

섬백리향 잎과 줄기 추출물의 항염 활성화에 관한 세포생물학적 연구

이선미[#], 백정인^{*}

대구한의대학교 힐링산업학부 향산업전공

Anti-Inflammatory Effect of the Extracts from Leaves and Stems of *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* (H.Hara)

Sun-Mi Lee[#], Jeong-In Baek^{*}

Department of Aroma-Applied Industry, Daegu Haany University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* (H.Hara) is a member of the genus *Thymus* of perennial aromatic herb, and it's designated as a natural monument of South Korea. It has traditionally been known to have protective or therapeutic effects on various human disease including cerebrovascular and neurological disease. Recently it was suggested that essential oil extracted from thyme has anti-fungal and anti-bacterial effect. The aim of this study is to investigate anti-inflammatory effect of *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* in Raw 264.7 macrophage cell line.

Methods : The cytotoxic effects of water and 70% ethanol extracts from *Thymus quinquecristatus* var. *japonica*, was tested using MTT assay. Inhibitory effects of the extracts to nitric oxide production and mRNA expression of inflammatory cytokines were examined by RT-PCR. Also, MitoSOX-red assay and JC-1 assay were performed to determine if the extracts can inhibit mitochondrial ROS accumulation and maintain mitochondrial membrane potential.

Results : In LPS-induced inflammatory response, the extracts efficiently reduced nitric oxide NO production through inhibiting mRNA expression of iNOS enzyme. In addition, expression of the proinflammatory cytokines, IL-1 β and IL-6, was also down-regulated by the extract treatments. Excessive accumulation of mitochondrial ROS induced by LPS was inhibited in the extract treated cells, which finally protected mitochondrial membrane potential.

Conclusions : These results showed that water and 70% ethanol extracts from *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* have anti-inflammatory effect through down regulation of IL-1 β , IL-6, and iNOS, and also have antioxidative effect against mitochondrial ROS accumulation that promote inflammatory response.

Key words : *Thymus quinquecristatus* var. *japonica*, inflammation, cytokine, nitric oxide, reactive oxygen species

I. 서 론

염증은 외부 병원체나 자극제, 내부의 손상된 세포 발생 등의 유해한 자극에 대해서 신체를 보호하기 위해 작동하는 정상적인 면역 반응으로서, 염증의 목적은 신체 내·외부 세포 손상의 초기 원인을 제거하여 원래의 건강한 상태로 세포와 조직을 복구하는 것이며, 그 과정에서 손상된 세포나 조직은 제거되고 새로운 세포로 교체된다¹⁾. 이 과정에는 혈액 및 조

직 내 다양한 면역세포가 관여한다. 대표적으로 대식세포 (macrophage), 단핵구 (monocyte), 호중구 (neutrophile) 등이 면역 반응을 매개하며, 외부 유해 자극을 감지하여 세포 내에서 PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B)와, MAPK (mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로를 활성화함으로써 NF- κ B 전사인자를 통해 TNF- α (tumor necrosis factor- α)와 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 등의 전 염증성 사이토카인

*Corresponding author: Jeong-In Baek, Department of Aroma-Applied Industry, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-819-1465 · Fax : +82-53-819-1243 · E-mail : baek@dhu.ac.kr

#First author: Sun-Mi Lee, Department of Aroma-Applied Industry, Daegu Haany University.

· Tel: +82-53-819-1464 · E-mail: leesunmi@dhu.ac.kr

· Received : 11 August 2021 · Revised : 06 September 2021 · Accepted : 25 September 2021

(cytokine)의 분비를 촉진한다²⁾. 또한 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX (inducible cyclooxygenase) 등의 효소 발현을 증가시켜 nitric oxide (NO)와 같은 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)과 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 축적을 유발하고, 그로 인해 발생하는 세포 내 산화스트레스는 염증 반응을 더욱 활성화 한다³⁾. 염증은 기본적으로 신체 방어를 위한 필수적 초기 면역반응이지만, NO의 과생성 등에 따라 유해 자극이 없는 상태에서도 염증 반응이 과도하게 유도되거나 만성적으로 지속되는 경우 정상 세포 및 조직을 오히려 손상시키거나 세포 내에서 유전자 변이를 일으킬 수 있다⁴⁾. 따라서 과도한 면역 반응을 적절히 제어하는 것이 신체의 건강을 유지하는 데에 매우 중요하다.

