

백출 용매추출 방법에 따른 항산화 활성 및 항염증 효과

오희경[†]

장안대학교 건강과학부 바이오동물보호과, 교수
(2021년 11월 30일 접수: 2021년 12월 25일 수정: 2021년 12월 27일 채택)

Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Atractylodes japonica* According to Extract Methods

Hee-Kyung Oh[†]

Department of Bio-animal care, Jangan University, Samcheonbyeongma-ro 1182, Korea
(Received November 30, 2021; Revised December 25, 2021; Accepted December 27, 2021)

요약 : 백출(*Atractylodes japonica*)은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 식물로 한국에서 이노 작용, 수렴작용, 항알러지, 신경보호, 항암, 면역증강 및 위장관 보호효과 등으로 민간요법에서 널리 사용되고 있다. 백출의 열수 및 70% 에탄올 추출물에 대한 DPPH 및 ABTS 자유라디칼 소거능으로 항산화 활성을 측정하였다. 게다가 NO 생성, iNOS와 COX-2 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 측정하였으며, 염증성 사이토카인의 발현을 RT-PCR 방법으로 측정함으로써 항염증 효과를 측정하였다. 열수 및 70% 에탄올 추출물의 항산화 활성은 농도-의존적인 효과를 보였지만, 추출용매에 따른 차이는 나타나지 않았다. 70% 에탄올에 의한 백출 추출물에서 매우 강한 NO 활성 억제효과를 보였다. 백출 열수 및 에탄올 추출물은 NO 생성에 관여하는 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 현저히 감소시켰다. 열수 및 70% 에탄올 추출물 모두 염증성 사이토카인인 IL-6 및 IL-1b는 현저히 억제시키지만, TNF- α 의 발현은 약하게 억제시키는 결과를 얻었다. 본 연구를 통하여 백출 70% 에탄올 추출물이 NO 생성을 현저히 억제하며, 염증성 사이토카인의 발현을 현저히 감소시키는 효과를 보이므로 염증성 질환 치료 및 개선에 널리 사용될 수 있으리라 생각한다.

주제어 : 백출, 추출용매, 항산화효과, 항염증효과, 염증성 사이토카인

Abstract : *Atractylodes japonica* has been widely used in a traditional Korean herbal medicine exerting various pharmacological activities such as diuretic action, asriction, anti-allergy, neuroprotective activity, anti-cancer, immunomodulation and gastrointestinal protective effect. This study was to investigate the antioxidant, nitric oxide and inflammatory cytokines production of *A. japonica* extract by water and 70% ethanol. DPPH and ABTS free radical scavenging activity were increased in a dose-dependent manners with both extracts and there was no difference with extract solvents. 70% ethanol extract of *A. japonica* showed a very strong inhibitory effect on NO

[†]Corresponding author
(E-mail: hkoh@jangan.ac.kr)

production. Both extracts of *A. japonica* significantly reduce the expression of iNOS and COX-2 proteins involved in NO production. *A. japonica* extract by water and 70% ethanol inhibited LPS-induced proinflammatory cytokines such as IL-6 and IL-1b. In this study, 70% ethanol extract of *A. japonica* significantly suppresses LPS-induced NO and inflammatory cytokine production. Therefore it can be widely used to treat and improve inflammatory diseases.

Keywords : *Atractylodes japonica*, extract solvents, antioxidant effect, anti-inflammatory effect, Inflammatory cytokines

1. 서론

생체 내에서 산화적 스트레스로 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포에 산화적 손상을 일으키고, 각종 성인병의 원인을 야기하게 된다. 체내에서 활성산소종은 각종 세포 등의 여러 대사과정에서 생성되고 조절되는데, 세균 감염, 화학물질 및 체내 조직에 물리적 충격에 의해 과도한 활성산소종이 생성된다[1]. 과도하게 생성된 활성산소종의 일종인 nitric oxide (NO)는 염증반응을 촉진시킨다. 특히, 혈액 및 생체 내 여러 조직에 주로 분포되어 있는 대식세포는 병원체나 감염체들을 인지하여 염증인자인 NO, interleukin(IL)-1b, tumor necrosis factor (TNF)-a 등의 염증성 사이토카인 및 염증 관련 단백질인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)를 분비하여 인체의 항상성을 조절한다[2,3]. 하지만, 지속적인 염증 반응은 조직의 손상 및 발열 등의 증상을 유도하고 관절염, 동맥경화 및 암 등을 일으킨다고 보고되고 있다[4,5]. 이와 관련하여 지금까지 활성산소종에 의한 체내 조직 손상을 보호하는 생리활성 성분 중심으로 연구가 이루어지고 있으며, 천연자원에 함유되어 있는 여러 생리활성 성분들이 보고되고 있다.

