

왕호장 열매의 항염증 효과

박 성 하[†] · 정 현 정 · 박 병 준 · 정 태 화

한국콜마(주) 소재연구소
(2015년 6월 17일 접수, 2015년 8월 17일 수정, 2015년 8월 18일 채택)

Anti-inflammatory Effect of *Fallopia sachalinensis* RonseDecr. Fruit

Sung Ha Park[†], Jeong Hyeon Jeong, Byoung Jun Park, and Tae Hwa Jeong

Bio Materials R&D Center, Kolmar Korea, CBTP, Future Convergent Tech Center, 76, Yeongudanji-ro, Ochang-eup,
Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do

(Received June 17, 2015; Revised August 17, 2015; Accepted August 18, 2015)

요약: 본 연구에서는 왕호장 열매 추출물(FSR)의 항염증 효과를 측정하였다. 왕호장 열매 추출물은 RAW 264.7 macrophage 세포에서 염증 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 발현을 억제하였으며, 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하고, 그 효과는 100 μ g/mL 농도에서 51%로 나타났다. 뿐만 아니라, iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 발현을 모두 억제함을 확인하였다. 따라서 왕호장 열매 추출물은 항염증 효능을 갖는 화장품 소재로서의 개발 가능성이 클 것으로 기대된다.

Abstract: To develop a new anti-inflammation agent for cosmetics, we investigated the anti-inflammatory activity of *Fallopia sachalinensis* RonseDecr. fruit extracts (FSR). FSR inhibited the pre-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) and reduced NO production of RAW 264.7 macrophage cells in a dose-dependent manner and decreased the activity to about 51% at a concentration of 100 μ g/mL. FSR suppressed not only the mRNA expression of iNOS and COX-2, but also the protein expression of iNOS and COX-2 in macrophage. The results suggested that FSR has considerable potential as a cosmetics ingredient with an anti-inflammatory effect.

Keywords: *Fallopia sachalinensis* RonseDecr., anti-inflammatory

1. 서 론

인체는 외부 병원체 등의 각종 외부 물질의 침입을 식별하고 이를 제거함으로써 몸을 보호하며 항상성을 유지하는 자기방어체계인 면역작용을 한다[1]. 이러한 면역작용은 면역을 억제 조절하는 면역 관용과 면역을 증진하는 면역반응으로 나눌 수 있다. 이 두 가지의 면역작용에 의하여 면역조절, 즉 항상성이 이루어진다. 여러 원인에 의하여 면역조절이 불균형을 일으키게 되면 질병을 발생시키게 된다. 면역기능이 결핍되거나

저하된 상태에서는 면역반응이 제대로 활성화되지 못하고 체내의 이물질에 대한 반응을 제대로 못하여 감염을 일으키게 된다.

대식 세포는 혈액 단핵세포로부터 분화된 조직 세포로 염증 반응에서 방어적 역할을 담당한다[2]. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성세균의 세포외막에 존재하며, 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여, 다양한 염증 발병 인자로 알려진 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide (NO) 형성 과정으로 이어지게 된다[3,4,6].

[†] 주 저자(e-mail: A7023@kolmar.co.kr)
call: 043)218-1057

NO는 염증 매개제로 NO synthase (NOS)에 의해 생성되며, 두 가지로 분류되어진다. cNOS는 다양한 세포에서 발견되어지고, iNOS는 유도되어지는 형태로 대식세포나 간세포 등에서 전염증 사이토카인이나, LPS 등에 의해 유도되어진다[5].

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 PGs으로 전환시키는 효소로써 COX-1, COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하지만, COX-2는 염증매개물질인 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 형성시킨다. PGE₂와 같은 물질은 염증반응, 면역반응 등에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[3,7,8].

왕호장(*Fallopia sachalinensis* RonseDecr.)은 국내 자생식물종으로 울릉도에 분포하며, 산지의 계곡에서 자란다. 호장근보다 훨씬 크기 때문에 왕호장이라 불려지고 있다. 최근 나고야 의정서 발의와 함께 국가 간 유전자원 확보 경쟁이 증가하고 있으며, 국가적 차원에서 국내 자생식물의 연구는 매우 중요한 의미를 가지고 있다 하겠다.

