.0014%, cinnamic acid가 0.0013% 함유되어 있었다.

**2. SH-SY5Y 세포에서 산화적 손상에 대한 방어효과**

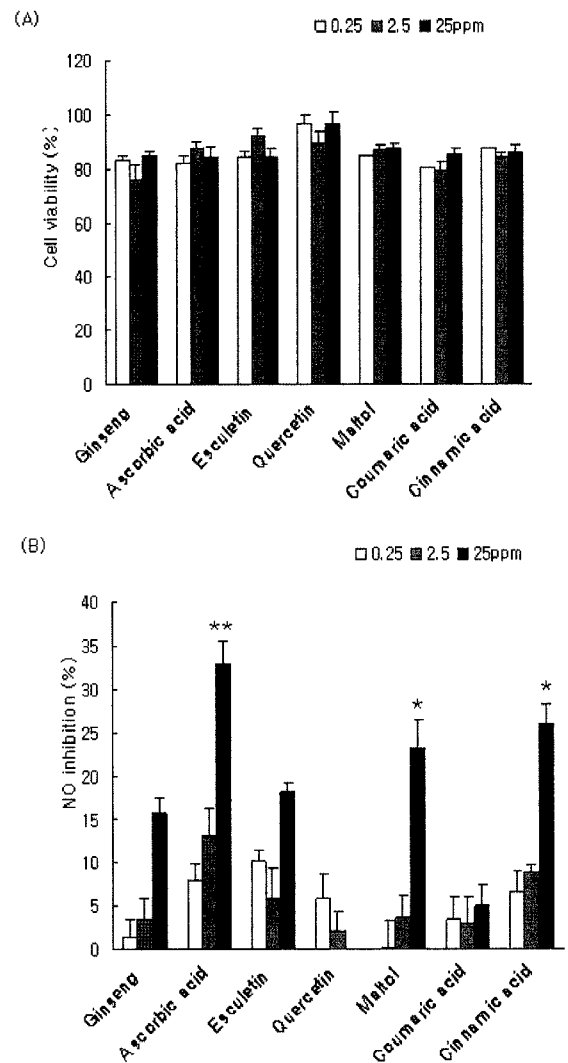
과도한 활성산소의 생성은 신경세포의 손상을 일으켜 치매, 파킨슨병 등 신경퇴행질환의 원인이 된다고 알려져 있다. 먼저 인삼추출물 및 인삼에 함유된 phenolic 성분이 100 ppm 이하에서 세포 생존율에 미치는 영향이 없음을 확인한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 인한 세포사멸에 대한 보호효과를 측정된 결과 인삼 추출물 및 cinnamic acid와 maltol이 농도의존적인 보호효과를 나타내었다 (Fig. 1). 또한 esculetin은 100 ppm에서 세포독성을 나타내었으며 다른 성분들은 신경세포보호효과를 나타내지 않았다. 따라서 인삼의 신경세포보호효과에는 cinnamic acid와 maltol 성분이 일정부분 기여하는 것으로 판단되며 특히 성분함량이 높은 cinnamic acid의 역할이 클 것으로 추측된다.



**Fig. 1.** Neuroprotective effects of ginseng extract and phenolic ingredients against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with 2.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and test samples for 24 hr. Cell viability of vehicle group was set to 100%.

**2. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성 억제 효과**

NO는 혈관 확장에 관여하는 neurotransmitter로서의 역할 이외에도, 염증상태에서 분비되어 세균을 제거하기 위한 독성물질 역할을 수행하거나, 암세포를 사멸시키기 위한 apoptosis 유도 작용을 나타내지만 이와 같은 이로운 작용 이외에도 과량의 NO는 정상세포를 죽이고 염증을 유도하여 급성 또는 만성 염증질환의 원인이 되는 물질로 작용하기도 한다.<sup>12)</sup> 따라서, 효과적인 NO 분비 조절은 염증질환의 제어를 위한 적절한 치료방법으로 인식되고 있다. 인삼과 인삼에 함유된 phenolic 성분이 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 nitric oxide 과생성에 미치는 효과를 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 측정 결과 인삼 추출물이



**Fig. 2.** Effects of ginseng extract and phenolic ingredients on the LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. (A) Cell viabilities after treatment with samples for 24 hr. (B) NO inhibitory activities of samples in the present of 2 μg/ml LPS after 24 hr.