백리향속(Thymus)은 꿀풀과에 속하는 다년생 목본식물로, 유럽에서는 백리향이 Thyme (타임, *Thymus vulgaris*)으로 명명되며, 특히 타임의 정유는 소화기 장애, 흥분성 신경 질환, 고혈압, 호흡기 염증 질환 등의 치료를 목적으로 널리 사용되어 왔다⁵⁾. 한국의 토종 백리향은 *Thymus quinquecostatus*로 분류되며, 전통적으로 구풍, 산한, 지통 등의 효능을 가지는 것으로 알려져 왔다. 그리고 그 변종인 섬백리향 (*Thymus quinquecostatus* var. *japonica*)은 울릉도에서만 자생하는 천연기념물 제52호로서 학술적 연구 및 산업적 개발 가치를 높게 평가 받고 있다. 특히 섬백리향의 생물학적 효능에 관하여, 최근 국내에서는 섬백리향이 진균인 *Aspergillus niger*와 피부 및 다양한 조직의 점막에서 염증을 유발하는 *Candida albicans*에 대한 항진균작용을 가진다는 것이 보고된 바 있다⁶⁾. 또한 섬백리향의 주요 방향성분인 티몰 (thymol)에 대한 연구도 다수 수행되어, 마우스의 유선상피세포와 복막중피세포에서 thymol이 염증 관련 사이토카인 TNF- α 와 interleukin-6 (IL-6)의 발현을 억제함으로써 항염증 활성을 나타낸다는 것이 밝혀진 바 있다^{7,8)}. 이러한 연구들은 섬백리향의 항염 효과에 대한 과학적 근거를 제시하고 있으며, 동시에 다양한 염증성 질환에 대한 예방 또는 치료 물질로서 섬백리향의 활용 가능성을 의미한다고 볼 수 있다.

이같이 백리향 또는 섬백리향이 가지는 다양한 생물학적 효능에 대한 연구가 이루어져 왔으나, 이러한 연구가 주로 유럽을 비롯한 서구권에서 이루어져 왔기에 연구를 위한 시료가 정유, 즉 에센셜 오일의 형태로 사용되어왔다. 식물의 정유는 주로 분자량 300 이하의 비극성 저분자 성분으로 이루어져 있기에 일반적인 식물 추출물과 그 성분의 종류 및 성질이 매우 상이할 수 있기에 그 효능도 달라질 수 있다. 또한 현재까지 이루어진 항염 관련 연구들은 추출물의 처리 여부에 따른 항염 관련 사이토카인의 발현 변화를 비교함으로써 염증 반응의 활성화 여부를 단순히 비교한 연구가 주를 이루어왔으며, 염증 반응과 세포 내 활성산소와의 관련성 등의 다각적인 기전 연구는 상대적으로 미흡하였다. 이에 본 연구는, 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물의 항염 활성 및 그 관련 기전을 규명하고자, lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응이 유도된 Raw264.7 대식세포주에서 섬백리향 추출물 처리에 따른 염증성 인자의 발현과 활성산소로 인한 미토콘드리아의 기능 손상 여부를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 추출물

본 연구에서 추출을 위해 사용된 섬백리향 (*Thymus quinquecostatus* var. *japonica*)은 경북 청송에서 채취하였으며, 식물의 잎과 줄기를 건조한 후 추출에 사용하였다. 열수 추출을 위해서 증류수를 시료 중량의 10배 첨가하여 85°C 온도에서 9시간 동안 추출을 진행하였으며, 알코올 추출을 위해서는 시료 중량 10배의 70% 에탄올을 용매로 실온에서 24시간 동안 침지하였다. 각 추출액은 여과지로 여과하여 농축 및 동결 건조하였다. 섬백리향 열수 추출물과 에탄올 추출물 각각의 수득율은 19.5%, 11.7%였다.

