

## 개다래 초임계 박추출물이 염증 및 동맥경화에 미치는 영향

유미희<sup>1</sup> · 채인경<sup>1</sup> · 최준혁<sup>2</sup> · 임효권<sup>1,3</sup> · 최희돈<sup>2</sup> · 양선아<sup>4</sup> · 이진호<sup>4,5</sup> · 이인선<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학 전공, <sup>2</sup>한국식품연구원, <sup>3</sup>대구테크노파크 바이오산업지원센터,  
<sup>4</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR)센터, <sup>5</sup>계명대학교 화학 전공

### Effects of Supercritical Fluid Marc Extracts from *Actinidia polygama* Max. on Inflammation and Atherosclerosis

Mi Hee Yu<sup>1</sup>, In Gyeong Chae<sup>1</sup>, Jun Hyeok Choi<sup>2</sup>, Hyo Gwon Im<sup>1,3</sup>, Hee Don Choi<sup>2</sup>,  
Seun Ah Yang<sup>4</sup>, Jin Ho Lee<sup>4,5</sup>, and In-Seon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Keimyung University

<sup>2</sup>Korea Food Research Institute

<sup>3</sup>Daegu Technopark Bio Industry Center

<sup>4</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

<sup>5</sup>Department of Chemistry, Keimyung University

**Abstract** The fruit of *Actinidia polygama*, Mock-chun-ryo in Korea, has been used as traditional medicine for abdominal pain, rheumatic arthritis, and stroke. In a previous study, the ethanol extract of *A. polygama* Max. showed anti-inflammatory activity in RAW 264.7 cells. In this study, we investigated the anti-inflammatory and anti-atherosclerosis effects of supercritical fluid marc extracts from *A. polygama* Max. Anti-inflammatory extracts were produced from supercritical fluid extraction of the silver vine under the following conditions; pressure, 1,500-4,500 psi, temperature 35-55°C and extraction time 1-2 hr. To evaluate the anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effects of the extracts, we studied nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) levels in RAW 264.7 cells and MMP-9 activity in human aortic smooth muscle cells (HASMC). The Marc 11 extract inhibited the production of NO, PGE<sub>2</sub>, and TNF-α by lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. Moreover, the marc 11 extract inhibited TNF-α-induced MMP-9 activity in HASMC. These results indicate that the Marc 11 extract of *A. polygama* Max. has the potential for use as an anti-atherosclerosis agent.

**Key words:** *Actinidia polygama* Max., supercritical fluid extraction (SFE), marc extract, anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effect

## 서 론

최근 여러 연구에 의하면 동맥경화증의 시작과 진행 및 심혈관 질환으로의 진행에 염증반응의 중요성이 대두되고 있으며, 특히 내피세포의 손상과 단핵구, 대식세포와 같은 염증세포의 활성화가 동맥경화증의 진행 및 죽상판의 취약성에 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다(1,2).

동맥경화를 일으키는 중요한 위험 인자로는 고혈압, 고지혈증, 흡연 등을 들 수 있으며, 이 외에도 과식, 스트레스 등이 위험인자로 작용한다고 알려져 있다(3). 최근에는 혈관 평활근 세포의 유주와 증식이 새로운 혈관 내막증 및 동맥경화의 형성과 진행에 중요한 과정으로 인식되고 있다(1). 동맥경화의 초기병변은 혈

관벽에 유입된 monocyte가 macrophage로 분화하고 더 나아가 지질을 탐식하여 foam cell이 되면서 이들이 축적되어 혈관벽에 fatty streak를 형성하게 된다. 활성화된 T cell 및 foam cell은 cytokines 및 growth factor를 비롯한 여러 염증성 매개물질들을 발현시켜 염증반응을 지속시키며 smooth muscle cell의 증식을 유도하여 혈관내벽이 두꺼워짐으로써 혈관이 좁아져 협심증과 같은 심장질환의 원인이 된다(4). Atherosclerotic plaque의 형성에는 macrophage와 T cell이 전반적으로 관여하고 있으며 이들에 의해 발현되는 adhesion molecules, proinflammatory cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases(MMPs) 등이 염증반응과 유주를 증가시켜 동맥경화반의 형성 및 파열에 직접적인 영향을 미친다(5). 특히 MMPs는 동맥경화에 관련된 사이토카인인 tumor necrosis factor(TNF-α), interleukin(IL)-1α, IL-1β과 chemokines인 IL-8 등에 의해 유도되며 주로 대식세포, 혈관내피세포, 평활근세포에서 발현된다(6). 증가된 MMPs의 단백질 분해활성에 의해 평활근 세포 주변의 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)이 분해되어 평활근 세포의 유주를 매개하게 된다. 따라서 평활근세포가 혈관의 내막(intima)으로 유주하여 증식(proliferation)하는데 MMPs가 중요한 역할을 하고, 이는 많은 혈관질환의 원인이 되며 동맥경화를 더욱 심화시킨다(7,8). 최근 이러한 위험인자들에 의해 동맥경화

