

산양삼(Korean *Panax ginseng*) 추출물의 항산화 효과 및 LPS로 염증이 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증매개물질 억제효과

김예진 · 손대열[†]

대구한의대학교 한방식품약리학과

Antioxidant and Inhibitory Effects of Korean *Panax ginseng* Extract on Pro-inflammatory Mediators in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages

Ye-Jin Kim and Dae-Yeul Son[†]

Dept. of Herbal Food Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea

Abstract

Biological activities of Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract (KPGE) were investigated. The measured total polyphenol content of KPGE was 357.45 mg/100 g. KPGE showed the highest α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activities of 80% and 86% at 1,000 $\mu\text{g/mL}$, respectively. DPPH and ABTS radical scavenging activities significantly increased in a KPGE concentration-dependent manner. SOD-like activity of KPGE (1, 10, and 100 $\mu\text{g/mL}$) increased from 22% up to 33% at KPGE concentrations of 500 and 1,000 $\mu\text{g/mL}$. KPGE treatment significantly suppressed the generation of pro-inflammatory mediators, including nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2), and cytokines (tumor necrosis factor- α : TNF- α , interleukin-6: IL-6, interleukin-1 β : IL-1 β), in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. KPGE demonstrated strong anti-inflammatory activity that reduced NO and PGE_2 production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Even low concentrations of KPGE (1 and 10 $\mu\text{g/mL}$) reduced PGE_2 and NO production in RAW 264.7 macrophages without LPS-stimulation, respectively. At concentrations of 100, 500, and 1,000 $\mu\text{g/mL}$, TNF- α , IL-1 β and IL-6 production were significantly suppressed. The results of our study suggest the potential of Korean *Panax ginseng* as an excellent antioxidant substance for inhibiting inflammatory mediators. Therefore, Korean *Panax ginseng* (KPGE) may be used as a therapeutic approach to various inflammatory diseases.

Key words: antioxidant, Korean *Panax ginseng*, nitric oxide, polyphenol, pro-inflammatory

서 론

염증반응은 체내에서 발생한 산화스트레스에 의해 촉진되는데, 산화스트레스는 세포사멸뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증반응을 개시하거나 악화시킨다(1). 대식세포(macrophage)는 동물 체내 모든 조직에 분포하며 인체 내에서 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로, 인체 면역체계에서 중요한 역할을 하는 백혈구이다. 외부의 자극으로 인해 활성화된 대식세포는 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유발함으로써 천식, 기관지염, 관절염, 다발성경화증, 동맥경화증, 뇌졸중, 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성뇌질환 및 바이러스 감염으로 인한 염증질환 등을 유발하고, 질환을 악화시키는 계 된다(2). 내독소의 하나인 lipopolysaccharide(LPS)는 대식세포에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflam-

matory cytokine을 증가시키며, nitric oxide(NO), prostaglandin E_2 (PGE_2) 등의 염증매개물질을 분비한다. 염증상태에서는 cyclooxygenase-2(COX-2)와 NO synthase(NOS)가 유도되어 과량의 PGE_2 , NO 등이 생성되며 여러 가지 질병 및 암화(carcinogenesis)가 촉진된다(3). 특히 NO를 생성하는 효소인 일산화질소 생성효소(NOS)와 다양한 prostaglandins(PGs)의 생합성을 매개하는 효소인 cyclooxygenase(COX)가 염증반응을 조절하는 중요한 매개체로 알려져 있다(4). 이와 같이 NO 및 PGs가 염증반응과 밀접하게 관련되어 있어, 이들의 생성과 생성에 관여하는 효소의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 특히 화학적인 약품이 아닌 천연물이나 한약 재료에 의한 염증질환 치료제 및 치료보조제가 각광 받고 있으며 연구가 활발히 진행되고 있다(5).

산양삼(Korean *Panax ginseng*, KPG)은 장뇌삼이라고도 불리며 뿌리의 굵기와 길이, 몸통의 태 존재 유무, 연령에

[†]Corresponding author. E-mail: dyson@dhu.ac.kr
Phone: 82-53-819-1434, Fax: 82-53-819-1272