2) 시약

Raw264.7 세포주의 세포 생존율 측정을 위해 abcam (Cambridge, MA, USA) 사의 CCK-8 assay kit를 사용하였다. 세포 내 염증 반응을 유도하기 위해 사용한 Lipopolysaccharide (LPS) O111:B4는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, NO 측정을 위한 NO [NO] Plus Detection Kit는 iNtRON BIOTECHNOLOGY (Sungnam, S. Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포 내 RNA 추출을 위해 QIAGEN (Hilden, Germany)의 RNeasy plus mini kit를 사용하였으며, ThermoFisher SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA)의 superScript™ III First-Strand Synthesis System을 사용하여 cDNA 합성을 진행하였다. 미토콘드리아 내 활성산소의 확인을 위해 사용한 MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator는 ThermoFisher SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA)에서 구입하였으며, 미토콘드리아 막전위 확인을 위한 JC-1 Assay kit는 abcam (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 실험 방법

1) 세포 배양

마우스 유래 macrophage like cell-line인 Raw 264.7 세포주는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 분양 받았다. 세포 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건으로 유지하였으며, 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였다.

2) 세포 생존율 확인을 통한 독성 평가

Raw 264.7 세포주에 대한 섬백리향 추출물의 최적 처리 농도를 결정하기 위하여 추출물 처리 농도에 따른 세포 생존율의 차이를 확인하였다. 살아있는 세포의 NADH, NADPH에 의해 1-Methoxy PMS가 환원되어 노랑색을 띠는 WST-8에 전자를 전달함으로써 환원된 formazan 결정이 오렌지색을 띠게 되는 원리를 활용한 WST-8/1-Methoxy PMS 시스템으로 생존율 측정을 수행하였다. 96-well plate에 3×10^4

cells/well로 세포를 분주하여 24시간 안정화를 거친 후, 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물을 각각 1, 10, 100, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 이 후 10 μl 의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 용액을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 산화-환원 반응을 유도한 후, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 다음의 수식으로 계산하여 세포 생존율을 비교하였다.

$$\text{세포독성 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{용매 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) Nitrite 소거 활성 측정

염증 반응 과정에서 생성되는 NO^2- 의 농도를 측정하기 위해 Griess Reagent system을 사용하였다. 우선 Raw 264.7 세포를 96-well plate에 2.5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 안정화하고, 농도별로 섬백리향 추출물을 전처리하였다. 1시간 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 LPS를 처리하여 24시간 동안 염증 반응을 활성화시켰으며, 배지 100 μl 를 정량하여 동량의 Griess reagent와 혼합하여 10분간 반응시켰다. 배지에 존재하는 nitrite의 양을 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 그 농도의 기준은 연속 희석한 Sodium nitrite (NaNO_2)의 농도별 표준 곡선으로 설정하였다.

4) 염증 매개 인자의 발현량 변화 분석

섬백리향 추출물의 처리에 따른 염증 매개 사이토카인의 mRNA 발현 변화를 reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 확인하였다. 각 그룹 별로 100 mm cell culture dish에 4×10^6 개의 Raw 264.7 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화 시킨 후, 농도별로 섬백리향 추출물을 1시간 전처리하고 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS를 후처리하여 2시간 동안 염증 반응을 유도하였다. 세포 내 total RNA 추출을 위해 차가운 1 \times PBS로 세포를 행군 후, scraper를 이용하여 세포를 회수한 후 RNeasy mini kit(QIAGEN, Germany)로 RNA를 추출하였다. Total RNA로부터의 cDNA 합성은 SuperScript™ III CellsDirect™ cDNA synthesis kit (Invitrogen, USA)로 수행하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 IL-6, IL-1 β , iNOS, COX 유전자의 발현을 RT-PCR로 확인하였으며, 대조군 유전자는 Gapdh였다 (Table 1). 각 유전자의 RT-PCR primer를 디자인하기 위해서 Primer 3 웹 프로그램(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)을 활용하였으며, 디자인된 primer의 합성은 마크로젠사에 의뢰하여 진행하였다. RT-PCR의 cycle은 50°C, 3분; 95°C, 3분; (95°C, 10초 - 60°C, 30초) \times 25회 조건으로 수행되었다.