\*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel: 82-53-580-5538

Fax: 82-53-580-5538

E-mail: inseon@kmu.ac.kr

Received February 16, 2010; revised April 22, 2010;

accepted April 23, 2010

가 유발되는 분자 생물학적인 발생기전이 밝혀지고 치료제에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다(3).

한편, 개다래(*Actinidia polyama*)는 다래나무(미후리)과(Actinidiaceae)에 속한 낙엽 덩굴성 식물인 개다래나무의 과실로, 이에 대한 성분으로는 자당, 점액질, 전분, 단백질, 탄닌, 유기산, 비타민 C, 비타민 A, 비타민 P 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 지금까지 알려진 효과로는 지갈(止渴), 해번열(解煩熱)과 비뇨기결석(泌尿器結石) 치료가 있다(9). 또한 민간에서는 복통, 류마티스 관절염, 뇌졸중 치료에 사용되었으며(10), 최근 소염, 진통, 통풍에 효과가 있다고 알려져 있다(11).

이처럼 개다래는 높은 기능성을 나타내지만 이를 활용한 다양한 기능성 식품이나 치료용 약학 조성물을 개발하고자 할 때 기호적으로 양호하지 않은 맛과 향기 특성을 나타내기 때문에 많은 제약이 따른다. 하지만 개다래를 초임계 처리할 경우, 개다래가 지닌 다양한 생리활성 성분은 그대로 유지하면서 개다래 특유의 강한 향과 맛을 간단하고 효과적으로 제거할 수 있다. 반면 개다래를 초임계 처리하여 맛과 향을 보완할 수 있지만 처리 후 많은 부산물(박)은 폐기해야하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 염증반응으로 인해 사람동맥평활근세포의 migration 증가와 MMP-9의 발현이 증가한다는 보고(12)에 따라 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ 을 평활근세포에 처리하여 발현되는 동맥경화관련 지표인자인 MMP-9의 활성억제에 대해 연구하였다. 이에 기존 개다래 추출물에 비해 초임계 박추출물의 기능성이 더욱 우수한 것으로 나타났기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 개다래 주정 추출물 제조

건조 상태의 개다래 1 kg을 구입하여 가볍게 수세하여 건조한 후, 개다래 무게의 10배량(w/v)의 70% 식용주정을 가하여 실온에서 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No. 3, Maidstone, England)를 사용하여 2회 여과하고, 상등액은 rotary vacuum evaporator(UNI TRAP UT-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 55°C에서 농축한 후 동결 건조하여 개다래 추출물 306.9 g을 수득하였다.

### 초임계 추출물 제조

초임계유체추출장치(SFT-100XW, Supercritical Fluid Technologies, Inc., Newark, DE, USA)를 사용하여 Table 1의 조건으로 개다래를 추출하였다. 즉, 시료 40 g을 100 mL의 추출조에 넣고 일정한 온도와 압력의 추출조건(Table 1)에서 CO<sub>2</sub>의 유속은 2 mL/min로 dynamic mode에서 추출하였다.

### 초임계 박 추출물 제조

초임계 추출을 하고 남은 부산물인, 개다래 박 무게의 10배량(w/v)의 70% 식용주정을 가하여 실온에서 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과지를 사용하여 2회 여과하고, 상등액은 rotary vacuum evaporator로 55°C에서 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

**Table 1. Conditions of supercritical fluid extraction**

Extraction condition	
Temperature (°C)	35, 45, 55
Pressure (psi)	1500, 3000, 4500
Time (hr)	1, 2

### 세포주 배양

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다. 또한 사람의 대동맥 평활근 세포주인 Human Aortic Smooth Muscle Cells(HASMC)은 Bio-Whittaker사(Walkersville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였다. HASMC은 DMEM에 10% FBS와 1% antibiotics가 첨가된 배지에서 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-3일에 한번 씩 계대 배양하였다.

