

생물전환에 의해 생성된 Compound K의 항염증 및 독성 효과

김무성^{1,*} · 신현영² · 김현경³ · 강지성³ · 정경환⁴ · 유광원^{4,†} · 문기성^{4,†} · 이향열^{4,†}

¹마크로케어, 연구소장

²고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템융합전공, 학생

³한국교통대학교 식품생명학부, 학생

⁴한국교통대학교 식품생명학부, 교수

(2021년 11월 23일 접수: 2021년 12월 13일 수정: 2021년 12월 15일 채택)

Anti-inflammatory activity and toxicity of the compound K produced by bioconversion

MooSung Kim¹ · Hyun Young Shin² · Hyun-Gyeong Kim³ · Ji Sung Kang³
Kyung-Hwan Jung⁴ · Kwang-Won Yu^{4,†} · Gi-Seong Moon^{4,†} · Hyang-Yeol Lee^{4,†}

¹Macrocare Co., Ltd, 32, Gakri 1-gil, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungbuk,

²Department of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University,
Transdisciplinary major in Learning Health System, 145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 02841

^{3,4}Division of Food Science and Biotechnology, KNUT, 61 Daehak-ro, Jeungpyeong-gun,
Chungbuk 27909,

(Received November 23, 2021; Revised December 13, 2021; Accepted December 15, 2021)

요 약 : Compound K (20-O-β-(D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol)는 진세노사이드의 활성 성분이다. Compound K는 경구 투여 후 Rb₁, Rb₂ 및 Rc가 사람의 장내 미생물의 β-glucosidase에 의해 생물전환 과정을 거쳐 생성된다고 알려져 있다. 본 연구는 생물전환된 인삼농축액에서 얻은 compound K를 이용해 항염증 및 독성을 조사하였다. 세포독성평가 결과, compound K는 0.001~1 μg/mL의 농도 범위에서 유의적인 세포독성은 나타나지 않았으며, LPS로 염증이 유발된 RAW 264.7 세포에서 TNF-α, MCP-1, IL-6 및 NO의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 동일 농도범위에서 TNF-α 및 IFN-γ로 염증이 유발된 HaCaT 세포는 compound K의 처리로 인해 IL-8의 생성을 감소시키는 것으로 나타났지만, IL-6의 경우 일부 농도에서 생성을 감소시켰으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. Brine shrimp를 이용한 치사율 검정법에서 compound K의 LC₅₀는 0.37mg/mL로 다소의 독성을 함유하고 있는 것으로 나타났으나 compound K가 35% 고함유된 생물전환물은 LC₅₀가 0.87mg/mL로 나타나 상대적으로 낮은 독성을 보였다. 따라서 이 생성물은 향후 여드름 완화용 화장품 개발에 사용할 수 있는 매우 우수한 기능성 소재가 될 수 있을 것으로 기대된다.

[†]Corresponding author

(E-mail: kwyu@ut.ac.kr, gsmoon@ut.ac.kr, hyl@ut.ac.kr)

*These authors contributed equally: Kwang-Won Yu, Gi-Seong Moon and Hyang-Yeol Lee.

주제어 : 진세노사이드, 컴파운드 K, 생물전환, 인삼, 브라인새우 치명율 검증법

Abstract : Compound K (20-O- β -(D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol) is an active ingredient of ginsenosides. Compound K has been known to produce from biotransformation by β -glucosidase action of human intestinal microbes after oral administration of ginseng. We have investigated the cytotoxicity of compound K obtained from bio-converted ginseng extract. As a result, compound K showed no significant cytotoxicity in the concentration of 0.001 to 1 μ g/mL and inhibited the production of TNF- α , MCP-1, IL-6 and NO in RAW 264.7 cells induced by LPS inflammation. In the same concentration, HaCaT cells induced by inflammation with TNF- α and IFN- γ decreased IL-8 production due to compound K treatment. In the brine shrimp lethality assay, the LC₅₀ of compound K was 0.37 mg/mL indicating some toxicity, but the bioconverted product containing 35% compound K showed relatively low toxicity with an LC₅₀ of 0.87 mg/mL. These results suggest that the compound K enriched extract is a potential functional material for acne relief cosmetic products.

Keywords : Ginsenoside, Compound K, Bioconversion, Panax ginseng, Brine shrimp lethality assay

1. 서론

인삼 속 사포닌 성분인 진세노사이드는 항암, 항염, 항산화, 치매 및 항당뇨 등의 효능이 있는 것으로 알려져 널리 이용되었는데 큰 분자량의 Major 진세노사이드는 섭취 시 장내 미생물에 의해 당 가수분해되어 작은 분자량을 가진 minor 진세노사이드로 전환되어 흡수된다. 분자량이 작은 minor 진세노사이드는 효능이 우수한 것으로 알려져 있으며 대표적으로 항염, 독성물질에 대한 간장보호, 피부보호, 알츠하이머 예방, 항암 효능, 항알레르기 작용 등이 잘 알려져 있다[1-8]. Compound K는 진세노사이드의 활성 성분으로써 Rb₁, Rb₂ 및 Rc 등이 사람의 장내 미생물에 의해 탈당 과정을 거쳐 생성된다고 알려져 있으나[9] 사람의 체질, 장내 미생물 등에 따라 생성량이 달라 효능에 있어 차이를 보이게 된다. 또한 compound K는 여드름 원인균인 *C. acnes* KCTC 3314 균주에 대하여 항균 선택성(selectivity)이 있어 청소년을 위한 화장품의 기능성 소재로써 사용이 가능할 것으로 보인다. 이렇게 다양한 효능을 가진 compound K의 함량을 높이기 위해서는 산처리, 미생물발효, 효소 등 다양한 방법이 사용되고 있다. 특히 compound K는 자연계에 미량 존재하기 때문에 식품, 화장품, 제약 분야 등의 상업적 사용에 필요한 생산량을 얻기 위해서는 대량 생산법의 확립이 요구된다

[10-12].