백출(*Atractylodes japonica*)은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 식물로 중국 및 한국을 포함한 동아시아에 널리 분포되어 있으며, 백출의 약리작용으로는 위장관 손상 억제, 항염증, 항산화, 면역조절과, 간 보호 및 항관절염 효과 등이 알려져 한의학 및 민간요법으로 비위와 관련 질환 및 혈압강하, 항염증억제 및 이노제 등으로 사용되어 왔다[6,7,8,9,10].

백출에 포함되어 있는 생리활성 물질의 구조 및 활성에 대한 연구가 많이 보고되고 있으며 백

출에는 정유성분, 아미노산, 비타민류, 수지류 등의 다양한 성분 외에 polyacetylene, polysaccharide, sesquiterpene, phenylpropanoid, coumarin 성분들이 알려져 있다[11-15]. 특히 atractylenolide I 과 II는 lipopolysaccharide (LPS)에 의해서 유도된 대식세포인 Raw 264.7 세포뿐만 아니라 미세아교세포인 BV-2 세포에서도 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다[16,17]. 그 외에 백출에는 신경보호, 항암, 항산화효과를 나타내는 다양한 성분들이 보고되었다[18-22]. 최근에는 백출 추출물에 유산균을 이용한 발효 추출물을 만들어서 장 점막 투과성 개선 효과 및 항염증 효과에 대한 연구도 이루어져 있지만[23]. 추출 용매에 따른 항염증 효과에 대한 연구는 미비한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 백출을 열수와 70% 에탄올용매에서 추출한 백출 추출물의 DDPH 및 ABTS를 이용한 항산화 활성과 NO 생성 및 NO 생성과 관련된 단백질인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2) 발현 및 염증성 사이토카인 발현을 비교해 추출 용매에 따른 항염증 효과를 검증하였다. 본 연구는 백출의 추출용매에 따른 생리활성의 차이를 규명하여 건강기능성 소재로 활용하기 위한 기초 연구로 제공하고자 실시하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 백출(*A. japonica*)은 충청북도 제천 지역에서 자생하여 건조시킨 백출을 구입하여 사용하였다. 시약으로 사용한 ethanol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 비타민 C, Folin reagent, sodium carbonate(Na₂CO₃), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic

acid) diammonium salt(ABTS) 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 특급시약을 구입하여 사용하였다. 세포염증 측정에 사용된 FBS(fetal bovine serum)는 Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), DMEM 배지는 Cellgro Mediatech(Mediatech Inc., USA)와 MTT assay kit는 Roche company(South Sanfransico, USA)에서 구입했다. NO 생성저해 효과 측정에 사용된 lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA), Griess reagent(Nitric Oxide detection kit)는 iNtRON(Korea)에서 구입하여 이용하였다. 실험에 사용된 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행으로부터 구입하여 이용하였다. 웨스턴 블롯(Western blot)에 사용된 COX2 Rabbit antibody와 iNOS rabbit antibody는 각각 Cell signaling(USA)과 Abcam(USA)에서 구매하였다.

2.2. 시료추출

건조 백출 100 g을 증류수 1,000 mL에 넣고 90°C에서 12시간씩 가열 환류하면서 3회 추출하여 열수 추출물을 얻었다. 건조 백출 100 g을 70% ethanol 1,000 mL을 가한 후 실온에서 12 시간동안 3회 반복하여 추출하였다. 시료의 열수 및 70% 에탄올 추출물은 여과 한 뒤 수욕 상에서 회전식감압농축기(N-1000S-W, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조기(Bondiro Vacuum Freeze-Dryer, Ilshin Lab Co., Ltd, Seoul, Korea)에서 건조 후 수분을 완전히 제거하였다. 건조된 추출물을 -70°C 냉동고에서 보관하였다.

2.3. DPPH free radical 소거활성

백출 열수 및 70% 에탄올 추출용액을 농도별로 제조하여 각 농도에 해당하는 추출용액 40 μ l를 96 well plate에 넣고 200 μ M 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 160 μ l를 일정하게 96 well plate에 첨가한다. 37°C 암실에서 30분 동안 방치하여 양이온 radical을 형성시킨 후 517 nm에서 흡광도는 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다[24]. 대조구는 비타민 C를 사용하여 측정하였으며, DPPH radical 소거활성은 100-[(시료첨가구에 대한 흡광도/시료무첨가구에 대한 흡광도)X100] 으로 나타내었다.