### 세포독성 측정

시료의 세포독성을 측정하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. RAW 264.7 세포 1×10<sup>5</sup> cells/well, HASMC 1×10<sup>4</sup> cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 RAW 264.7 세포는 serum free 배지로 교체한 후 LPS(100 ng/mL)와 시료를 처리하였고, 배양한 HASMC는 시료를 처리한 후, 각각 24시간 배양하여 5 mg/mL의 MTT 용액 10  $\mu$ L를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

### Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO생성량 측정은 Griess Reagent System의 방법(13)에 따라 RAW 264.7 세포주를 1×10<sup>5</sup> cells/well로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 LPS(100 ng/mL)와 농도별 sample 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu$ L를 96 well plate에 취하고, 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도( $\mu$ M)는 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

### Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE<sub>2</sub> 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 Cayman Chemical(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 실험하였다. 각 시료의 추출물 혹은 LPS를 처리한 배양액을 이용하여 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 50  $\mu$ L씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50  $\mu$ L와 PGE<sub>2</sub> conjugate 50  $\mu$ L씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200  $\mu$ L씩 처리하여 50-60분간 반응시킨 후, 50  $\mu$ L의 stop solution을 처리한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ ) 생성량 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행하였다. 각 시료의 추출물 혹은 LPS를 처리한 배양액을 이용하여 TNF- $\alpha$  측정에 사용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50  $\mu$ L씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다.

washing buffer로 3회 세척한 다음, 100  $\mu$ L의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate(TMB) substrate를 100  $\mu$ L씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100  $\mu$ L의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Gelatin zymography assay**

MMP-9의 활성을 알아보기 위해 gelatin zymography를 실시하였다. 6 well plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 이용하여 HASMC를  $3 \times 10^5$  cells/well의 농도로 24시간 동안 부착시킨 후 FBS가 없는 무혈청 배양액으로 갈아준 다음 시료와 TNF- $\alpha$  (100 ng/mL)를 처리하였다. 24시간 후 배양 상층액을 취하여 0.1% gelatin을 포함한 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 SDS를 제거하기 위해 washing buffer(2.5% triton X-100)로 30분 동안 세척한 후 reaction buffer(10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% NaN<sub>3</sub>, 50 mM tris-HCl, pH 7.5)에 24시간동안 37°C incubator에서 반응시켜 기질분해를 유도하였다. 반응한 gel을 0.2% Coomassie brilliant blue 용액으로 염색하고, 10% methanol과 10% acetic acid로 탈색하여 MMP-9의 활성 정도를 확인하였다.

**Western blot analysis**

박 추출물의 MMP-9 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 수행하였다. 먼저 배양된 세포를 회수하여 lysis buffer(50 mM tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL aprotinin)를 넣고 4°C에서 30분간 단백질을 용해시켰다. 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 BCA protein assay를 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고, 전기영동을 하여 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)과 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 180 mA에서 90분간 전이시켰다. 계속하여 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체를 반응시키고 TTBS으로 세척한 후 마지막에 증류수로 세척하고 membrane에 ECL(enhanced chemiluminescence) 용액을 도포하고, X-ray film에 노출하여 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다.

**통계학적 분석**

대조군과 추출물 처리군의 실험결과에 대한 통계처리는 Student's t-test로 비교하였다. 통계처리 후 p값이 0.05 미만일 경우(p<0.05) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

**결과 및 고찰**

**개다래 초임계 추출 수율**

개다래의 초임계 추출 수율은 Table 2와 같이 동일한 온도에서는 압력이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났으며, 동일한 압력에는 온도가 증가할수록 감소하는 경향이였다. 또한 동일한 온도, 압력일 경우 추출시간이 길어질수록 증가하였다. 특히 45, 55°C에서 압력이 3,000 psi에서 4,500 psi로 증가할 경우 수율이 2배 정도 증가하는 경향을 나타내었으나 45°C, 4,500 psi의 경우 1시간 추출 시 0.65 $\pm$ 0.03%에서 2시간 추출 시 0.72 $\pm$ 0.04%로 시간이 증가하여도 추출수율이 크게 증가하지 않는 것으로 나타났다.