따른 너두의 개수 그리고 토양과 기후조건에 따라 수명이 다르며, 인삼에 비해 향기가 강한 것이 특징이다(6). 산양삼은 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 천연산삼의 종자나 묘삼을 인위적으로 산삼의 생육환경에 가능한 가깝게 깊은 산속 박달나무, 옻나무 등에 그늘지고 습기가 많은 곳에 뿌려 두고 자연 환경에 그대로 방치해 두었다가 수십 년이 경과한 후에야 캐내는 삼을 말하나 산양삼에 대한 정확한 정의는 명확하지 않은 상태이다. 산양삼은 효능 면에서 재배 인삼보다 효과가 더 높은 것으로 알려져 있으며, 약리 활성 면에서는 천연 산삼 다음으로 효능을 인정받고 있으며 재배 인삼과 비교하였을 때 인삼 사포닌인 ginsenoside의 함량이 높다고 보고되었으며, 또한 항암, 혈압강하, 항산화, 간독성, 지질강화 등에 효능이 있는 것으로 알려지고 있지만(7) 아직까지 다양한 분야에서의 연구가 미비한 상황이다. 본 실험에서는 산양삼을 55% 에탄올 용매로 환류냉각 추출하여 얻어진 추출물을 이용하여 항산화 효과뿐 아니라 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증매개물질 생산 억제에 대한 효과를 검증함으로써 산양삼의 이용가치를 높이고자 한다.

재료 및 방법

시료 추출

상주에서 구입한 산양삼을 흐르는 물에 깨끗이 세척하여 자연건조 후에 추출을 용이하게 하기 위해 잘게 썰은 후, 환류냉각기에서 4일 동안 추출하였다. 사포닌과 같은 산양삼의 유효물질 추출을 효과적으로 하기 위해 추출 용매는 55%의 에탄올을 사용하였고, 사포닌 파괴를 최소화하기 위해 추출 온도는 55~65°C로 설정하였다. 추출이 끝난 후에 여과지를 이용하여 여과하고 감압 농축기로 농축, 동결 건조 후에 시료(KPGE)는 사용 전까지 냉동(-20°C) 보관하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

추출물에 대한 시료의 페놀 함량은 Folin-Dennis법(8)에 따라 분광광도계를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 각각의 시료를 dimethylsulfoxide(DMSO)에 일정농도로 녹인 후 0.5 mL씩 test tube에 취하여 증류수 7 mL를 첨가하고 Folin Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 넣고 1분간 혼합하였다. 여기에 탄산나트륨 포화용액 1 mL를 넣은 후 혼합하여 실온에서 1시간 방치시키고 760 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Optizen, Daejeon, Korea)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량을 정량하기 위해 표준물질 tannic acid를 DMSO에 녹여 일정한 농도별로 조제하고 시료와 동일한 방법으로 실험하여 검량선을 작성하고 각 추출물의 총 페놀 함량을 측정하였다.

DPPH free radical 소거활성

Free radical 소거활성은 Blois 등(9)의 방법을 변형하여 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) free radical 소거활

성으로 측정하였다. 즉, 각 농도별 추출물 0.1 mL에 2×10^{-4} M DPPH용액 0.1 mL를 가하고 10초간 혼합한 뒤 상온에서 60분간 방치 후 525 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타냈다.

ABTS free radical을 이용한 총 항산화력 측정

시료의 항산화능 측정은 Re 등(10)의 방법에 따라 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid(ABTS)를 이용하여 측정하였다. ABTS를 7 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.4 mM의 potassium persulfate를 가하여 ABTS free radical을 생성시켜 실온의 암소에서 12~16시간 동안 방치 후 사용하였다. Radical이 생성된 ABTS 용액을 99% ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.02 가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 100 μ L와 시료 100 μ L를 혼합하여 6분간 반응 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

free radical scavenging activity (%) =

$$\{1 - (A_{\text{test}} - A_{\text{Blank}} / B_{\text{control}})\} \times 100$$

A_{test} : 시료 첨가구의 흡광도

A_{Blank} : Blank의 흡광도

B_{control} : 시료 무첨가구의 흡광도

SOD 유사활성 측정

Marklund와 Marklund의 방법(11)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 일정농도의 시료 0.2 mL, Tris-HCl buffer(50 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL, 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키고 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, SOD 유사활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성능(%) = $\{1 - (A_{\text{test}} - A_{\text{Blank}} / B_{\text{control}})\} \times 100$

A_{test} : 시료첨가구의 흡광도

A_{Blank} : Blank의 흡광도

B_{control} : 시료 무첨가구의 흡광도

세포배양 및 세포독성 측정

RAW 264.7 대식세포는 DMEM에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 배지를 사용하였으며 배양기에서 37°C와 5% CO₂를 유지하며 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다. 산양삼 55% 에탄올 추출물의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 새로운 배지를 넣어준 후 추출물을 농도별로 처리하여 이를 다시 24시간 배양한 후에 MTT시약(5

mg/mL)을 넣고, 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하였다. 각 well에 형성된 formazan은 DMSO 100 μ L를 첨가하여 녹이고, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. LPS를 처리한 군의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

NO 생성 저해 활성

LPS에 의해 유도된 NO 생성 저해 활성을 측정하기 위해 24-well plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후 농도별로 시료를 처리하고 1시간 배양 후 LPS(1 μ g/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액 100 μ L를 취하여 동량의 Griess 시약을 첨가하고 10분간 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 DMEM 배지에 용해한 표준곡선을 이용하여 계산하였으며 LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 각 시료의 NO 생성 저해 활성을 확인하였다.