2.4. ABTS radical 소거활성

백출 추출물의 ABTS radical 소거활성을 측정하기 위해 먼저 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 용액과 2.6 mM potassium persulfate 용액을 만들고, 두 용액을 1:1로 희석하여 24시간 동안 암실에서 반응시킨다. 백출 열수 및 70% 에탄올 추출용액을 농도별로 제조하여 각 농도에 해당하는 추출용액 50 μ l를 e-tube에 넣고, 희석한 ABTS 용액 950 μ l을 첨가하여 교반한 후 암실에서 10분간 방치시킨 뒤 흡광도는 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 732 nm에서 측정하였다[25]. 양성 대조군으로는 L-비타민 C를 사용하였고 ABTS radical 소거활성은 100-[(시료첨가구에 대한 흡광도/시료무첨가구에 대한 흡광도)X100] 으로 나타내었다.

2.5. 세포 독성 시험

실험에 사용한 대식세포주(mouse macrophage Raw 264.7)는 10% FBS와 0.5% penicillin와 streptomycin이 첨가된 DMEM배지를 이용하여 37°C에서 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 백출을 열수와 70% 에탄올로 추출한 백출추출물의 세포독성은 EZ-Cytox 시약을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 96 well culture plate에 4.0 \times 10⁴ cells/well이 되도록 Raw 264.7 세포를 분주하여 12시간 동안 균일하게 배양 후 상층액을 제거하고 각 시료의 농도별로 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well에 EZ-cyox assay reagent를 10 μ L씩 처리하여 37°C 에서 1시간 동안 배치한 후 450nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2.6. NO 생성 저해 효과

24 well plate에 2 \times 10⁵ cells/mL이 되도록 Raw 264.7 세포를 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 대식세포 배양 후 열수와 70% 에탄올로 추출한 백출 추출물의 농도별로 시료를 처리하고 1시간 뒤 lipopolysaccharide(LPS)를 100 ng/mL의 농도로 첨가하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양 상등액 100 μ L를 취하여 Griess reagent를 1:1 비율로 첨가하여 10분 동안 반응 시킨 후 570nm에서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를

측정하였다.

2.7. 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)

RAW 264.7 cell을 6 well culture dish에 4×10^5 /well 이 되도록 분주하고 12시간 동안 균일하게 배양하였다 그 후 LPS(100ng/mL)와 추출물을 농도별(125, 250, and 500 ppm)로 1ml씩 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 $1 \times$ cold PBS buffer로 1회 세척한 후 각 well에 Trizol(MRCgene, USA)을 1mL 처리한 후 e-tube에 옮겨 chloroform(daegeong, korea)을 200 μ l 넣어주었다. 10초간 vortexing한 뒤 상온에 10분간 방치 후 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 다른 e-tube에 옮긴 뒤 동량의 isopropanol(Daegung, Korea)을 넣어준 후 15000rpm에서 10분 원심분리 하였다. 상층액을 제거 후 70% ethanol(Millipore, USA) 500 μ l를 넣고 원심분리하였다. 상층액을 제거한뒤 상온에서 30분간 건조시켰다. RNA는 RNase free water에 현탁 후 정량하였다. mRNA발현을 비교하기 위해 정량 중합 효소 반응을 이용하였다. AccuPower® CycleScript RT PreMix(bioneer, korea)를 이용하여 cDNA로 합성 후 AccuPower® PCR PreMix (bioneer, korea)에 16 μ l RNase free water와, primer 2 μ l, cDNA 2 μ l를 넣고 95°C에서 30초, 57°C에서 30초 후에 72°C에서 30초를 27 cycle로 PCR한 후 전기영동 하였다. PCR반응에 사용된 Forward와 reverse primer는 Table 1에 정리하였다.

2.8. 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)

RAW 264.7 cell을 6 well culture dish에 4×10^5 /well이 되도록 분주하고 12시간 동안 균일하

게 배양하였다. cold $1 \times$ PBS로 1회 세척한 후 농도별로 cell을 harvest하여 1,000 rpm, 5 min로 원심분리한 후 상층액을 버리고 cell pellet을 회수하였다. PROPREP(iNtRON, korea)를 100 μ l넣고 현탁하여 단백질을 추출하였다. 15,000 rpm, 10 min 원심분리 한 뒤 상층액을 새로운 e-tube에 옮긴 후 BCA assay(Thermo fisher, USA)를 이용하여 정량하였다. 동량의 단백질을 5 X sample buffer(ELPIS, Korea)를 이용하여 염색 후 100°C에서 10min동안 boiling 하였다. sample을 8 % SDS-PAGE에 전기영동 한 후 PVDF membrane(Millipore, USA)에 transfer하였다. Membrane을 3 % skim milk로 2 시간 blocking한 후 4°C에서 12시간 동안 1차 항체를 반응시켰다. $1 \times$ TBST로 3회 세척 후 1시간 동안 2차 항체 반응 후 다시 $1 \times$ TBST로 3회 세척한 뒤에 ECL detection(Biorad, USA)으로 현상 확인하였다.