**Table 2. Yield of supercritical fluid extraction (%)**

Temperature (°C)	Pressure (psi)	Time	
		No. 1 hr	No. 2 hr
35	1500	1. 0.15 $\pm$ 0.02	2. 0.31 $\pm$ 0.07
	3000	3. 0.38 $\pm$ 0.01	4. 0.52 $\pm$ 0.02
	4500	5. 0.50 $\pm$ 0.03	6. 0.55 $\pm$ 0.09
45	1500	7. 0.09 $\pm$ 0.01	8. 0.18 $\pm$ 0.04
	3000	9. 0.34 $\pm$ 0.06	10. 0.48 $\pm$ 0.04
	4500	11. 0.65 $\pm$ 0.03	12. 0.72 $\pm$ 0.04
55	1500	13. 0.02 $\pm$ 0.00	14. 0.07 $\pm$ 0.01
	3000	15. 0.31 $\pm$ 0.03	16. 0.49 $\pm$ 0.02
	4500	17. 0.36 $\pm$ 0.01	18. 0.76 $\pm$ 0.11

온도, 압력, 추출시간을 고려하여 볼 때 45°C, 4,500 psi에서 1시간 동안 추출하는 것이 가장 바람직한 것으로 판단되며 추후 연구에서는 4,500 psi 이상의 조건도 고려해 보아야 할 것이다.

**개다래 주정 추출물 및 초임계 박 추출물이 Nitric oxide 소거활성에 미치는 영향**

염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(proinflammatory mediators)이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide(NO)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등이 있다(14,15). 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 염증을 일으킨다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) 등이 포함된다(16-18).

활성질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 nitric oxide(NO)에 대한 추출물의 소거 효과를 관찰한 결과, 대조군에서 LPS 유도에 의한 NO 생성량이 약 45  $\mu$ M이었다. 이에 비해 초임계 오일 추출물이나 박 추출물을 각각 500  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL로 처리하였을 때, 오일이나 박 추출물에서 70% 이상의 NO 소거활성을 보인 그룹은 11, 13, 14 이었다(Table 3). 그 중 NO 소거활성이 우수하고 추출수율이 가장 좋은 박 11을 선택하여 다음 실험을 진행하였다. 또한 박 11 추출물을 개다래 주정 추출물과 비교하기 위해 박 11 추출물을 10, 100  $\mu$ g/mL를 처리하였을 때, 주정 추출물의 NO 소거율은 각각 4.61, 19.00%을 나타내 NO 소거활성이 미미한 편이었으나, 초임계 박 11 추출물의 경우, 각각 36.63, 79.58%을 나타내 우수한 NO 소거활성을 보였다(Table 4). 따라서 개다래는 주정 추출물에 비해 초임계 박 추출물이 우수한 NO 소거능을 가지는 것으로 나타났다. 이들 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 보여 개다래 추출물의 항염증 효과는 세포 생존율의 감소와는 관계없음을 보여준다.

**개다래 초임계 박 11 추출물이 PGE<sub>2</sub>와 TNF- $\alpha$ 의 생성량에 미치는 영향**

RAW 264.7 세포에 100 ng/mL의 LPS를 처리했을 때, PGE<sub>2</sub>의 생성량은 약 20배 증가되었으며, 개다래 박 11 추출물을 각각 10, 100  $\mu$ g/mL로 처리했을 때 PGE<sub>2</sub> 함량은 약 740, 500 pg/mL의 농도를 보여 박 11 추출물이 90% 이상의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제력을 보였다(Fig. 1A). 또한 LPS 처리시에 TNF- $\alpha$ 는 효과적으로 유도되었

**Table 3. Effects of SFE (oil and marc ext.) from *Actinidia polygama* Max. on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells**