최근 많은 젊은 계층의 소비자들이 고통을 겪고 있는 여드름을 저해할 수 있는 기능성화장품 개발에 적용할 수 있는 신소재에 대한 연구가 활발하다. 기존에 여드름 완화 또는 치료제로 사용되는 소재로는 과산화벤조일과 같은 살균제, 피지 분비를 억제하는 레티노이드, 각질제거 효능의 살리실산 및 폴빅산 등이 있으나 얼굴이 화끈거리고 타는 듯한 느낌 및 피부 자극성을 주는 등의 부작용이 알려져 있다. 최근 생물전환된 인삼성분인 compound K 고함유(35%) 생물전환생성물(BC)은 일반적인 피부상재균에는 낮은 항균효과를 가지나 여드름균에 대해 선택적으로 우수한 저해 효능을 갖고 있는 것으로 선행연구 결과 밝혀졌다. 특히 *C. acnes* KCTC 3314 균주에 대한 최소저해농도 측정 결과 31.25 μ g/mL로 확인되었으며, 최근 여드름균 저해 효과가 있는 홍삼 추출물로부터 발견된 신규 진세노사이드인 panaxydol과 panaxynol보다 나은 효능을 보였다 [12-13]. 본 연구에서는 효소(Plantase)를 사용하여 생리활성 성분인 compound K를 주성분으로 함유하는 생물전환 인삼추출물(35wt%) 소재[14]를 상업화 등에 활용하기 위해 염증 억제활성 및 독성효과 등을 조사하였다. 이를 위해 RAW cell 및 HaCaT 세포를 대상으로 항염증 효과 및 세포독성, brine shrimp를 이용한 치사율 측정하여 독성효과를 검증하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료 및 기기

표준물질 compound K(Sigma/Aldrich, US), Dimethyl Sulfoxide(Daejung, Siheung, Korea), RCM broth(BD, Sparks, MD), resazurin sodium salt(TCI Co. Ltd., Tokyo, Japan)는 제품을 구입하여 정제없이 사용하였다. 35% compound K 고함유 인삼추출물은 본 연구를 위해 (주)마크로케아에서 생물전환을 통해 합성하였다. 0.45 μ m 주사필터(Agela Technologies Inc., Wilmington, DE), 혐기챔버(DG250; Don Whitley, Scientific Ltd., Bingley, UK)를 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 세포주 및 배양조건

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7과 인체 유래 각질 형성 세포주인 HaCaT 세포주는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 입수하였으며, 두 세포주는 모두 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Waltham, Massachusetts, USA)과 1% penicillin-streptomycin (P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에서 배양하였다. 세포주는 37°C, 5% CO₂ 조건이 유지되는 배양기(Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)에서 2~3일에 한번씩 계대배양하여 연구에 이용되었다.

2.2.2. RAW 264.7 세포를 통한 염증 억제 활성

Compound K의 염증억제 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 이용하여 3 \times 10⁵/mL로 조정하고 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 배양기에서 약 18시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액을 모두 제거하고 serum free-DMEM (이하 SFM) 160 μ L와 적당히 희석한 시료 20 μ L를 첨가하여 30분간 배양하고 염증을 유도하기 위해 lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS; Sigma-Aldrich)를 20 μ L 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포의 독성평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Invitrogen, Eugene, OR, USA) assay를 통해

550 nm의 흡광도에서 측정하였으며, LPS 유도군에 대한 세포 생존율(cell viability, %)로 나타냈다. 한편, 염증 억제활성을 확인하기 위해 세포에서 분비한 염증매개 인자인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6) 및 산화질소(nitric oxide, NO)의 생성량을 평가하였다. 사이토카인 및 케모카인인 TNF- α 는 Invitrogen (Eugen, OR, USA)에 구입한 enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA)를 이용하여 측정하였으며, MCP-1 및 IL-6는 BD Bioscience (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 평가하였다. 사이토카인 및 케모카인의 생성량은 각각 제조사에서 제공된 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(ng/mL)을 결정하였다. 한편, 산화질소(nitric oxide, NO)의 함량은 griess assay를 통해 측정되었으며, sodium nitrate (NaNO₃)를 이용하여 표준곡선을 작성하고 μ M로 나타냈다.

2.2.3. HaCaT 세포를 통한 피부염 억제 활성

Compound K의 피부염 억제 활성을 평가하기 위해 HaCaT keratinocyte를 1 \times 10⁵/mL로 조정하고 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 배양기에서 약 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액을 모두 제거하고 SFM 200 μ L를 분주하여 24시간 동안 재배양 하였다. 배양 후 배양 상등액을 제거하고 SFM 160 μ L와 적당히 희석한 시료 20 μ L를 첨가하여 1시간 동안 배양하고 염증을 유도하기 위해 TNF- α 및 interferon- γ (T+I)가 혼합된 용액 20 μ L를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. T+I로 염증이 유도된 HaCaT 세포의 시료에 의한 독성평가는 상기 기재된 MTT assay를 이용하여 평가되었으며, T+I 유도군에 대한 세포 생존율(%)로 나타냈다. 한편, 염증억제 활성을 확인하기 위해 세포에서 분비한 염증매개 인자인 IL-6 및 interleukin-8 (IL-8)은 BD Biosciences에서 구입하였으며, 생성량은 제조사에서 제공된 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(pg/mL)으로 나타냈다.