따라서, 본 실험에서는 국내에 자생하는 왕호장 열매 추출물을 이용하여 기존에 밝혀지지 않은 항염증 효과를 확인하고 항염 및 화장품 소재로의 이용 가능성을 확인하기 위해 실험을 진행하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 왕호장 열매 추출물은 한국생명공학연구원에서 구매하였다. MTT는 Sigma (USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Thermo scientific (USA), fetal bovine serum (FBS)과 Antibiotic-Antimycotic (100X)는 Gibco (USA) 제품을 사용하였다. COX-2, iNOS, β -actin 항체는 Abcam (USA)에서 구입하여 사용하였으며, COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 primer는 제노텍(Korea)에서 제작하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 microplate reader와 PCR은 Bio-rad (USA) 제품을 사용하였으며, Chemi-Doc은 Atto (AE-9300, Japan) 제품을 사용하였다.

2.2. 항염증 효과 평가

2.2.1. 세포배양

ATCC에서 구매한 RAW 264.7 (mouse macrophage) 세포를 10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM으로 배양기에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

2.2.2. 세포독성측정

본 실험에서 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 유효 농도를 결정하기 위해 세포독성측정(MTT assay)을 진행하였다. RAW 264.7 세포를 10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM으로 배양기에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 배양된 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 각각 5×10^4 cells/well로 접종하고 6 h 배양하였다. 동일 배지로 교체한 후 시료를 농도별로 희석하여 처리한 후 24 h 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 5 mg/mL MTT 용액과 10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM을 혼합하여 세포에 10 μ L씩 처리한 후 3 h 배양하였다. Demethyl sulfoxide (DMSO) 100 μ L 넣은 후, 15 min 교반한 후 microplate reader (Model 680, Bio-rad, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3. NO 측정

RAW 264.7 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 배양기에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양한 후 96 well plate에 5×10^5 cells/well로 접종하고 세포가 바닥에 80% 이상 자랄 때까지 배양한다. 동일 배지로 교체한 후 시료를 농도별로 희석하여 처리한 후, 30 min 배양한 뒤 1 μ g/mL LPS (Milipore, USA)를 처리한 후 24 h 배양하였다. 배양액 100 μ L에 Griess reagent system (Promega, USA) 시약을 50 μ L씩 처리한 후, 15 min 반응시킨 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.4. RT-PCR

RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/well로 60 mm cell culture dish에 분주하여 24 h 배양한 후에 시료와 10 μ g/mL LPS를 처리하여 16 h 배양하였다. 세포를

Table 1. The Primers for PCR Analysis

Name	Forward	Reverse
COX-2	GGA GAG ACT ATC AAG ATA GTG ATC	ATG GTC AGT AGA CTT TTA CAG CTC
iNOS	CAT GGC TTG CCC CTG GAA GTT TCT CTT CAA AG	GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG CCA TCG
TNF- α	GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C	ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G
IL-1 β	TTG ACG GAC CCC AAA AGA TG	AGA AGG TGC TCA TGT CCT CA
IL-6	GTT CTC TGG GAA ATC GTG GA	TGT ACT CCA GGT AGC TAT GG
β -actin	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C	TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G

RNeasy mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 RNA 추출한 후, PrimeScript RT-PCR kit (Takara, Japan) 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 사용하여, 94 °C에서 3 min 반응시킨 후, 94 °C에서 30 s 동안 denaturation 시키고, 50 ~ 63 °C에서 1 min annealing 시킨 다음, 72 °C에서 1 min 동안 extension시키는 cycle을 30회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72 °C에서 1 min 동안 PCR machine에서 수행하였다. 각 PCR 생성물은 2% 아가 로즈 겔에 로딩하여 100 V 조건에서 30 min 동안 전기 영동을 통하여 분석하였다. 각각의 프라이머의 염기서 열은 Table 1과 같다.

2.2.5. Western Blot Analysis

RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/well로 60 mm cell culture dish에 분주하여 24 h 배양한 후에 시료와 1 μ g/mL LPS를 처리하여 16 h 배양하였다. 세포를 PRO-PREP protein extraction solution (Intron biotechnology, Korea)으로 용해하고 원심분리한 후, 여기서 얻은 상층액을 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동 하고 PVDF membrane으로 이전시켰다. 5% skim milk 가 함유된 tris 완충용액으로 1 h blocking한 후, COX-2, iNOS, β -actin 1차, 2차 항체와 각각 반응시켰다. 반응 후 Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, USA)를 이용하여 1 ~ 3 min 반응시킨 후 Chemi-Doc을 이용하여 현상하였다.