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

Gene	Sense (5'-3')	Antisense(5'-3')	Tm(°C)	Product size (bp)
IL-1 β	GGATGAGGACATGAGCACCT	AGCTCATATGGGTCCGACAG	60	174
IL-6	GACAAAGCCAGAGTCTTCAG	GGATGGTCTTGGTCTTAGC	59	163
iNOS	TTCCAGAATCCCTGGACAAG	TGGTCAAACCTCTGGGGTTC	60	177
COX-2	TCTTTGCCAGCACTTCAC	ACCTCTCCACCAATGACCTG	60	184
Gapdh	GGTGTGAGTATGTCGTGGA	CTAAGCAGTTGGTGGTGCAG	60	202

5) 세포 내 활성산소종 축적의 확인

LPS에 의해 유도되는 염증 반응으로 인해 세포 내에 축적되는 활성산소를 시각화하여 확인하기 위해 MitoSOX-red를 활용하였다. MitoSOX-red는 정상 세포에서 미토콘드리아 내부로 들어간 후 활성산소에 의해 산화되어 붉은색 형광을 띠게 되므로 MitoSOX-red의 형광의 강도와 미토콘드리아 내 활성산소의 발생량은 비례한다. 우선 24-well plate에서 coverslip 위에 1.5×10^6 cells/well로 Raw 264.7 세포를 분주한 후 24시간 동안 안정화한 후, 각 섬백리향 추출물을 농도별로 전처리하여 1시간 동안 유지하였다. 이후 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS를 2시간 동안 처리하여 염증반응에 따른 활성산소 축적을 유도하고, 5 μM 의 MitoSOX-red를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 그 후 배지와 시약을 제거한 후 1 \times PBS로 씻어내고 형광 현미경 (Axio Imager A2, Carl Zeiss Int, Germany)을 통해 세포 내에 축적된 활성산소 신호를 확인 및 촬영하였다.

6) 미토콘드리아 막전압 유지 활성 분석

양이온성 형광 염색 시약인 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide(JC-1)을 사용하여, 미토콘드리아 내 활성산소 축적에 따른 미토콘드리아의 막전압($\Delta\psi$) 유지 또는 붕괴 여부를 확인하였다. 우선 24-well plate의 coverslip 위에서 1.5×10^6 cells/well의 Raw264.7 세포를 24시간 동안 안정화하고, 농도별 섬백리향 추출물의 1시간 전처리 및 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS의 2시간 후처리를 수행하였다. 이후 1 \times PBS로 배지 및 시약을 씻어내고 2 μM JC-1 용액을 세포에 처리하여 빛이 차단된 상태로 37°C에서 50분 간 JC-1의 미토콘드리아 축적을 유도하였다. 미토콘드리아 막전압이 정상일 때에는 JC-1이 미토콘드리아 내에서 다량체를 형성하여 붉은색 형광을 발하지만, 막전압이 무너지면 단량체의 형태로 존재하며 녹색 형광을 발하는 원리에 근거하여, 형광 현미경 (Axio Imager A2, Carl Zeiss Int, Germany)으로 JC-1의 형광 신호 이미지를 촬영을 진행하였다. 미토콘드리아 막전압의 유지 여부는 JC-1 다량체(red)에 대한 단량체

(green)의 형광 발색 강도를 상대 비율(red/green)로 계산하여 비교하였다.

7) 통계 분석

본 연구에서 모든 실험은 각 3회 이상 수행되었으며, 각 그래프는 실험 반복 횟수에 대한 평균값±표준편차로 나타내었다. 각 그룹간 평균값의 차이에 대한 통계적 유의성 검증은 t-test(양측검정)을 근거로 수행하였으며, p-value<0.05에 해당하는 경우에만 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 섬백리향 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

섬백리향 추출물의 항염 효능을 확인하기 위해서는 Raw 264.7 세포주에 대한 각 추출물의 최적 처리 농도를 결정해야 하므로, 유의한 세포 독성을 나타내지 않는 선에서의 최고 농

도를 찾기 위해 세포 생존율 측정을 진행하였다. 1~5000 µg/ml 범위의 8개 농도로 각 추출물을 처리하여 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물의 세포 독성 여부를 확인한 결과, 두 추출물 모두 1000 µg/ml 농도까지는 대조군에 비해 오히려 세포 생존율이 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 1). 특히 1000 µg/ml 농도에서 최고 생존율을 보였으며, 열수 및 에탄올 추출물 처리군에서 각각 165%, 144%의 세포 생존율을 나타내었다.