염증성 cytokine 및 PGE₂의 측정

RAW 264.7 대식세포를 24-well plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 시료를 농도별로 처리하여 1시간 동안 배양 후 각 well에 LPS를 1 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상층액을 채취하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 DB OptEIA™ ELISA kit (Becton, Dickinson and company, Franklin Lake, NJ, USA), PGE₂의 생성량은 R&D system PGE₂ kit(R&D system Inc, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 데이터는 3회 반복 측정하였으며, means \pm SD로 표시하였다. 또한 추출물에서 얻어진 결과에 대한 통계분석은 SPSS 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행하여 유의성이 있는 경우, 신뢰구간 $p < 0.001$ 에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

수율 및 총 폴리페놀 함량

천연물의 폴리페놀, 플라보노이드 등의 페놀성 물질의 함량에 비례하여 전자공여능 등의 항산화 활성이 증가한다는 많은 연구보고에 따르면 페놀성 물질은 천연물의 항산화작용 효과 검증의 지표라고 할 수 있다(12). 때문에 천연물의 항산화 효과 검증에 관한 많은 연구에서 폴리페놀 함량을 측정하였고, 폴리페놀 함량이 높을수록 항산화 효과가 우수함이 확인되었다.

산양삼 55% 에탄올 추출물(KPGE)의 추출수율은 32.02%이었으며, 총 폴리페놀의 함량은 tannic acid를 이용하여 측정된 결과 KPGE 100 g당 357.45 mg으로 확인되었다(Table

Table 1. Yield and total polyphenol contents (TPC) of Korean *Panax ginseng* extract

Sample	Extract solvent	Yield (% w/w)	TPC (mg TAE ¹⁾ /100 g)
Korean <i>Panax ginseng</i>	55% EtOH	32.02%	357.45

¹⁾TAE, tannic acid equivalents.

1). 비타민 나무 추출물의 항산화 활성 효과에 대한 연구보고(13)에 의하면, 잎의 에탄올 추출물에서 가장 높은 폴리페놀 함량(14.78 mg/100 g)을 나타냈고, Ryu 등(14)의 흑마늘 발효주를 이용한 항산화 활성 연구에서 확인된 폴리페놀 함량(190 mg/100 g) 결과와 비교해볼 때 산양삼 추출물이 상대적으로 높은 폴리페놀 함량을 포함하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. Han 등(15)의 연구에서는 추출 조건에 따른 오미자 추출물의 항산화의 효능을 검증했으며, 그 결과 실온에서의 추출 조건보다 열을 가하여 추출하는 것이 페놀물질의 추출에 더 유용하다고 보고하였다. 본 연구에서도 에탄올을 55~65°C로 가온하면서 추출하여 페놀성 물질이 효과적으로 추출되었다고 사료된다. 식물에 존재하는 많은 phytochemical 중 2차 대사산물의 하나인 폴리페놀계 물질들은 여러 가지 식품에 널리 분포되어 있으며 이들은 phenolic hydroxyl(OH) 그룹을 가지기 때문에 단백질 또는 효소, 기타 거대분자들과 결합하는 성질을 가지고 있어 라디칼포착 활성뿐 아니라 강한 환원력과 금속킬레이트 작용을 지니고 있기 때문에 천연 항산화제로서 작용을 할 수 있다. 그 외에도 항암, 고혈압 억제, 충치예방, 항염증 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다(16,17).