2.2.4. Brine shrimp 치사율 측정 assay

Brine shrimp를 50% 죽이는 농도는 알려진 방법에 따라 결정되었다[15-16]. Brine shrimp eggs(디스크스코리아, KOR)를 3차 증류수 1 L에

천일염 38 g 넣어 제조된 바닷물에 넣어준다. 실온에서 48시간 배양 후 마이크로피펫으로 980 μ L 당 10-15마리를 채취하여 Cell culture plate(SPL LIFE SCIENCES, KOR)에 분주하였다. Compound K 고함량 시료 및 compound K를 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich, MD)에 용해시켜 2.0 mg/mL의 농도가 되도록 제조하였고 1.5, 1, 0.5, 0.1 mg/mL의 농도가 되도록 단계적으로 희석하였다. 비교 제품으로써 홍삼 시판 제품(정관장 홍삼정 에브리타임) 한포를 동결건조기(ilShinBioBase, KOR, FD5508)를 사용하여 분말 형태로 제조하였다. 분말을 Dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich, MD)에 용해시켜 3.0 mg/mL의 농도가 되도록 제조하였고 2.0, 1.5, 1, 0.5 mg/mL의 농도가 되도록 단계적으로 희석하였다. 각 농도로 용해되어 희석된 compound K 고함량(35wt%) 시료, compound K 및 홍삼 시판 제품(정관장 홍삼정 에브리타임)을 마이크로피펫으로 20 μ L을 취해 10-15마리가 분주된 Cell culture plate에 주입하였고 실온에서 경시적으로(6hr, 12hr, 24hr) 죽은 brine shrimp의 수를 측정하였다. 농도에 비례한 brine shrimp의 평균 치사율을 엑셀을 사용해 통계처리를 하여 그래프로 나타내었다. 치사율은 6hr, 12hr, 24hr마다 조사하였으며 최종 24hr 후 brine shrimp 50%의 치사율 농도(LC₅₀)를 결정하였다.

2.2.5. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하여 실시하였으며 결과를 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. 시료에 의한 세포독성 평가 및 염증억제 활성은 Statistical Package for the Social Science (SPSS V26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's t-test로 계산하였으며 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 유도균과의 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Compound K 처리에 따른 세포독성 평가

세포주를 이용한 염증억제 활성은 염증이 유도된 세포에서 염증매개 인자의 생성을 확인하여 시료 처리에 따른 생산 억제를 측정하는 방법으로, 세포가 사멸하게 되면 결과적으로 분비되는 인자들이 줄어들어 염증억제 활성으로 판단될 수

있기 때문에 우선 세포독성 평가를 진행하였다. Compound K 처리에 따른 RAW 264.7 세포 독성평가는 Fig. 1A에 나타냈으며, 0.1~100 μ g/mL의 농도범위에서 평가하였다. 10~100 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 유도균 대비 17.6~59.9%의 세포생존율이 확인되었으며, 비색법을 통한 세포독성 평가에서 세포생존율이 80% 이하로 나타나면 세포독성이 나타나는 것으로 판단하기 때문에 상기 농도범위에서는 유의적인 세포독성이 나타나는 것으로 확인되었다. 반면, 0.1~1 μ g/mL의 농도범위에서는 97.6~99.3%의 세포생존율이 확인되어 본 농도범위에서는 유의적인 세포독성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다. RAW 264.7 세포에 처리한 농도범위의 시료를 HaCaT 세포에 처리하였을 때, 10~100 μ g/mL의 농도범위에서는 세포생존율이 T+I 유도균 대비 9.9~10.0%로 나타나, 유의적인 세포독성이 나타났으나, 0.1~1 μ g/mL의 농도범위에서는 일부 세포생존율이 감소된 것으로 확인되었지만, 유의적인 세포독성은 보이지 않았다. 이후 두 세포주를 이용하여 0.001~1 μ g/mL의 농도범위에서 재평가 한 결과(Fig. 1C 및 Fig. 1D), 유도균 대비 유의적인 세포독성은 확인되지 않았으며 이후 동일 농도범위에서 염증억제 활성 평가를 진행하였다.

3.2. RAW 264.7 세포를 이용한 compound K의 염증억제 활성

대식세포는 선천면역계의 주요한 세포로서 면역조절에 1차적인 역할을 담당하고 있다. 또한, 체내 염증반응에 관여하는 주된 세포로 알려져 있으며[17], 과도한 염증반응의 조절은 생체보호를 위해 중요하다고 보고되고 있다[18]. 따라서 본 연구에서는 LPS를 이용하여 염증을 유발한 후, 시료 처리에 의해 생산되는 염증매개 인자인 TNF- α , MCP-1, IL-6 및 산화질소(nitric oxide: NO)를 측정하였다. TNF- α 의 억제활성 평가는 Fig. 2A에 나타냈으며, 양성대조군(positive control, PC)로 이용된 dexamethasone (50 μ g/mL) LPS 유도균(5.0 ng/mL) 1.9 ng/mL (63.7%)의 통계적으로 유의한 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Compound K의 TNF- α 억제활성을 평가한 결과, 0.001~1 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 유도균 대비 2.9~3.4 ng/mL (31.7~41.7%)의 통계적으로 유의한 TNF- α 억제활성이 확인되었으며, 고농도인 1 μ g/mL의