이 결과는 저농도에서 섬백리향 추출물이 Raw 264.7 cell의 증식을 촉진시킬 수 있다는 가능성을 보여준다. 한 편 2000 µg/ml 이상의 고농도에서는 두 추출물 처리군 사이에서 세포 생존율이 차이가 나타났다. 열수 추출물은 4000 µg/ml 처리군에서도 100% 이상의 세포 생존율을 보인 반면, 에탄올 추출물은 2000 µg/ml 처리군에서 80%의 생존율을, 3000 µg/ml 이상 처리군에서는 20% 이하의 매우 낮은 생존율을 보였기에, 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 세포 독성이 더 높음을 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과를 바탕으로 이후의 항염 활성 실험은 두 추출물 모두 1000 µg/ml를 최고 농도로 설정하여 진행하였다.

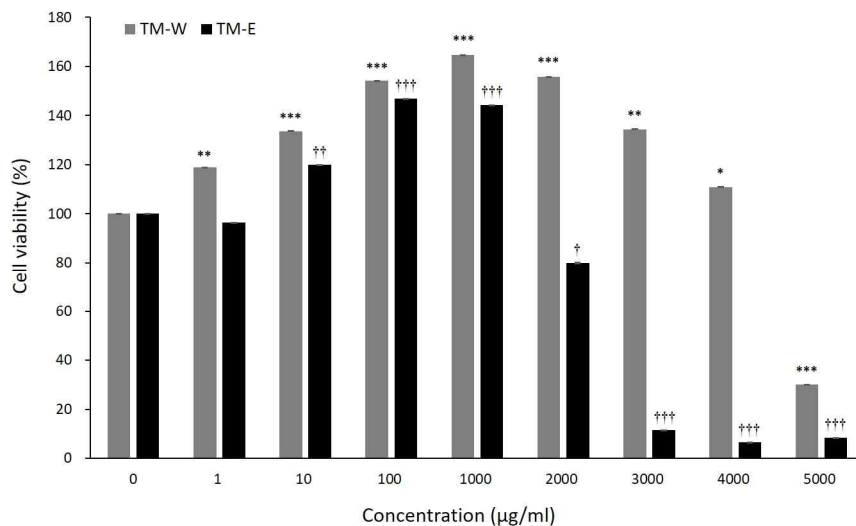


Fig 1. Effect of water (TM-W) and ethanol (TM-E) extracts from *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* on cell viability in Raw 264.7 cells. Cells were treated with 1, 10, 100, 1000, 2000, 3000, 4000, and 5000 µg/ml of extract. The graph indicates the relative percentages to the control (untreated) group, and the data are shown as mean±SD. *(†), $P < 0.05$; ***(††), $P < 0.01$; ****(†††), $P < 0.001$.

2. 섬백리향 추출물의 NO 소거 활성

대식세포에서 NO synthase의 활성화에 의해 생성 및 분비되는 NO는 염증 반응에서 중요한 신호전달 물질로, 종양세포 또는 병원체에 감염된 자가 세포 등에 대해 면역 반응을 매개하므로 염증 반응 활성화를 판단하는 중요한 마커이다⁹⁾. 이에 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물이 LPS 자극에 따른 Raw264.7 세포 내 NO의 생성에 미치는 영향을 확인한 결과, 두 추출물 모두 1000 µg/ml 처리군에서 NO의 생성량이 크게 감소하였다 (Fig. 2). 열수 및 에탄올 추출물 처리군 모두 1000 µg/

ml 농도에서 평균 NO 농도가 7.62, 3.12 µM로 나타났으며, 이는 LPS 단독 처리군의 약 23%, 13% 수준에 그쳐, 각각 77%, 87%의 NO 생성량 감소 효과를 나타내었다. 특히 에탄올 추출물 처리군에서는 NO의 생성량이 LPS를 처리하지 않은 음성 대조군과 거의 동등한 수준으로 감소하여 (Fig. 2B) 섬백리향 추출물이 매우 우수한 항염 활성을 가진다는 것을 보여주었다.