2.9. 통계처리

본 실험군 간의 통계학적 분석은 IBM SPSS statistic ver. 22를 이용하였다. 각 시료에 대한 유의성은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행 한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 여부를 판단하였다. 측정값은 실험군 당 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균치와 표준편차로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH radical 소거활성

추출용매에 따른 백출 추출물의 DPPH radical

Table 1. The primers used in polymerase chain reaction experiment

name	F/R	sequence	size
GAPDH	F	5'-ATGACCACAGTCCATGCCAT-3'	417
	R	5'-CCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'	
IL-1B	F	5'-AGGAGAACCAAGCAACGACAA-3'	499
	R	5'-AGGCAAGGAGGAAAACACAGG-3'	
IL-6	F	5'-CACGGCCTTCCTACTTCA-3'	643
	R	5'-GTCCACAAACTGATATGCTTAGG-3'	
TNF- α	F	5'-AGGTCAATCTGCCCAAGTACT-3'	370
	R	5'-ACCACTCTCCCTTTGCAGAA-3'	

Table 2. DPPH radical scavenging of *A. japonica* extract by water and 70% ethanol (%)

Extract solvent	Concentration($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Water	3.38 \pm 0.64 ^a	10.99 \pm 1.45 ^c	26.84 \pm 1.17 ^b	56.12 \pm 0.76 ^a
70% ethanol	4.43 \pm 0.27 ^d	11.22 \pm 1.66 ^c	34.27 \pm 0.05 ^b	58.91 \pm 0.02 ^a
Vit. C	56.92 \pm 5.61 ^c	71.56 \pm 5.55 ^b	82.92 \pm 2.73 ^a	90.76 \pm 0.35 ^a

¹⁾Mean \pm SD

²⁾Values represent an average of three determinations.

³⁾Means in the row(a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Table 3. ABTS radical scavenging of *A. japonica* extract by water and 70% ethanol (%)

Extract solvent	Concentration($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Water	21.39 \pm 0.81 ^d	30.69 \pm 1.32 ^c	43.57 \pm 0.57 ^b	62.89 \pm 0.4 ^a
70% ethanol	23 \pm 0.81 ^d	31.64 \pm 1.68 ^c	47.74 \pm 0.79 ^b	64.43 \pm 0.47 ^a
Vit. C	48.77 \pm 0.78 ^d	64.31 \pm 0.58 ^c	94.16 \pm 0.02 ^b	94.3 \pm 0.12 ^a

¹⁾All values are expressed as mean \pm SE of triplicate determinations.

²⁾Means in row(a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

소거활성은 Table 2와 같다. 추출용매에(열수, 에탄올) 따른 백출 추출물의 DPPH radical 소거활성은 양성대조군으로 사용한 비타민 C보다는 약하지만, 농도의존적인 DPPH radical 소거활성을 보였다($p < 0.05$). 추출용매의 효과를 비교한 결과, 열수 및 70% 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거활성의 차이는 나타나지 않았다.

3.2. ABTS radical 소거활성

추출용매에 따른 백출 추출물의 ABTS radical 소거활성은 Table 3과 같다. 백출 열수 및 에탄올 추출물의 ABTS radical 소거활성은 양성대조군으로 사용한 비타민 C보다는 약하지만, 농도의존적인 ABTS radical 소거활성을 보였다($p < 0.05$). 추출용매의 효과를 비교한 결과, DPPH와 같이 열수 및 70% 에탄올 추출물의 ABTS radical 소거활성의 차이는 나타나지 않았다.

3.3. 세포독성

추출용매에 따른 백출 추출물의 농도별(250,

500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$)로 세포독성을 RAW 264.7 세포에서 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. 백출 열수 및 70% 에탄올 추출물에서는 세포독성이 나타나지 않으며, 오히려 70% 에탄올 추출물에서는 약한 세포 증식 효과가 나타난다. 250~1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 백출 열수 및 에탄올 추출물은 세포생존을 변화에 유의한 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 70% 에탄올 추출물의 경우, NO 생성은 500 ~ 2000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 측정하였으며, iNOS 및 COX-2 발현, 염증성 사이토카인의 분석에는 실험을 125~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 범위에서 진행하였다.