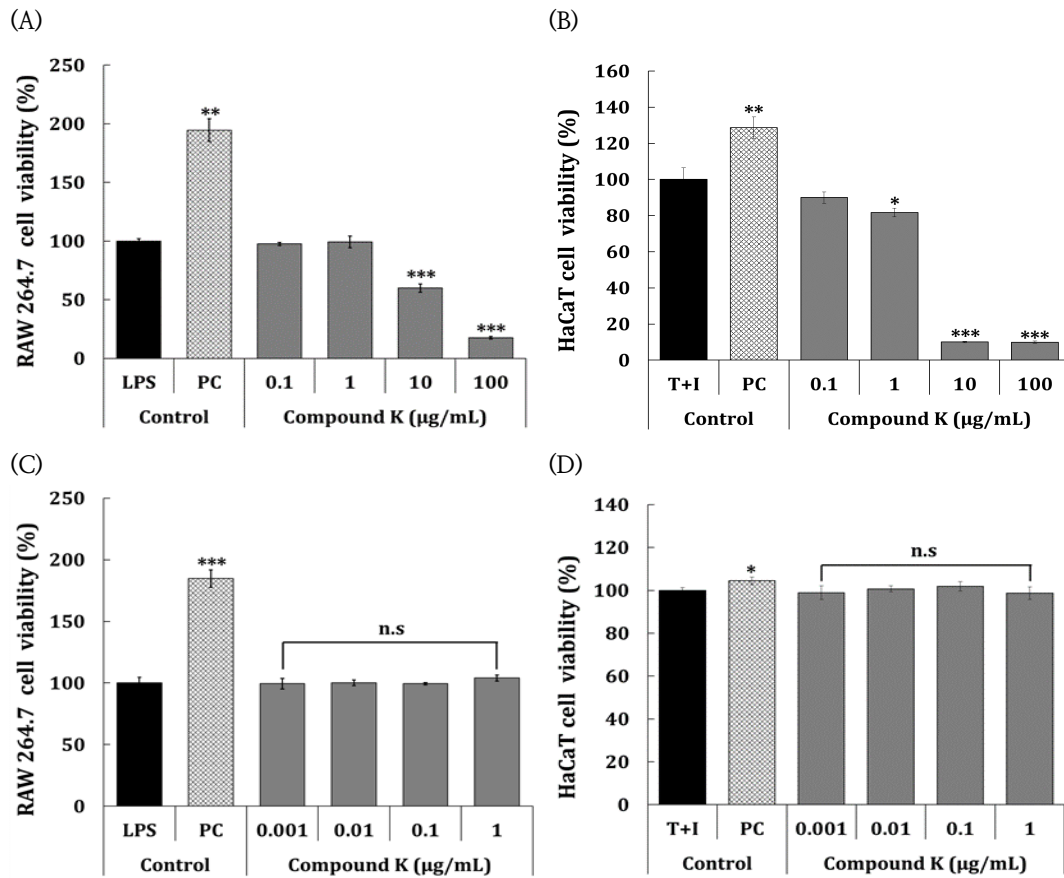


Fig. 1. Cytotoxic effect of compound K using (A) RAW 264.7 macrophage and (B) HaCaT keratinocyte. Each sample were treated to RAW 264.7 or HaCaT cells, and inflammation inducer, such as lipopolysaccharide (LPS) or TNF- α and IFN- γ (T+I) were subsequently stimulated for 24 hr. A dexamethasone (50 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for RAW 264.7 and HaCaT, respectively) was used as positive control. Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between inflammation group (LPS or T+I) and each group by Student's t-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

농도에서는 2.9 ng/mL(41.7%)의 우수한 억제활성이 나타났다. MCP-1 억제활성의 결과는 Fig. 2B에 나타났다. PC 대조군으로 이용된 dexamethasone은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 LPS 유도군(9.1 ng/mL) 대비 6.2 ng/mL(34.0%)의 통계적으로 유의한 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Compound K의 경우, 0.001~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위에서 농도-의존적인 경향의 MCP-1을 억제하는 것으로 확인되었으며, LPS 유도군 대비 3.5~7.1 ng/mL(22.8~64.2%)의 통

계적으로 유의한 활성이 확인되었다. 특히, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 LPS 유도군 대비 3.5 ng/mL(64.2%)의 우수한 MCP-1 억제활성을 나타내는 것으로 보였다. IL-6 억제활성의 결과는 Fig. 2C에 나타났다. PC 대조군으로 이용된 dexamethasone은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 LPS 유도군(10.6 ng/mL) 대비 8.9 ng/mL(15.9%)의 유의한 IL-6 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Compound K의 경우 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성은 확