Free radical 소거활성

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 free radical 소거 작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다. 천연물이 가지는 free radical 소거활성을 측정하기 위해 널리 사용되는 대표적 방법은 DPPH와 ABTS system이다. KPGE의 항산화력을 측정하기 위해 1~1,000 μ g/mL의 농도에서 DPPH free radical 소거활성을 측정하였고 대조군으로는 식품 보존제로 널리 이용되는 butylated hydroxy toluene(BHT)과 우수한 항산화 효과가 검증된 비타민 C (ascorbic acid, AsA)를 사용하였다. 추출물의 DPPH free radical 소거활성은 농도 의존적으로 증가하였고(Table 2) 1,000 μ g/mL의 농도에서 80% 이상의 가장 높은 소거활성을 나타냈다($p < 0.001$). AsA에 비해 낮은 라디칼 소거활성을 나타냈지만 BHT와 비교해 볼 때, 농도에 따라 같은 소거활성 경향을 확인할 수 있었다. 또한 더덕 추출물의 항산화 효과에 대한 연구(18)에서 400 μ g/mL에서 23%의 DPPH radical 소거활성을 나타낸 것과 비교해 볼 때, 산양삼 추출물의 경우 100 μ g/mL의 낮은 농도에서도 25%의 소거활성이 확인됨으로써 KPGE의 높은 항산화력을 확인할 수 있었다.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of Korean *Panax ginseng* extract

Free radical scavenging activities (%)			
Concentration (µg/mL)	KPGE ¹⁾	BHT ²⁾	AsA ³⁾
1	7.92 ± 1.93 ^{aA}	4.87 ± 1.53 ^{aA}	39.60 ± 3.20 ^{aB}
10	16.94 ± 4.01 ^{bA}	10.67 ± 3.40 ^{bA}	71.98 ± 2.10 ^{bB}
100	25.84 ± 1.85 ^{cA}	26.53 ± 0.20 ^{cA}	89.40 ± 0.43 ^{cB}
500	54.99 ± 3.55 ^{dA}	52.73 ± 1.04 ^{dA}	89.33 ± 1.91 ^{cB}
1,000	80.94 ± 1.64 ^{eA}	82.07 ± 2.04 ^{eA}	89.27 ± 2.04 ^{cA}

¹⁾Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract.

²⁾BHT, butylated hydroxy toluene.

³⁾AsA, ascorbic acid.

The values are means ± SD; different superscripts within a column (a-e) or a row (A,B) indicate significant differences at $p < 0.001$.

ABTS free radical을 이용하여 산양삼 추출물의 free radical 소거활성을 살펴본 결과, DPPH free radical 소거능과 유사한 경향으로, KPGE 농도 증가에 따라 ABTS free radical 소거활성이 증가됨을 확인하였다. 1 µg/mL의 낮은 농도에서는 소거활성이 25%로 비교적 낮았지만, 농도 증가에 따라 free radical 소거능이 증가하였으며 1,000 µg/mL의 농도에서는 86% 이상의 free radical 소거활성을 나타내 우수한 ABTS free radical 소거능을 보였다(Table 3). 식품의 산화를 방지하기 위하여 지금까지 수많은 항산화 물질들이 개발되고 이용되어 왔는데, 합성 항산화제인 BHT 등은 가격이 저렴하고 우수한 항산화력을 나타내는 반면 과잉 섭취 시 독성이 우려되어 사용이 기피되고 있기 때문에 화학적 합성 첨가물에 대한 일반인들의 안전성에 대한 우려가 높아지고 있어 우수한 항산화 활성을 가지는 천연물을 이용하여 항산화제 개발에 대한 연구에 집중되고 있다(19).

KPGE의 DPPH와 ABTS free radical 소거활성은 대조군으로 사용된 BHT와 유사한 소거활성을 나타내 우수한 항산화력을 입증할 수 있었다. 또한, 인삼의 페놀성 물질은 항산화 및 노화억제에 유효한 성분으로 salicylic acid, vanilic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, genticic acid, cinnamic acid 등의 10여종 이상이 밝혀져 있고(20),

Table 3. ABTS radical scavenging activity of Korean *Panax ginseng* extract

Free radical scavenging activities (%)			
Concentration (µg/mL)	KPGE ¹⁾	BHT ²⁾	AsA ³⁾
1	25.96 ± 0.27 ^{aB}	9.45 ± 2.30 ^{aA}	41.79 ± 3.04 ^{aC}
10	26.87 ± 0.07 ^{aA}	23.68 ± 3.04 ^{bA}	79.10 ± 0.01 ^{bB}
100	34.34 ± 0.07 ^{bA}	76.25 ± 1.20 ^{cB}	94.43 ± 3.94 ^{cB}
500	55.98 ± 3.35 ^{cA}	87.10 ± 0.40 ^{dB}	94.48 ± 2.41 ^{cB}
1,000	86.11 ± 1.67 ^{dA}	94.38 ± 2.13 ^{eA}	94.24 ± 2.78 ^{cA}

¹⁾Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract.

²⁾BHT, butylated hydroxy toluene.

³⁾AsA, ascorbic acid.

The values are means ± SD; different superscripts within a column (a-e) or a row (A-C) indicate significant differences at $p < 0.001$.