Oil (500 µg/mL)	Cell survival rate (%)	NO inhibition rate (%)*	Marc ext. (100 µg/mL)	Cell survival rate (%)	NO inhibition rate (%)
1	79.64±17.49	56.06±2.25	1	96.59±1.05	76.72±7.48
2	89.65±2.64	41.38±5.53	2	92.23±0.87	77.25±5.56
3	95.83±2.75	28.49±2.91	3	93.37±0.50	80.07±2.83
4	97.77±1.13	50.52±3.36	4	96.63±3.09	69.83±9.56
5	105.00±0.64	59.30±2.62	5	93.99±1.14	62.93±6.24
6	101.07±0.50	62.87±2.23	6	93.04±2.06	65.39±4.93
7	93.72±10.76	69.72±3.02	7	97.43±2.68	78.76±4.57
8	98.21±1.11	58.13±4.27	8	94.69±4.53	66.32±4.20
9	73.90±22.74	67.90±3.24	9	94.49±1.50	74.09±5.10
10	91.58±1.40	49.78±5.00	10	99.92±0.78	78.43±2.86
11	102.72±2.23	72.30±0.56	11	98.17±1.71	79.58±3.35
12	101.73±1.92	70.92±3.41	12	96.03±1.26	64.90±2.75
13	103.24±1.25	77.14±5.59	13	93.49±2.08	83.34±8.74
14	101.99±0.23	74.96±2.88	14	92.67±1.05	73.57±2.88
15	105.74±0.31	55.05±3.57	15	100.26±3.64	74.88±6.25
16	102.44±0.88	44.84±1.83	16	99.65±2.12	60.50±0.52
17	96.87±4.15	48.13±4.60	17	100.70±0.76	74.93±3.97
18	100.97±1.64	64.14±2.23	18	98.99±4.55	86.65±5.87

\*The culture supernatants were isolated and analyzed for nitrite levels. Data represent the mean±SEM of three independent experiments (n=3).

**Table 4. Effects of ethanol extract and SFE (marc extract 11) from *Actinidia polygama* Max. on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells**

Sample	Concentration (µg/mL)	Cell survival rate (%)	NO inhibition rate (%)*
EtOH ext.	10	95.32±5.06	4.61±0.91
	100	102.73±0.28	19.00±2.34
Marc ext. No. 11	10	96.18±4.23	36.63±4.00
	100	98.17±1.71	79.58±3.35

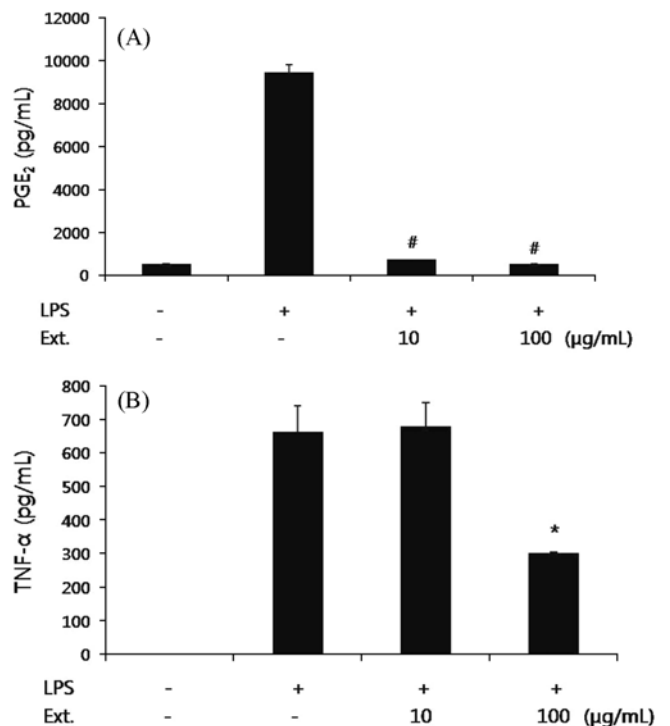
\*The culture supernatants were isolated and analyzed for nitrite levels. Data represent the mean±SEM of three independent experiments (n=3).

으며, 막 11 추출물을 처리했을 때, 10 µg/mL의 농도에서는 별다른 영향을 미치지 못했으나, 100 µg/mL의 농도에서 TNF-α의 생성을 약 50% 이상 감소시켰다(Fig. 1B).