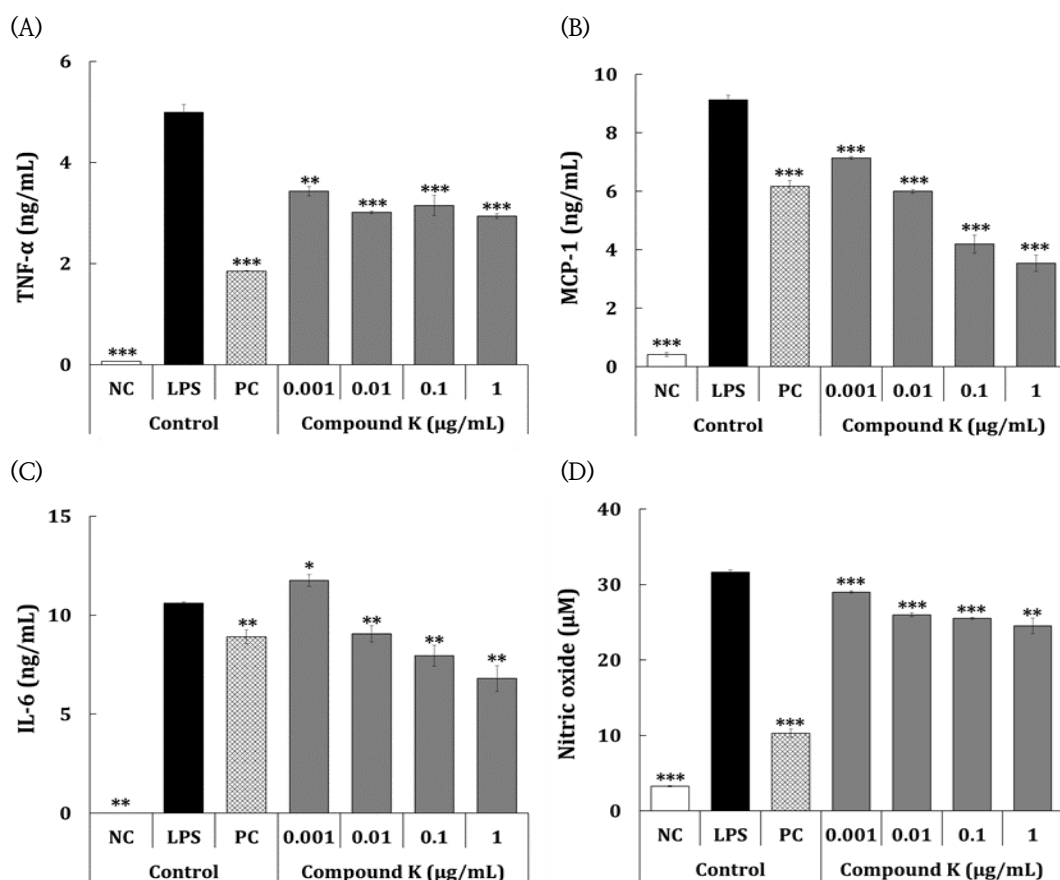


Fig. 2. Anti-inflammatory activities of compound K on LPS-stimulated RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were treated with samples followed by LPS treatment for 24 hr, and production of pro-inflammatory mediators such as (A) TNF- α , (B) MCP-1, (C) IL-6 and (D) nitric oxide (NO) were estimated. Only medium was used as negative control (NC). A dexamethasone (50 μ g/mL) or N-nitroarginine methyl ester (L-NAME; 50 μ g/mL) were used as positive control (PC) for TNF- α , MCP-1 and IL-6, or NO experiments, respectively. Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between LPS-treated group (LPS) and each group by Student's t-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

인되지 않았지만, 0.01~1 μ g/mL의 농도범위에서는 농도-의존적인 경향의 IL-6 생성을 억제하는 것으로 확인되었으며, 고농도인 1 μ g/mL의 농도에서는 LPS 유도군 대비 6.8 ng/mL(35.8%)의 우수한 활성을 나타냈다. 마지막으로 NO 억제활성의 경우 Fig. 2D에 나타냈으며, PC 대조군으로 이용된 N-nitroarginine methyl ester (L-NAME; 50 μ g/mL)는 LPS 대조군(31.7 μ M) 대비 10.3 μ M(75.2%)의 통계적으로 유의한

억제활성을 보였다. Compound K는 0.001~1 μ g/mL의 농도범위에서 농도-의존적 경향으로 NO 억제활성이 확인되었으며, LPS 유도군 대비 24.5~29.0 μ M(9.3~25.1%)의 억제활성을 나타냈다. 특히, 1 μ g/mL의 농도에서는 가장 우수한 억제활성(24.5 μ M, 25.1%)로 나타났다. Park 등[19]의 연구에서 compound K의 NO 및 prostaglandin E2의 억제활성은 보고한 바 있으며, compound K가 inhibitory half concentration

(IC 50) 값이 0.012 μ M로 나타나 대조군으로 이용된 L-NAME(IC 50: 0.037 μ M)보다 우수한 활성을 지니는 것으로 보였고, NO 생성 관련 인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (COX-2)의 발현량이 감소하는 것으로 나타나, 본 연구의 결과와 유사한 것으로 판단되었다. Compound K의 RAW 264.7 세포의 염증억제 활성의 결과를 종합해 보면, 0.001~1 μ g/mL의 낮은 농도범위에서 모든 바이오 마커의 생성이 억제되는 것으로 확인되었으며, 이를 통해 염증 관련 기능성 소재로서 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

3.3. HaCaT 세포를 이용한 compound K의 피부염 억제 활성

TNF- α 와 interferon- γ (T+I)에 의해 염증이 유발된 HaCaT 세포는 *cyclooxygenase 2*(COX 2) 및 *IL-6* 등을 생성하여 피부염을 유발하는 것으로 알려져 있으며[20], 본 연구에서는 이를 활용하여 compound K를 처리함으로써 IL-6 및 interleukin-8 (IL-8)의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. Fig. 3A는 IL-6 억제 활성을 평가하였으며, PC 대조군으로 이용된 dexamethasone은