3.4. NO 생성 억제

추출용매에 따른 백출 추출물의 항염증 효과 실험을 위해 LPS로 염증이 유도되어 NO 생성이 증가된 RAW 264.7 세포에 추출물을 농도별(500 ~ 2000 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 대식세포에 LPS를 처리하지 않은 상태에서 1.6 μM 농도로 NO가 생성되지만, LPS를 처리하면 NO 생성이 12.5 μM 농도로 현저히

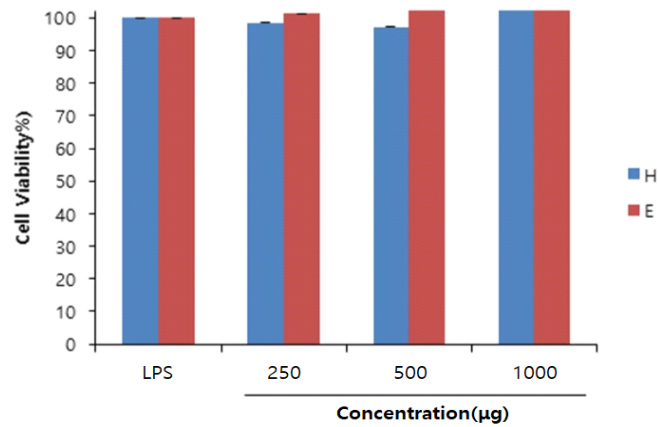


Fig. 1. Cytotoxicity of *A. japonica* extract by water and 70% ethanol against RAW 264.7 cell stimulated with LPS.

¹⁾Values are means \pm SE.

²⁾Values represent an average of three determinations

W; water extract of *A. japonica*

E; ethanol extract of *A. japonica*

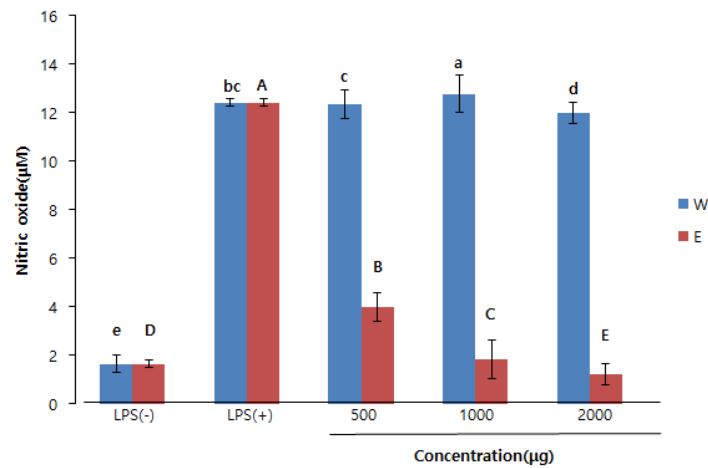


Fig. 2. Inhibitory activity of *A. japonica* extract by water and 70% ethanol on NO production.

¹⁾Values are means \pm SE.

²⁾Values represent an average of three determinations.

³⁾_{a-e, A-E} Values with different superscripts indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's test.

W; water extract of *A. japonica*

E; ethanol extract of *A. japonica*

증가하는 것을 알 수 있다. 500 ~ 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 NO 생성 억제효과를 측정한 결과 열수 추출물에서는 거의 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약한 NO 생성 억제효과를 보이지만, 70% 에탄올 추출물에서는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 NO 생성이 4.0 μM 농도로 매우 강한 억제 효과를 보였다. 따라서 70% 에탄올 추출물의 농도를 낮추어서 수행한 결과, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NO 생성이 억제되는 것을 관찰되었다. 본 연구 결과와 유사하게 Han 등 [10]도 백출 열수추출물에서는 NO 억제효과가 나타나지 못한 반면에 열수추출물을 유산균으로 발효시킨 발효백출추출물에서 23%의 약한 NO 억제 효과를 보였다. 70% 에탄올 추출물의 NO 생성 억제 효과가 유산균 발효 백출추출물보다 우수한 것을 확인하였다. 최근에 백출에서 분리한 물질인 Atractylenolide I과 II는 LPS에 의해 유도된 염증반응을 억제한다고 보고하였는데, atractylenolide I의 경우 대식세포에서 50% NO 억제효과가 29.7 μM (약 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 농도에서 나타나며, atractylenolide II의 경우, 50% 억제효과가 71.6 μM (약 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 해당) 농도에서 나타난다고 보고하였다[23]. 백출에서 Atractylenolide I의 함량이 0.954% 라고 Yun 등 [26]이 보고하였다. 따라서 백출 70% 에탄올 추출물은 Atractylenolide I 이상의 항염증 효과를

나타낸다고 판단된다.