2.2.6. 통계분석

본 실험의 통계처리는 Minitab 17을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 실험군의 간의 결과는 2-표본 t 검정을 사용하여 분

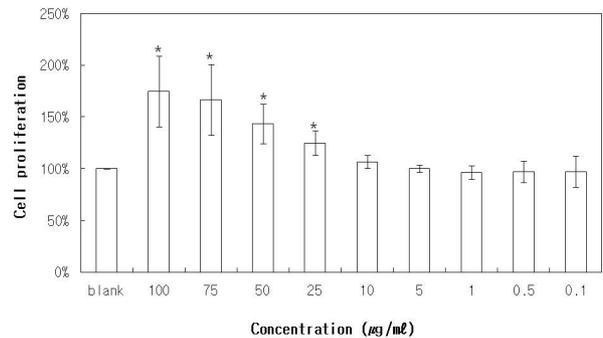


Figure 1. Cell viability of *F. sachalinensis* fruit extract on RAW 264.7 macrophages cells by MTT assay. The cells were treated various concentrations of samples. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ compared with control.

석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준($p < 0.05$)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항염 효과

3.1.1. 세포독성결과

왕호장 열매 추출물의 세포 독성측정과 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 시행하였다. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 측정된 결과, 100 μ g/mL 이하의 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타났다(Figure 1).

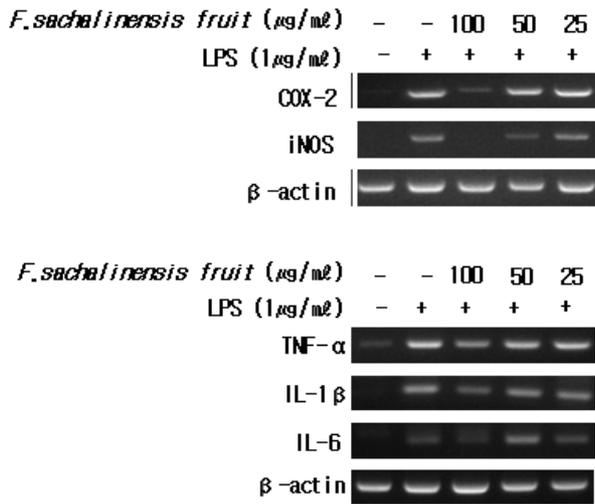


Figure 2. Effect of *F. sachalinensis* fruit extract in the expression of COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 gene in the LPS-induced RAW 264.7 macrophages cells. Cells were treated for 16 h with *F. sachalinensis* fruit (25, 50, 100 μ g/mL) during LPS (1 μ g/mL) activation. The mRNA levels of COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and β -actin were determined by RT-PCR from total RNA extracts.

3.1.2. 전구 염증 매개 Cytokine 유전자 발현에 미치는 영향

IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 초기 염증성 사이토카인으로서 염증진행에 매우 중요한 역할을 한다. RAW 264.7 세포에서 염증 매개 cytokine의 생산과 그 유전자의 발현에 미치는 영향을 측정된 결과, LPS로 자극한 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA 발현량이 현저하게 증가하였으며, 왕호장 열매 추출물을 처리한 실험군에서 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 2).

3.1.3. NO 생성량 측정

왕호장 열매 추출물의 NO 생성 억제에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포를 이용하여 NO 생성 억제 효과를 측정하였다. 대식세포를 이용한 NO 생성 정도를 통해 염증 억제 작용을 확인할 수 있으며, 대식세포의 NOS는 항상 존재하는 것이 아니라, 여러 사이토카인이나 내독소의 영향을 받아 생성되는 것이므로 이를 확인하고자 하였다. 왕호장 열매 추출물을 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 각각 처리한 실험군의 세포 배양액을 가지고 NO 생성량을 측정된 결과 농도 의존적으로 NO 생성이 저해됨을 확인하였다(Figure 3).