20 μ g/mL의 농도에서 T+I 유도군(1865.0 pg/mL) 대비 781.9 pg/mL(59.6%)의 통계적으로 유의한 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Compound K의 IL-6 억제활성은 0.001~1 μ g/mL의 농도범위에서 T+I 유도군 대비 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성은 확인되지 않았지만, 0.01~0.1 μ g/mL의 농도범위에서 1806.6~1837.3 pg/mL(1.5~3.2%)의 억제활성을 보이는 것으로 확인되었다. IL-8 억제활성은 Fig. 3B에 나타냈으며, PC 대조군은 T+I 유도군(1960.1 pg/mL) 대비 916.2 pg/mL(53.6%)의 통계적으로 유의한 IL-8 억제활성이 확인되었다. IL-8의 억제활성은 활성이 미비했던 IL-6와 다른 경향으로 확인되었으며, 0.001~1 μ g/mL의 농도범위에서 T+I 유도군 대비 통계적으로 유의한 1473.8~1772.0 pg/mL(9.6~24.9%)의 IL-8의 억제활성이 나타났다. Compound K의 피부관련 기능성 효과는 많은 연구가 보고되고 있으며, 기존[21]의 연구에서 compound K를 처리함으로써, 동일 세포주와 hairless mouse에서 보습관련 *hyaluronan synthase 2* (HAS 2) 및 hyaluronan의 생성을 유의적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 He 등[22]의 연구에서 ultraviolet을 처리한

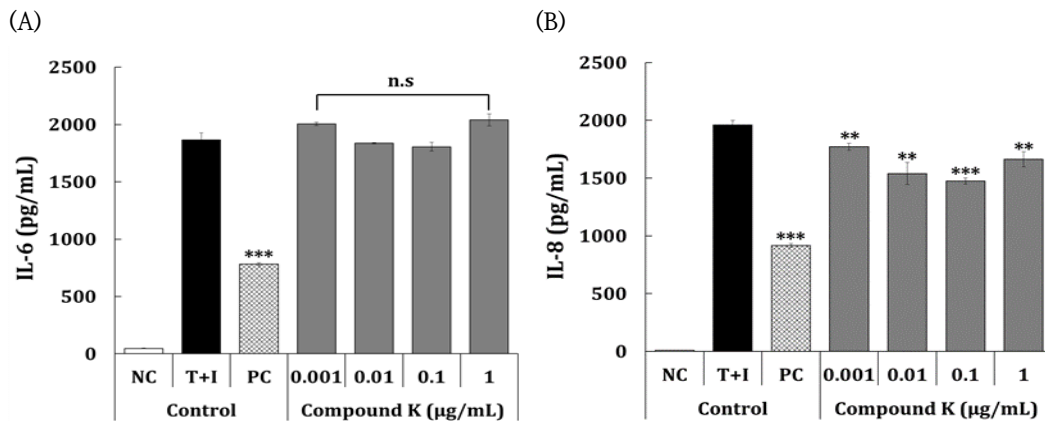


Fig. 3. Anti-inflammatory activities of compound K on TNF- α +IFN- γ (T+I)-stimulated HaCaT keratinocyte. HaCaT keratinocyte were treated with each sample followed by TNF- α +IFN- γ (T+I) treatment for 24 hr, and the production of pro-inflammatory mediators such as (A) IL-6 and (B) IL-8 were estimated. Only medium was used as negative control (NC). A dexamethasone (20 μ g/mL) were used as positive control (PC). Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between T+I-treated group (T+I) and each group by Student's t-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

fibroblast에 compound K 처리로 인해 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)이 감소하는 것으로 보였고, type I procollagen이 증가하는 것으로 나타나, 본 연구결과와 종합해 볼 때, compound K는 피부에 유익한 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 결론적으로, 세포독성을 나타내지 않은 0.001~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위에서 compound K는 두 가지 세포주에 염증억제 활성을 가지는 것으로 확인되었으며, 염증 관련 기능성 소재로서 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

3.4. Compound K 및 compound K 고함량 (35wt%) 인삼 생물전환물(BC)의 독성효과

최근, 화장품분야에서 동물실험 등이 점차 허용되지 않는 추세로써 이를 대체한 시험법의 적용이 필요하다. 본 연구에서는 brine shrimp를 이용한 독성시험법을 화장품 연구에 있어 동물시험법을 대체하는 연구 방법의 하나로 사용해 보았

다. 홍삼 시판 제품(홍삼추출물), compound K 및 compound K 고함량(35wt%) 시료(BC)를 각각 마이크로피펫으로 20 μL 취해 10~15마리가 분주된 Cell culture plate에 주입하였고 실온에서 경시적으로(6hr, 12hr, 24hr) 죽은 brine shrimp의 수를 측정하여 50%의 shrimp가 죽는 화합물의 농도(LC₅₀)를 결정하였다. 일반적으로 brine shrimp lethality bioassay법으로 측정된 화합물의 LC₅₀ 농도가 1mg/mL 이상일 경우 독성이 거의 없는 것으로 알려져 있다. Fig. 4.에서 일반 홍삼 추출물(A)의 LC₅₀는 1g/mL이상으로써 독성이 전혀 나타나지 않았으며, compound K (B)는 0.37mg/mL로 다소의 독성을 함유하고 있는 것으로 나타났으나 compound K가 35% 함유된 생물전환물(C)은 LC₅₀가 0.87mg/mL로써 비교적 낮은 독성을 보였다.