큰 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 분비를 억제하였고, 인삼의 phenolic 성분 중 ascorbic acid, cinnamic acid, maltol, esculetin이 25 ppm 에서 각각 32.9%, 26%, 23.3% 18.1% 의 NO 생성을 억제하였다. 앞서의 함량 정량에 따르면 ascorbic acid, cinnamic acid, esculetin의 함량이 높았고 따라서 저해활성 및 함량이 높은 ascorbic acid와 cinnamic acid가 인삼의 LPS에 의해 활성화된 NO의 생성억제활성에 큰 역할을 하는 것으로 판단된다.

## 요 약

백삼 및 백삼에 함유된 페놀성 성분 6 종의 산화적 손상에 대한 신경세포보호효과와 LPS로 유도된 대식세포에서의 NO 생성억제효과를 검정한 결과 백삼 추출물은 두가지 모두에서 농도 의존적인 효과를 나타내었다. 백삼에 함유된 페놀성 성분 중에는 cinnamic acid 및 maltol이 우수한 신경세포보호활성을 나타내었고 NO 생성억제효과는 ascorbic acid 및 cinnamic acid가 높았다. 또한 페놀성성분의 백삼내 함량을 정량한 결과 ascorbic acid, cinnamic acid, esculetin가 다른 성분들에 비하여 비교적 많이 함유되어 있었으며 이를 종합하여 볼 때 백삼의 신경보호효과 및 항염증효과에는 높은 함량 및 우수한 활성을 보이는 성분인 cinnamic acid가 크게 기여하는 것으로 판단된다.

## 감사의 말씀

본 연구논문은 농림수산식품부 농림기술개발사업 및 보건복지가족부 보건의료기술연구개발사업 (A081099)의 지원에 의한 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Benishin CG, Lee R, Wang LC, Liu HJ. Effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on central cholinergic metabolism. *Pharmacology* 42: 223-229 (1991)
- Kim ND, Han BH, Lee EB, Kang JY. Studies on ginseng on antistress effects. *Kor. J. Pharmacog.* 10: 61-67 (1979)
- Elma ZT, Ilian EZ, Christina IH. Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on insulin binding in mice liver and brain membrane. *Phytotherapy Res.* 5: 46-48 (1991)
- Kang SY, Kim SH, Schini VB, Kim ND. Dietary ginsenosides endothelium dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. *Gen. Pharmacol.* 26: 483-487 (1995)
- Hwang WI, Oh SK. Effects of petroleum extract of ginseng root on some enzyme activity in human colon cancer cell. *Korean J. Ginseng Res. (Formerly Kor. J. Ginseng Sci.)* 10: 27-35 (1996)
- Park CW. The Studies of pharmacology of ginseng. *Biochemistry News* 4: 37-56 (1984)
- Jin HK, Kim SH, Lee JK. Studies of the physiological activity of Korean ginseng. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 10: 101-108 (1982)
- Choi C, Yoon SH, Bae MJ, An BJ. Protein and amino acid composition of Korean ginseng classified by years. *Korean J. Food Sci.* 17: 1-4 (1985)
- Kwak YS, Park JD, Yang JW. Present and prospect of red ginseng efficiency research. *Food Industry and Nutrition* 8: 30-37 (2003)
- Yang HS. In vitro evaluation of the cytotoxicity of gallic acid and vitamin A. *Kor. J. Oral Anatomy* 27: 83-92 (2003)
- Shin JG, Park JW, Pyo JK, Kim MS, Chung MH. Protective effects of a ginseng component, maltol (2-methyl-3-hydroxy-4-pyron) against tissue damages induced by oxygen radicals. *J. Ginseng Res. (Formerly Kor. J. Ginseng Sci.)* 14: 187-190 (1990)
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-1623 (1992)
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease. *Lancet* 344: 721-724 (1994)
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS.* 17: 399-402 (1992)
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064 (1992)
- Stuehr D, Cho HJ, Kwon NS, Weise M, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase an FAD and FMN containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA.* 88: 7773-7777 (1991)
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749-754 (1993)
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138 (1982)