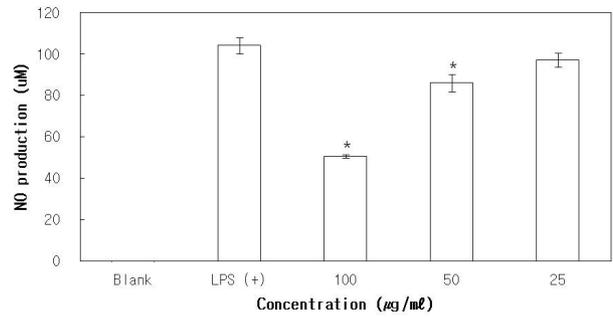


Figure 3. Effect of *F. sachalinensis* fruit extract on LPS-induced NO production in RAW 264.7 macrophages cells. The cells were treated various concentrations of samples. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ compared with control.



Figure 4. Effect of *F. sachalinensis* fruit extract on LPS-induced COX-2 and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages cells. Cells were treated for 20 h with *F. sachalinensis* fruit (25, 50, 100 μ g/mL) during LPS (1 μ g/mL) activation. Cell lysates were prepared and the protein levels of COX-2, iNOS, and β -actin were determined by western blotting.

최고 농도인 100 μ g/mL의 농도에서 약 51% NO 생성이 저해되는 것으로 확인되었다.

3.2.4. COX-2와 iNOS의 발현 저해 효과

LPS 처리 시 대식세포 표면에 있는 TLR-4 (Toll like receptor-4)에 의해 활성화되어 발현되는 염증성 효소인 iNOS와 COX-2의 발현억제를 통한 항염증 효능을 확인하기 위해 western blotting을 수행하였다.

먼저, 왕호장 열매 추출물에 대한 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 확인한 결과, 농도 의존적으로 발현을 억제하는 것으로 확인하였으며(Figure 2), iNOS와 COX-2의 단백질 발현 역시 모두 왕호장 열매 추출물에 의해 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다(Figure 4).

4. 결 론

본 연구에서는 왕호장 열매 추출물을 화장품의 항염증 소재로 이용하고자 항염증 효과를 측정하고, 그 작용기전에 대해 확인하였다. 왕호장 열매 추출물을 RAW 264.7 세포를 이용하여 항염증 효과를 측정한 결과, 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제하였으며 iNOS 발현 억제를 통해, NO 생성 능력이 저하되어 염증 반응을 억제하였다. 또한, COX-2의 발현 억제 효능 역시 염증 반응을 완화시키는 것으로 사료된다.

이상의 결과 보아 왕호장 열매 추출물은 화장품에서 항염증 및 피부 진정 소재로의 활용가치가 있는 것으로 판단되며, 앞으로 임상 수준에서 안정성 및 효능 연구를 진행할 예정이다.

Acknowledgement

본 연구는 지식경제부 월드 클래스 300 R&D 지원사업(한국콜마, 국내 자생식물 대량 정제 기술을 이용한 기능성 한방화장품 개발, No. 10043192) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

1. K. A. Hogquist, T. A. Baldwin, and S. C. Jameson, Central tolerance: learning self-control in the thymus, *Nat. Rev. Immunol.*, **5**(10), 772 (2005).
2. B. H. Kim, Y. T. Lee, and K. H. Kang, *Codonopsis Lanceolata* inhibits inflammation through regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, *Korean J. Oriental Physiology and Pathology*, **24**(1), 80 (2010).
3. T. H. Oh, Ph. D. Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2011).
4. W. S. Choi, H. S. Kwon, R. H. No, G. P. Choi, and H. Y. Lee, Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**(4), 303 (2013).
5. M. J. Park and J. H. Jeong, *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells, *J. FOOD Sci. Nutr.*, **14**, 269 (2009).
6. D. Hwang, B. C. Jang, G. Yu, and B. Mary, Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide, *Biochem. Pharmacol.*, **54**(1), 87 (1997).
7. Y. H. Seo, O. H. Kang, D. Y. Kwon, J. S. Lee, and J. H. Han, Study on the anti-inflammatory effect of Jakyak-tang water extract, *Korean J. Oriental & Pathology*, **25**(3), 503 (2011).
8. M. E. Assar and J. Angulo, Oxidative stress and vascular inflammation in aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 380 (2013).