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE<sub>2</sub>, lysosomal enzyme, free radical 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다(15). RAW 264.7 세포주에 개다래 초임계 박 추출물을 처리하고, LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 염증인자인 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성, 그리고 proinflammatory cytokines인 TNF-α의 생성량을 측정된 결과, 개다래 막 11 추출물은 LPS로 유도된 염증 인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

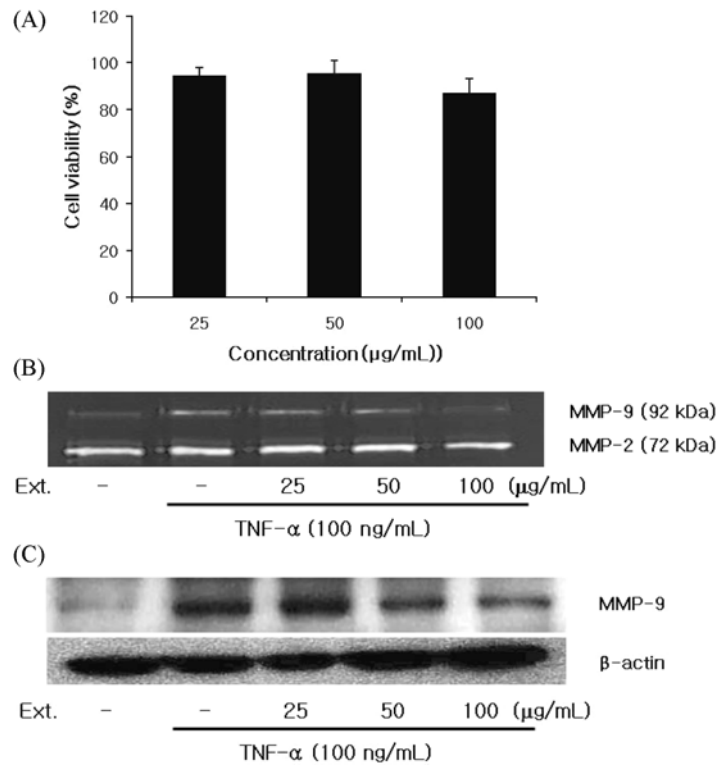
**개다래 초임계 박 11 추출물이 MMP-9의 활성화에 미치는 영향**

개다래 박 11 추출물의 MMP-9의 활성화에 미치는 영향을 측정하기 위해 세포 생존율을 MTT assay로 관찰한 결과, 박 추출물 25, 50 100 µg/mL의 농도에서 HASMC에 대한 세포 생존율은 각각 94.6, 95.7, 87.3%로 나타났다(Fig. 2A). 따라서 실험농도에서 박 추출물은 HASMC에 대해 거의 독성을 보이지 않았다.



**Fig. 1. Effects of SFE (marc extract 11) from *A. polygama* Max. on LPS-induced PGE<sub>2</sub> (A) and TNF-α (B) levels in RAW 264.7 cells.** The culture supernatants were isolated and analyzed for PGE<sub>2</sub> and TNF-α levels. Data represent the mean±SEM of three independent experiments (n=3). \*p<0.05, #<0.001 when compared the groups treated with LPS (100 ng/mL) alone.

박 11 추출물의 MMP-9 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 zymography를 실시한 결과, TNF-α를 단독으로 처리한 군에서



**Fig. 2. Effects of SFE (marc extract 11) from *A. polygama* Max. on the growth of HASMC and TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression.** Cells were treated with the indicated concentrations of extract for 24 h. Cell viability was determined by an MTT assay (A). Cells were treated with the indicated concentrations of extract in the presence of TNF- $\alpha$  (100 ng/mL) for 24 h. The conditioned medium was prepared and used for gelatin zymography (B). MMP-9 protein levels were measured by western blotting.  $\beta$ -Actin was used as an internal control (C).

MMP-9이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이에 박 추출물을 농도별로 처리한 결과, 25 µg/mL의 농도에서는 MMP-9 활성에 변화가 없었으나 50, 100 µg/mL의 농도에서 MMP-9의 활성이 효과적으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 2B). 또한 박 11 추출물의 MMP-9 활성 억제효과가 MMP-9의 단백질 발현의 감소에 의한 것인지를 조사하기 위해 western blotting 방법으로 MMP-9의 단백질 발현을 측정하였다. HASMC에 TNF- $\alpha$ 를 단독 처리한 군에서는 MMP-9의 단백질 발현이 증가되었으며, 박 11 추출물 50, 100 µg/mL 처리군에서 농도 의존적으로 MMP-9의 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다(Fig. 2C). 따라서 박 11 추출물은 TNF- $\alpha$ 에 의해 증가된 MMP-9의 활성을 억제함으로써 평활근세포가 혈관의 내막으로 유주하여 증식하는 것을 막아줄 것이라 생각된다.