본 실험에서 매우 높은 농도의 열수추출물에서 NO 생성 억제 효과는 약한 억제효과가 나타났으며 NO 생성과 관련된 iNOS와 COX-2의 발현을 각각의 추출물로 비교해 보았다. 열수 추출물에서 NO 생성 억제 효과가 잘 나타나지 않았지만, iNOS와 COX-2의 발현은 현저히 감소시키는 결과를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다(Fig 3). 물론 70% 에탄올 추출물도 iNOS와 COX-2의 발현을 현저히 감소시키는 결과를 얻었다. 열수 및 70% 에탄올 추출물의 경우 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 iNOS와 COX-2 발현을 현저히 감소시키는 결과를 얻었다. 백출 열수 추출물에서 NO 생성 억제 효과가 나타나지 않지만, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하기 때문에 백출 추출물은 현저한 항염증 효과가 나타났다고 판단하였다. 이를 확인하기 위해 백출 추출물에 대한 염증성 사이토카인의 발현 여부를 확인하였다.

3.5. 염증성 사이토카인 생성 억제 효과

추출용매에 따른 백출 추출물의 염증성 사이토카인 발현 억제 효과를 측정하기 위해 LPS로 염증이 유도되어 염증성 사이토카인의 생성이 증가된 RAW 264.7 세포에 추출물을 농도별(125 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 측정한 결과는 Fig. 4

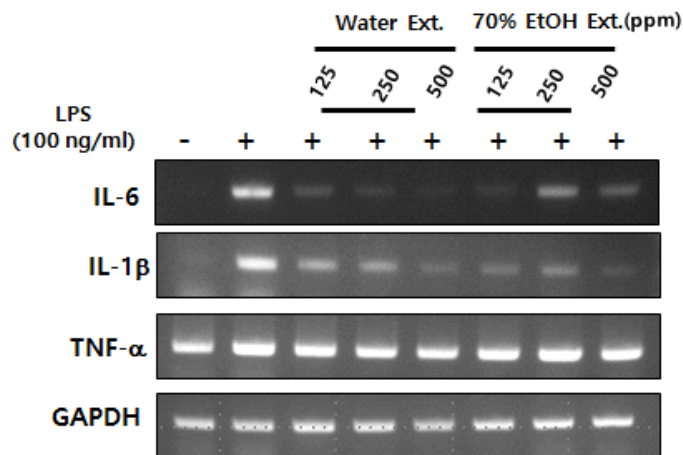


Fig. 3. The expression of iNOS and COX-2 protein by water and 70% EtOH extracts of *A. japonica* in RAW264.7 macrophages. Cells were treated with extracts for 24h. Western blot analyses were performed as described in Materials and methods. Representative blots of three experiments are shown.

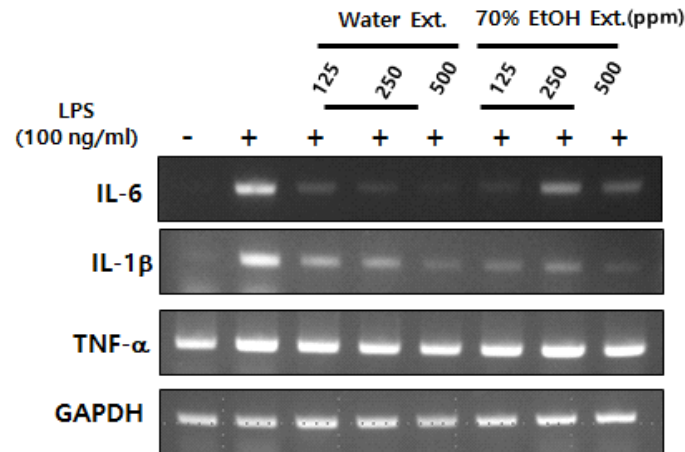


Fig. 4. Effects of extracts on the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages cells.

Cells were pre-treated with indicated concentrations of each extractor and LPS (100 ng/mL), and then incubated for 24 h.