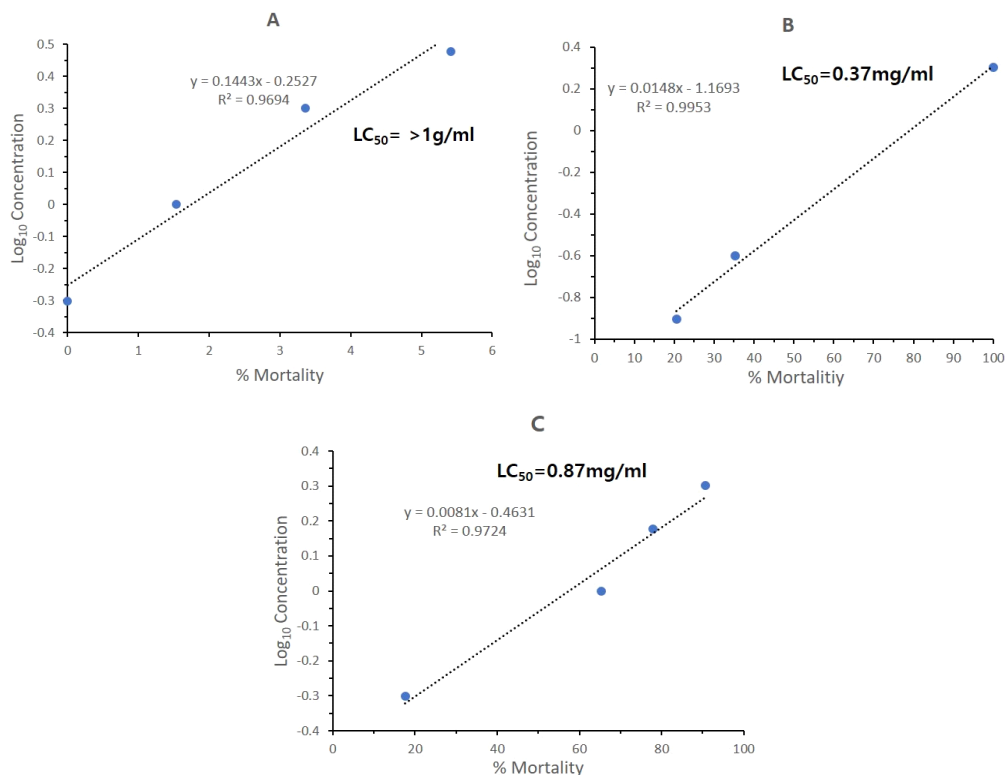


Fig. 4. Cytotoxic effects of the red ginseng extract(A), compound K (B) and 35% compound K enriched extract(C) on brine shrimp larvae for an incubation period of 24hr. Results are expressed as mean of three independent test in triplicate.

4. 결론

RAW 264.7 및 HaCaT 세포를 대상으로 항염증 효과 및 세포독성, brine shrimp를 이용한 *in vivo* 독성효과를 검증한 결과, compound K는 0.001~1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위에서 유의적인 세포독성은 나타나지 않았으며, LPS로 염증이 유발된 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , MCP-1, IL-6 및 NO의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 동일 농도범위에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 염증이 유발된 HaCaT 세포는 compound K의 처리로 인해 IL-8의 생성을 감소시키는 것으로 나타났지만, IL-6의 경우 일부 농도에서 생성을 감소시켰다. 이러한 compound K에 대한 세포독성 관련 연구결과는 일부 알려진 바가 있으나 생물전환된 고농도 compound K 함유 소재에 대한 동물실험은 알려진 바가 거의 없다. 생물전환을 통해 얻은 compound K 고함유(35%) 추출물은 brine shrimp 치사를 검정법으로 조사한 결과 LC₅₀가 0.87mg/mL로 독성이 비교적 낮았다. 최근 선제 연구를 통해 여드름 완화용 화장품에 사용 가능하도록 인삼 추출물을 개선하였으며 이 추출물이 여드름균인 *C. acnes* KCTC 3314 균주에 대한 저해환 측정치를 통해 우수한 저해효능(10mg/mL농도)이 있으며 또한 선택적 항균성이 있다는 것을 보였다[12]. 일반적인 피부 상재균 대비 여드름균과 같은 유해균에 대한 선택적 항균성은 기능성 화장품 소재로서 사용하는데 매우 중요한 기능일 수 있다. 본 연구는 이러한 기능성에 더해 독성효과를 검증한 기초연구를 통해 상용화의 가능성을 높인데 그 의미가 크다고 할 수 있다. 따라서 여드름균 저해 및 항염증 효과를 지닌 기초화장품의 잠재적 기능성 소재로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 이를 위해 추가적으로 compound K를 제형에 적용하여 여드름 관련 임상시험을 진행할 계획이다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구지원사업(No. 2021R1A6A1A03046418)이며, 또한 2021년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(No. 2021RIS001).