Jang 등의 연구(21)에서는 재배삼(인삼)에 비해 산양삼에서 높은 항산화 효과가 확인되었다.

SOD 유사활성

항산화 효소 중 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical(O_2^-)과 반응하여 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 생성하는 효소로, 산소를 소비하는 모든 생물 중에 존재하여 생체 내에서 활성산소 장애에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다. 선천적으로 체내에 존재하는 SOD 효소는 성인의 시점에서부터 점차 감소하게 되므로 SOD 효소의 섭취는 중요하다. 천연물에서는 SOD 효소와 유사한 기능을 하는 유사활성 물질이 있어 천연물에서의 SOD 유사활성을 측정하여 기능성 소재로의 이용 가치를 높이는 연구가 활발히 진행되고 있다(22). KPGE의 1~1,000 µg/mL 농도에서 SOD 유사활성을 측정 한 결과, 1, 10, 100 µg/mL의 농도에서도 22% 이상의 비교적 높은 유사활성을 나타냈고, 500, 1,000 µg/mL에서 33% 이상의 높은 효과를 나타냈다(Fig. 1). Lim 등(23)의 약용식물에서의 20% 미만의 SOD 유사활성, Hong 등(24)의 과일, 과채류 착즙에서의 14%의 SOD 유사활성 결과와 비교해 볼 때, 산양삼 추출물의 SOD 유사활성이 높은 것으로 비교되며, 기능성식품뿐만 아니라 항염증소재나 피부 노화방지를 위한 화장품 등의 첨가제로서의 이용 가치를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

세포 독성 및 NO생성 저해 활성

RAW 264.7 대식세포에 대한 KPGE의 독성을 측정하기 위해 KPGE의 농도별(1, 10, 100, 500, 1000 µg/mL)로 처리하여 MTT assay 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 세포 MTT 반응에서 80% 이상의 생존율을 보이는 경우 세포독성이 없는 것으로 판단되는데, 본 실험에서 KPGE의 RAW 264.7 대식세포에 대한 세포 독성을 살펴본 결과 1~1,000 µg/mL 농도에서 100% 이상의 세포 생존율이 확인되어 독

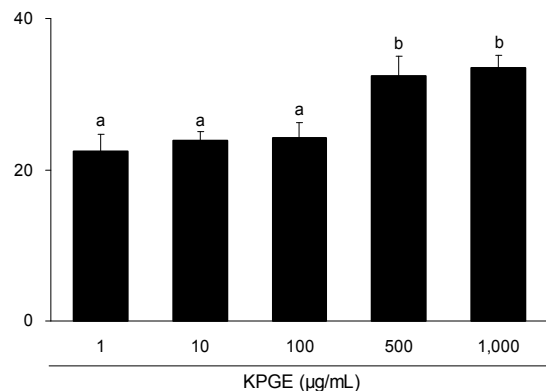


Fig. 1. SOD-like activity of Korean *Panax ginseng* extract. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean ± SD and values with different letters are significantly different ($p < 0.001$). KPGE: Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract.

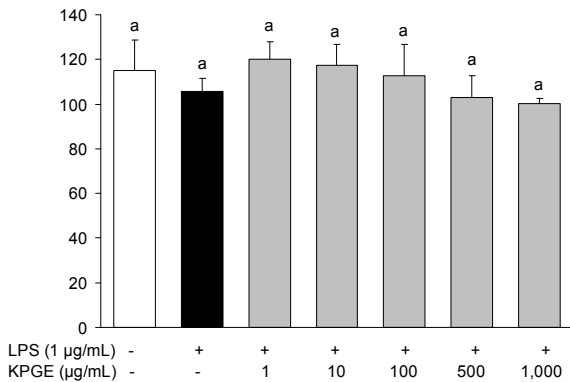


Fig. 2. Cell cytotoxicity of Korean *Panax ginseng* extracts on RAW 264.7 cells. Cell viability was assessed by the MTT assay in RAW 264.7 macrophages pretreated with Korean *Panax ginseng* extracts for 24 hr. Each value was compared with control at $p < 0.001$ by ANOVA test. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean \pm SD and values with different letters are no significantly different ($p < 0.001$). KPGE: Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract.

성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(Fig. 2). RAW 264.7 대식세포에서 독성을 보이지 않은 1, 10, 100, 500, 1000 µg/mL에서 다음 항염증 실험을 진행하였다.