와 같다. iNOS와 COX-2 발현을 억제하는 것처럼, 열수추출물과 70% 에탄올 추출물은 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 β 를 현저히 감소시키며, TNF- α 는 매우 약하게 억제시키는 결과를 얻었다. 따라서 백출 열수추출물과 70% 에탄올 추출물은 매우 강한 항염증 효과를 보이는 것으로 판단된다. 특히 70% 에탄올 추출물의 경우 NO 생성을 현저히 감소시킬 뿐 아니라 NO 생성을 조절하는 단백질과 염증성 사이토카인을 효과적으로 억제하였다. 따라서, NO가 과도하게 생성되어 문제가 되는 염증성 장질환, 퇴행성 뇌질환, 암 등과 같은 질환을 개선하거나 치료하는데 사용할 수 있다.

4. 결론

본 연구는 열수와 에탄올 용매에 따른 백출 추출물의 농도별로 항산화 활성, 항염증 효과 및 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 살펴보고자 진행하였다. 각각의 추출물에서 농도의존적인 DPPH 및 ABTS radical 소거활성을 보였다. 백출 70% 에탄올 추출물에서는 낮은 농도에도 매우 강한 NO 생성 억제 효과 및 NO 생성에 관련된 단백질의 발현과 염증성 사이토카인의 발현이 현저히 감소시켰다. 열수추출물의 경우

NO 생성 억제 효과는 높은 농도에서 매우 약하게 나타나지만, NO 생성에 관련된 단백질인 iNOS와 COX-2의 발현과 염증성 사이토카인의 발현을 현저히 억제하는 결과를 얻었다. 특히 70% 에탄올 추출물의 경우 NO 생성을 현저히 감소시킬 뿐 아니라 NO 생성을 조절하는 단백질과 염증성 사이토카인을 효과적으로 억제하였다. 따라서, NO가 과도하게 생성되어 문제가 되는 염증성 장질환, 퇴행성 뇌질환, 암 등과 같은 질환을 개선하거나 치료하는데 사용할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2021년 장안대학교 연구비로 이루어진 연구로 이에 감사를 포함합니다.

References

1. J. P. Kehrer, L. O. Klotz, "Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health", *Crit. Rev. Toxicol.*, Vol.45, pp. 765-798, (2015).

2. S. O. Abarikwu, "Kolaviron, a natural flavonoid from the seeds of *Garcinia kola*, reduces LPS-induced inflammation in macrophages by combined inhibition of IL-6 secretion, and inflammatory transcription factors, ERK1/2, NF- κ B, p38, Akt, p-c-Jun and JNK", *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1840, pp. 2373-2381, (2014).
3. C.C. Bain, A. M. Mowat, "Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation", *Immunol. Rev.*, Vol. 260, pp. 102-117, (2014).
4. Y. C. Liu, X. B. Zou, Y. F. Chai, Y. M. Yao, "Macrophage polarization in inflammatory diseases", *Int. J. Biol. Sci.*, Vol. 10, pp. 520-529 (2014).
5. E. H. Joe, D. J. Choi, J. An, J. H. Eun, I. Jou, S. Park, "Astrocytes, microglia, and Parkinson's disease", *Exp Neurobiol.*, Vol. 27, pp. 77-87 (2018).
6. L. S. Hoang, M. H. Tran, J. S. Lee, Q. M. Ngo, M. H. Woo, B. S. Min, "Inflammatory inhibitory activity of sesquiterpenoids from *Atractylodes macrocephala* Rhizomes", *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, Vol. 64, pp. 507-511, (2016).
7. X. Li, J. Lin, W. Han, W. Mai, L. Wang, Q. Li, et al., "Antioxidant ability and mechanism of rhizoma *Atractylodes macrocephalae*", *Molecules.*, Vol. 17, pp. 13457-13472, (2012).
8. S. W. Shin, Y. S. Lee, J. H. Park, T. K. Kwon, S.I. Suh, Y.K. Kwon, "Comparison of immunomodulatory effects of water-extracted ginseng radix, pilose asia-bell, astragali radix, *Atractylodes rhizoma alba* and *dioscoreae rhizoma*", *Korean J Orient Physiol. Pathol.*, Vol. 18, pp.1140-1146, (2004).
9. S.H. Kim, Y. K. Park, "Effect of *Atractylodes rhizoma alba* extract on collagen-induced arthritis in mice", *Korean J. Herbology.*, Vol. 27, pp. 1-6, (2012).
10. K. Han, K. Kim, J. Wang, H. Kim, "Effect of unfermented and fermented *Atractylodes macrocephalae* on gut permeability and lipopolysaccharide-induced inflammation", *J. Korean Med. Obes. Res.*, Vol. 13, pp. 24-32, (2013).
11. S. Gu, L. Li, H. Huang, B. Qang, T. Zhang, "Antitumor, antiviral, and antiinflammatory efficacy of essential oils from *Atractylodes macrocephala* Koidz produced with different processing methods", *Molecules.*, Vol. 24, pp. 2956, (2019).
12. C. M. Yao, X. W. Yang, "Bioactivity-guided isolation of polyacetylenes with inhibitory activity against NO production in LPS-activated Raw264.7 macrophages from the rhizomes *Atractylodes macrocephala*", *J. Enteropharmacol.*, Vol. 151, pp. 791-799, (2014).
13. F. Xie, K. Sakwivatkul, C. Zhang, Y. Wang, L. Zhai, S. Hu, "*Atractylodes macrocephalae* Koidz polysaccharides enhance both serum IgG response and gut mucosal immunity", *Carbohydr. Polym.*, Vol. 91, pp. 68-73, (2013).
14. Z. L. Chen, W. L. Cao, G. X. Zhou, M. Wichtl, "A sesquiterpene lactam from *Atractylodes macrocephala*", *Phytochemistry*, Vol. 45, pp. 765-767, (1997).
15. W. Peng, T. Han, Q. Liu, L. Qin, "Chemical constituents from the aerial part of *Atractylodes macrocephala*", *Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi.*, Vol. 36, pp. 578-581, (2011).
16. G. Ji, R. Chen, J. Zheng, "*Atractylenolide* I inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via itogen-activated protein kinase pathways in Raw264.7 cells", *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, Vol. 36, pp. 420-425, (2014).
17. H. G. Kim, K. W. Kim, J. Li, H. IM, D. Y. Lee, D. Yoon, J. T. Jeong, G. S. Kim, H. Oh, R. B. An, Y. C. Kim, "*Atractylenolide* II isolated from *Atractylodes macrocephala* inhibited inflammatory

- responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages and BV2 microglial cells”, *Kor. J. Pharmacogn.*, Vol. 51, pp. 244–254, (2020).
18. S. More, D. K. Choi, “Neuroprotective role of atractylenolide-I in an in vitro and in vivo model of Parkinson’s disease”, *Nutrients.*, Vol. 9, pp. 451, (2017).
 19. Y. Cheng, T. Chen, X. Yang, J. Xue, J. Chen, “Atractylon induces apoptosis and suppresses metastasis in hepatic cancer cells and inhibits growth in vivo”, *Cancer Manag. Res.*, Vol. 11, pp. 5883–5894, (2019).
 20. J. Li, F. Li, Y. Xu, W. Yang, L. Qu, Q. Xiang, C. Liu, D. Li, “Chemical composition and synergistic antioxidant activities of essential oils from *Atractylodes macrocephala* and *Astragalus membranaceus*”, *Nat. Proc. Commun.*, Vol. 8, pp. 1321–1324, (2013).
 21. J. Li, X. Chen, C. Yue, R. Hou, J. Chen, Y. Lu, X. Li, R. Li, C. Liu, Z. Gao, E. Li, Y. Li, H. Wang, H. Li, Y. Hu, “Effect of selenylation modification on immune-enhancing activity of *Atractylodes macrocephala* polysaccharide”, *Int J. Biol. Macromol.*, Vol. 72, pp. 1435–1440, (2015).
 22. K. T. Wang, L. G. Chen, C. H. Wu, C. C. Chang, C. C. Wang, “Gastroprotective activity of atractylenolide III from *Atractylodes ovata* on ethanol-induced gastric ulcer in vitro and in vivo”, *J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 62, pp. 381–388, (2010).
 23. J. H. Han, J. Kim, S. Kim, S. H. Jung, D. Kim, G. E. Kim, W. K. Whang, “Anti-oxidant compounds from the aerial of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi”, *Yakhak Hoeji.*, Vol. 51, pp. 88–95, (2007).
 24. B. R. Yun, J. B. Weon, B. Lee, J. Lee, M. R. Eom, C. J. Ma, “Quantitative analysis of Atractylenolides I and III in *A. japonica*”, *Kor J. Pharmacogn.*, Vol. 44, pp. 53–59, (2013).
 25. M. S. Blois, 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:1199–1203, (1958).
 26. R. Roberta, P. Nicoletta, P. Anna, P. Anath, Y. Min, R.E. Catherine, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 26 pp. 1231–1237, (1999).