References

1. B. X. Wang, J. C. Cui, A. J. Liu, S. K. Wu, "Studies on the anti-fatigue effect of the saponins of stems and leaves of *Panax ginseng*(SSLG)", *Journal of Traditional Chinese Medicine*, Vol. 3, pp. 89-94, (1983).
2. A. S. Attele, J. A. Wu, C. s. Yuan, "Ginseng pharmacology: Multiple constituents and mutiple actions", *Biochemistry Pharmacology*, Vol. 24, pp. 119-127, (1999).
3. B. Kenarova, H. Neychev, C. Hadjiivanova, V.D. Petkov, "Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from *Panax ginseng*", *Japan Journal of Phamacology*, Vol. 54, pp. 447-454, (1990).
4. K. S. Im, H. Y. Chung, S. H. Park, N. K. Je, "Anticancer effect of the hydrolyzed monogluco-ginsenoside of total saponin from ginseng leaf", *Korean Journal of Ginseng Science*, Vol. 19, pp. 291-294, (1995).
5. H. Saito, Y. Yoshida, K. Takagi, "Effect of *Panax ginseng* root on exhaustive exercise in mice", *Japan Journal of Pharmacology*, Vol 24, pp. 119-127, (1974).
6. E. Choi, E. Kim, J. H. Kim, K. Yoon, S. Kim, J. Lee, "AKT1-targeted proapoptotic activity of compound K in human breast cancer cells", *Journal of Ginseng Research*, Vol. 43, pp. 692-698, (2019).
7. S. J. Lee, J. S. Lee, E. Lee, T-G. Lim, S. Byun, "The ginsenoside metabolite compound K inhibits hormone-independent breast cancer through downregulation of cyclin D1", *Journal of Functional Foods*, Vol. 46, pp. 159-166, (2018).
8. A. Sharma, H. J. Lee, "Ginsenoside Compound K: Insights into Recent Studies on Pharmacokinetics and Health-Promoting Activities", *Biomolecules*, Vol. 10, pp. 1028-1069, (2020).
9. J. W. Jang. "Anti-cancer effects of solid dispersion of compound K (IH-901) on

- lung cancer." Ph.D.'s thesis, the graduate school of Kyung Hee university, pp. 1-64, (2013).
10. M-H. Han, G. S. Moon, "Bioconversion of Ginseng Using Microorganisms", *Journal of Biotechnology and Bioindustry*, Vol. 7, pp. 5-11, (2019).
 11. S. J. Kim, C. S. Park, "Production of Compound K using ginsenosides from ginseng leaf by commercial enzyme", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol. 26, No. 6 pp. 2287-7428, (2019).
 12. M. Kim, J. Kim, K. H. Jung, K. W. Yu, G. S. Moon, H. Y. Lee, "Biosynthesis of Compound K, a biologically active saponin of ginseng(*Panax ginseng*) by bioconversion", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 38, No. 5 pp. 1335-1344, (2021).
 13. J. H. Hou, H. Shin, K. H. Jang, C. K. Park, B. Koo, H. Shin, S. H. Yuk, K. Y. Lee, "Anti-acne properties of hydrophobic fraction of red ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) and its active components", *Phytotherapy Research*, Vol. 33, pp. 584-590, (2019).
 14. M. S. Kim, S. R. Lee, K. W. Jung, "Extraction methods for compound K", submitted Korea Patent No. 10-2-21-0061366, (2021).
 15. M. Desroses, T. Koolmeister, S. A. Jacques, S. Llona-Minguez, M. Jacques-Cordonier, A. Cazares-Korner, T. Helleday, M. Scobie, "A facile and efficient synthesis of Tetrahydro- β -carbolines", *Tetrahedron Letters*, Vol. 54, No. 27 pp. 3554-3557, (2013).
 16. H. J. Byeon, K. H. Jung, G. S. Moon, S. K. Moon, H. Y. Lee, "A facile and efficient method for the synthesis of crystalline tetrahydro- β -carbolines via the Pictet-Spengler reaction in water", *Scientific Reports*, Vol. 10, article No. 1057 (2020).
 17. Y. C. Chen, S. C. Shen, W. R. Lee, W. C. Hou, L. L. Yang, T. J. F. Lee, "Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages", *Journal of Cell Biochemistry*, Vol. 82, pp. 537-548, (2001).
 18. Y. Cao, D. Zhao, A. T. Xu, J. Shen, Z. H. Ran, "Effects of immunosuppressants on immune response to vaccine in inflammatory bowel disease". *Clinical Medicine Journal*, Vol. 128, pp. 835-838, (2015).
 19. E. K. Park, Y. W. Shin, H. U. Lee, S. S. Kim, Y. C. Lee, B. Y. Lee, D. H. Kim, "Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide". *Biological Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 28, pp. 652-656, (2005).
 20. Y. Lee, H. K. Choi, K. P. U. N'deh, Y. J. Choi, M. Fan, E. K. Kim, K. H. Chung, J. J. An, "Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice". *Nutrients*, Vol. 12, article No. 411 (2020).
 21. S. J. Kim, B. Y. Kang, S. Y. Cho, D. S. Sung, H. K. Chang, M. H. Yeom, D. H. Kim, Y. C. Sim, Y. S. Lee, "Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocyte and increases hyaluronan in hairless mouse skin", *Biochemistry Biophysics Research Communication*, Vol. 316, No. 2 pp. 348-355, (2004).
 22. D. He, J. Sun, X. Zhu, S. Nian, J. Liu, "Compound K increase type I procollagen level and decreases matrix metalloproteinase-1 activity and level in ultraviolet-A-irradiated fibroblast. *Journal of Formosan Medical Association*, Vol. 110, No. 3 pp. 153-160, (2011).