체내에서 염증이 일어나게 되면 과량의 NO, PGE₂ 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 COX-2에 의해 형성된다. NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine 으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경 전달계 및 혈관이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(25,26). NO를 생산하는 NOS는 세포내에 존재하여 대식세포나 혈관내피세포가 활성화되거나 LPS와 같은 세균의 내독소나 여러 가지 cytokine에 의해 유도되는 형태인 iNOS의 형태가 있다. LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며 이에 의한 세포독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가되어 있음이 보고되어 있다(27,28). 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS에 노출시키면 뚜렷하게 NO가 측정되는데, KPGE의 NO 생성억제능을 확인하기 위해 세포 배양액을 Griess 시약과 반응시켜 NO의 발현량을 측정한 결과 KPGE의 조사된 모든 농도에서 NO 생성 억제 효과가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3).

LPS 처리로 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 생성된 49.4 µM의 NO는 매우 낮은 농도인 1 µg/mL KPGE 처리에 의해 16.8 µM로 NO 생성이 급격히 감소됨을 확인하였다. NO 생성량은 KPGE 추출물의 농도에 따라 감소하였고, KPGE 10 µg/mL 농도에서 14.1 µM의 NO 생성이 확인되어 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성되는 NO 값(11.0 µM)과 유사한 활성을 나타냈다($p < 0.001$). 결과적으로 KPGE

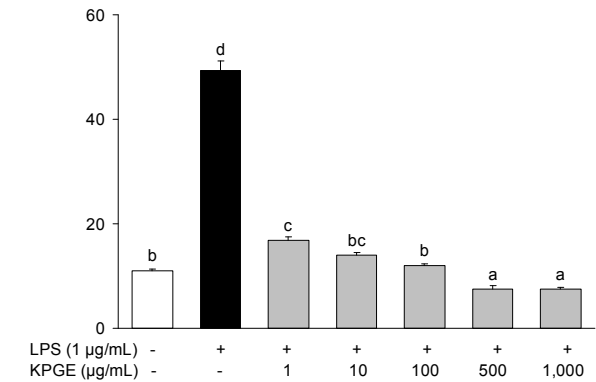


Fig. 3. Effects of Korean *Panax ginseng* on nitrite in RAW 264.7 macrophage stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 hr with indicated concentrations of Korean *Panax ginseng*, and stimulated 24 hr with LPS (1 µg/mL). The concentration of nitrite was determined as described under Materials and method. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean \pm SD and values with different letters are significantly different ($p < 0.001$). KPGE: Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract.

추출물의 모든 농도에서 염증이 유도된 군에 비해 우수하게 NO 생성량이 억제되었으며, 10 µg/mL 이상의 농도에서 염증이 유도되지 않은 정상군과 유사한 NO 생성량이 확인되어, 염증이 유도되었을 때 산양삼 55% 에탄올 추출물 KPGE는 효과적으로 NO 생성을 저해하여 염증 매개 물질의 생성을 억제할 것으로 사료된다.

PGE₂ 생성 억제 효과

PGs는 세포막에 존재하는 인지질에서 나온 arachidonic acid로부터 유래된 불포화지방산에 속하는 호르몬이다. 생성된 PG들 중 PGE₂는 염증반응에 깊이 관여하며, 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다(29). LPS에 의해 RAW 264.7 대식세포로부터 생성되는 PGE₂에 대한 KPGE의 억제 효과는 세포배양액으로부터 효소면역분석법에 의해 측정되었다. LPS에 의해 염증이 유도되지 않은 정상 세포배양액내 PGE₂의 농도는 215.4 pg/mL로 낮게 측정된 반면 LPS에 의해 염증이 유도된 세포배양액에서는 983.4 pg/mL로 현저하게 증가되었다. KPGE를 농도별로 처리한 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서는, 조사된 KPGE 전 농도 구간에서 정상군과 유사한 정도의 PGE₂ 양이 생성됨을 확인되었다(Fig. 4).

염증매개 cytokines

전염증성 cytokine(pro-inflammatory cytokine)은 염증을 나타내는 중요한 지표이다. LPS 자극에 의해 염증반응이 활성화된 세포는 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 전염증성 cytokine과 PGE₂ 등을 생산하게 된다(30).