결론적으로 개다래 박 11 추출물은 LPS로 유도된 염증 인자들을 효과적으로 감소시켰으며, TNF- $\alpha$ 에 의해 증가된 MMP-9의 활성을 억제하는 것으로 나타나 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

**요 약**

개다래(*Actinidia polygama* Max.)는 복통, 류마티스 관절염, 뇌졸중 치료에 사용되었으며, 최근 소염, 진통, 통풍에 효과가 있다고 알려져 있으나 특유의 강한 향과 맛을 지니고 있어 기능성 식품이나 치료용 약물을 개발하고자 할 때 많은 제약이 따른다. 따라서 개다래를 초임계 추출하여 향과 맛을 개선하고, 본 연구에서

는 초임계추출 후 남은 부산물을 이용하여 (박)추출물을 제조하고 항염증 및 항동맥경화 활성을 조사하였다. 개다래 주정 추출물 및 초임계 박 추출물의 NO 소거활성을 비교한 결과, 개다래 박 11 추출물 10, 100 µg/mL의 농도에서 36.63, 79.58%의 NO 소거활성을 보여 주정 추출물(4.61, 19.00%)에 비해 훨씬 높은 NO 소거활성을 보였다. 또한 RAW 264.7 세포주에 개다래 초임계 박 11 추출물을 처리하고, LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 염증인자인 PGE<sub>2</sub>의 생성, 그리고 proinflammatory cytokines인 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정한 결과, 개다래 박 11 추출물은 LPS로 유도된 염증 인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 박 11 추출물의 MMP-9 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 zymography를 실시한 결과, 추출물 50, 100 µg/mL의 농도에서 MMP-9의 활성이 효과적으로 감소됨을 확인하였으며, MMP-9의 단백질 발현도 억제됨을 확인하였다. 결론적으로 개다래 박 11 추출물은 LPS로 유도된 염증 인자들을 효과적으로 감소시켰으며, TNF- $\alpha$ 에 의해 증가된 MMP-9의 활성을 억제하는 것으로 나타나 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

**감사의 글**

본 논문은 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원과 2010년 교육과학기술부(지역거점 연구단육성사업/노화극복웰빙을 위한 융합의료기술개발사업단)로부터 지원받아 수행되었음에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* 340: 115-126 (1999)
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143 (2002)
3. Kim HY, Park JY. Oxidative stress and atherosclerosis. *J. Korean Soc. Endocrinol.* 15: 1-14 (2000)
4. Sekalska B. Aortic expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene in rabbits with experimental atherosclerosis. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 49: 79-90 (2003)
5. Kodili R, Hajjou M, Berman AB, Bansal MB, Zhang S, Pan JJ, Schecter AD. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 69: 706-715 (2006)
6. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanism in intimal hyperplasia. *J. Pathol.* 190: 300-309 (2000)
7. Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ. Res.* 91: 845-851 (2002)
8. Lin SJ, Lee IT, Chen YH, Lin Fy, Sheu LM, Ku HH, Shiao MS, Chen JM, Chen YL. Salvianolic acid B attenuates MMP-2 and MMP-9 expression *in vivo* in apolipoprotein-E-deficient mouse aorta and *in vitro* in LPS-treated human aortic smooth muscle cells. *J. Cell Biochem.* 22: 372-384 (2007)
9. Jung BS, Shin MG. Hyangyak-Dictionary. Younglimsa, Seoul, Korea. p. 386 (1990)
10. Park EH, Kahn JH. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch. Pharm. Res.* 22: 554-558 (1999)
11. Kang HJ. Anti-inflammatory, analgesic, and hypouricemic activities of *Actinidia polygama*. MS thesis, Kyung Hee Univ. Seoul, Korea (2003)
12. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ. Res.* 78: 38-43 (1996)
13. Wang S, Chen Y, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction. a traditional Chinese formulation. *J. Ethnopharmacol.* 114: 458-462 (2007)
14. Nathan C, Xi QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918 (1994)
15. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilane, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets-Inflamm. Allergy* 4: 471-479 (2005)
16. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: Critical remarks. *Curr. Med. Chem.* 9: 1033-1043 (2002)
17. Parente L, Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: Two enzymes in the spotlight. *Biochem. Pharmacol.* 65: 153-159 (2003)
18. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13: 85-94 (2001)