LPS 처리는 RAW 264.7 대식세포의 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성을 유의적으로 증가시켰으며, KPGE 처리 군에서는 효과적으로 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). IL-1 β 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙

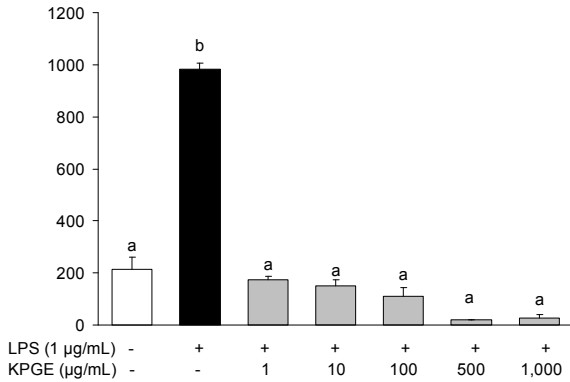


Fig. 4. Effects of Korean *Panax ginseng* on PGE₂ in RAW 264.7 macrophage stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 24 hr with indicated concentrations of Korean *Panax ginseng*, and stimulated 24 hr with LPS (1 µg/mL). The concentration of PGE₂ was determined as described under Materials and method. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SD and values with different letters are significantly different (p<0.001). KPGE: Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract.

등에 관련하는 것으로 알려져 있다(30). 조사된 KPGE 농도에 따른 IL-1β의 생성억제 효과를 측정한 결과, IL-1β의 생성량은 KPGE의 농도에 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 농도 100 µg/mL KPGE 처리는 RAW 264.7 대식세포의 IL-1β 생성을 56% 억제하였고, 1,000 µg/mL 농도에서는 75%의 가장 높은 억제 효과를 나타냈다.

IL-6는 B cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, 염증병변에서 증가하는 것으로 알려져 있다(30). KPGE가 처리된 RAW 264.7 대식세포는 농도에 의존적으로 유의적인 IL-6 생성억제 효과를 나타냈고, 1,000 µg/mL 농도에서 82%의 IL-6 생성 억제 효과를 나타내 LPS로 염증을 유도하지 않은 정상군(99%)에 가까운 결과를 나타냈다(Fig. 5B).

TNF-α는 LPS 반응의 주요 매개체로서, 염증성 병변과정에서 발현이 증가되는데 대식세포와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타낸다(30). TNF-α의 경우에도 KPGE 처리군에서 농도 의존적으로 생성량이 억제되는 것을 확인하였고 1,000 µg/mL에서 97%의 가장 높은

억제효과를 나타냈다(Fig. 5C). 특별히 염증성 cytokine인 TNF-α 및 IL-6는 iNOS의 발현을 자극하여 NO의 분비를 촉진하는 것으로 보고되고 있으며 PG, leukotrien 등의 염증 매개물질의 생산에도 관여하며, 내피세포의 intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)과 같은 접착분자의 발현을 촉진시킴으로써 국소부위의 대식세포, 호중구와 같은 염증 세포의 수를 증가시켜 염증반응을 유도하는 인자로 알려져 있다(31,32).

요 약

산양삼 55% 에탄올 추출물의 항산화 효과 및 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 염증매개 물질의 억제 능력을 측정하여 항염증 효과를 살펴보았다. 폴리페놀 함량, DPPH, ABTS system 및 SOD 유사활성을 측정하여 항산화 효과를 확인한 결과, 높은 폴리페놀 함량(357.45 mg/100 g)이 확인되었고, free radical 소거활성을 측정한 결과 KPGE는 농도 의존적으로 free radical을 소거하였으며, 대조군인 BHT와 유사한 소거활성이 확인되어 KPGE의 우수한 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 조사된 최고 농도(1,000 µg/mL)에서 DPPH(80%)와 ABTS(86%)는 가장 높은 활성을 나타냈다. SOD 유사활성은 1, 10, 100 µg/mL 농도에서 22%의 활성이 확인되었고, 500, 1000 µg/mL 농도에서 33%의 높은 항산화 활성이 확인되었다. 또한, KPGE의 항염증 효과를 확인하기 위해 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NO, PGE₂ 및 전염증성 cytokine(TNF-α, IL-1β, IL-6)을 측정한 결과, 추출물은 농도 의존적으로 NO, PGE₂ 생성 및 전염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과를 통하여 산양삼 55% 에탄올 추출물 KPGE는 높은 항산화 활성과 염증매개 물질의 생성을 억제하는 우수한 항염증 효과가 있는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 지식경제부 광역경제권 연계협력사

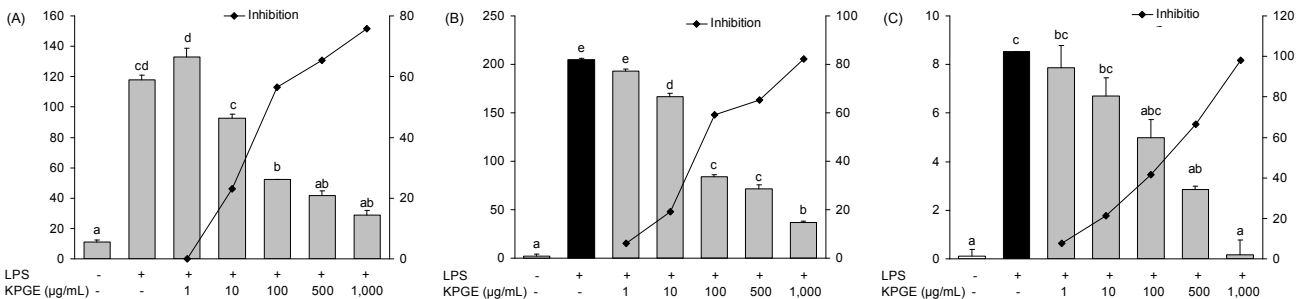


Fig. 5. Effects of Korean *Panax ginseng* extract on LPS-induced pro-inflammatory cytokine levels in cell culture supernatant of RAW 264.7 cells. A: IL-1β, B: IL-6, C: TNF-α. Incubations were carried out as described in Materials and Methods. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SD and values with different letters are significantly different (p<0.001). KPGE: Korean *Panax ginseng* 55% ethanol extract.

업: 백두대간 그린마인 비즈니스 구축사업 사업비의 일부로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Funk CD. 2001. Prostaglandins and leukotrienes; advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.
- Albina JE, Reichner JS. 1995. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz* 3: 46-64.
- Lee SJ, Lim KT. 2008. Phytogly coprotein inhibits interleukin-1 β and interleukin-6 via p38 mitogen activated protein kinase in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 cells. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 377: 45-54.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2: 787-759.
- Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophage. *J Immunol* 144: 1425-1431.
- Lim W, Mudge KW, Weston LA. 2007. Utilization of RAPD markers to assess genetic diversity of wild populations of North American ginseng (*Panax quinquefolium*). *Planta Med* 73: 71-76.
- Lui JHC, Staba EJ. 1980. The ginsenosides of various ginseng plants and selected products. *J Nat Prod* 43: 340-346.
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-249.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26: 1231-1237.
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
- Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239.
- Kim KM, Park MH, Kim KH, Im SH, Park YH. 2009. Analysis of chemical composition and in vitro anti-oxidant properties of extracts from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *J Appl Biol Chem* 52: 58-64.
- Lee HH, Kim IJ, Kang ST, Kim YH, Lee JO, Rye CH. 2010. Development of black garlic *Yakju* and its antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 42: 69-74.
- Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. 2009. A study of anti-oxidative and hypoglycemic activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Koeran J Food & Nutr* 22: 41-47.
- Eom Sh, Park HJ, Jin CW, Park SM, Kim MJ, Yu CY, Cho DH. 2007. Changes of antioxidant activity in *Juglans mandshrica* Maxim. leaves by far infrared irradiation. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 266-270.
- Ahn SI, Heung BJ, Son JY. 2007. Antioxidative activity and nitrite-scavenging abilities of some phenolic compounds. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 19-24.
- Kim SH, Chung MJ, Jang HD, Ham SS. 2010. Antioxidative activities of the *Codonopsis lanceolata* extract *in vitro* and *in vivo*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 193-202.
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J Oil Chem Soc* 52: 59-62.
- Choi HJ, Zhang YB, An BJ, Choi C. 2002. Identification of biologically active compounds from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean J Food Sci Technol* 34: 493-497.
- Jang HY, Park HS, Kwon KR, Rhim TJ. 2008. A study on the comparison of antioxidant effects among wild ginseng, cultivated wild ginseng, and cultivated ginseng extracts. *J Kor Inst Herb Acupunc* 11: 67-78.
- Murakami A, Takahashi D, Koshimizu K, Ohigashi H. 2003. Synergistic suppression of superoxide and nitric oxide generation from inflammatory cells by combined food factors. *Mutat Res* 523-524: 151-161.
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compounds contents in various Korean medicinal plant. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 191-202.
- Hong HD, Kang NK, Kim SS. 1998. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1484-1487.
- Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918.
- Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- MaCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JI, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 178: 749-754.
- Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Michell JA. 2002. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Tox Oncol* 21: 93-101.
- Kim HJ, Park TS, Jung MS, Son JH. 2011. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo Bansi). *J Appl Biol Chem* 54: 71-78.
- Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F. 2007. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: elevation of prostaglandin D₂ levels. *Arthritis Res Ther* 9: R64.
- Yang HM, Lim SS, Kee YS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. 2007. Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Korean J Food Sci Technol* 39: 342-347.

(2012년 6월 12일 접수; 2012년 7월 16일 채택)