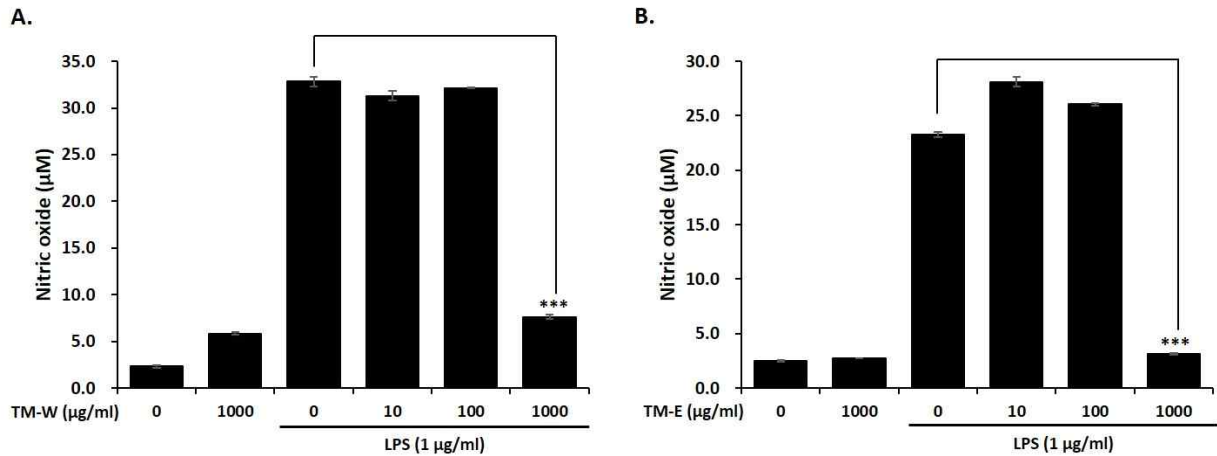


Fig 2. The inhibitory effect of water (TM-W) and ethanol (TM-E) extracts from *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* on LPS-induced NO production, Nitrite release was tested by Griess assay, and each data represents mean ± SD. ***P < 0.001.

3. 섬백리향 추출물 처리에 따른 염증 매개 인자의 mRNA 발현 변화

LPS로 염증반응이 유도된 Raw 264.7 세포에서, NO 합성 효소인 inducible iNOS, 염증 매개 사이토카인 IL-1β와 IL-6, 그리고 prostaglandin 합성 효소인 Cox2의 mRNA 발현 변화를 섬백리향 추출물 처리군에서 각각 확인하였다. 실험 결과, LPS 단독 처리군에서는 네 가지 유전자 모두 LPS 처리에 의해 그 발현이 증가하였고, 추출물 단독 처리군에서는 음성 대조군과 동일하게 각 유전자의 발현이 전혀 확인되지 않았다 (Fig. 3). 이는 LPS에 의해 세포 내 염증 반응이 잘 유도되었으며, 섬백리향 추출물 자체는 비특이적인 염증반응을 전혀 유도하지 않는다는 것을 확인시켜주는 결과이다. 한편 LPS로 염증반응 유도 후 섬백리향 추출물을 처리한 그룹에서는 추출물 처리에 따라 해당 유전자의 발현이 감소하는 양상을 보였으며, 특히 1000 µg/ml 농도에서 그 발현이 크게 억제되었다. 이러한 경향은 열수 및 에탄올 추출물 처리에서 모두 동일하게 관찰되었으며, 특히 iNOS이 발현 감소가 눈에 띄게 나타났다. 이는 앞선 NO 생성량 측정과 일치하는 결과로, 섬백리향 추출물의 항염 효능에 대한 근거를 더욱 확실하게 제시한다.

따라서, 본 결과를 통해 섬백리향 추출물은 IL-1β와 IL-6의 발현을 효과적으로 억제함과 동시에 iNOS의 발현 억제를 통해 NO의 생성 및 분비를 감소시킴으로써 항염 효능을 발휘하는 것이라 판단할 수 있다. 한편, 다른 유전자와 달리 Cox2의 발현은 섬백리향 추출물 1000 µg/ml 처리군에서도 유의한 발현 감소를 보이지 않았다. 이는 천연 추출물의 항염 활성 연구에서 COX를 포함한 염증 관련 인자의 발현 억제가 일괄적으로 나타나는 대부분의 기존 연구결과와 차별화되는 지점으로, 섬백리향 추출물의 항염 활성 성분이 COX 활성화 경로와는 독립적으로, iNOS 관련 경로에 특이적으로 작용할 가능성을 제시한다.

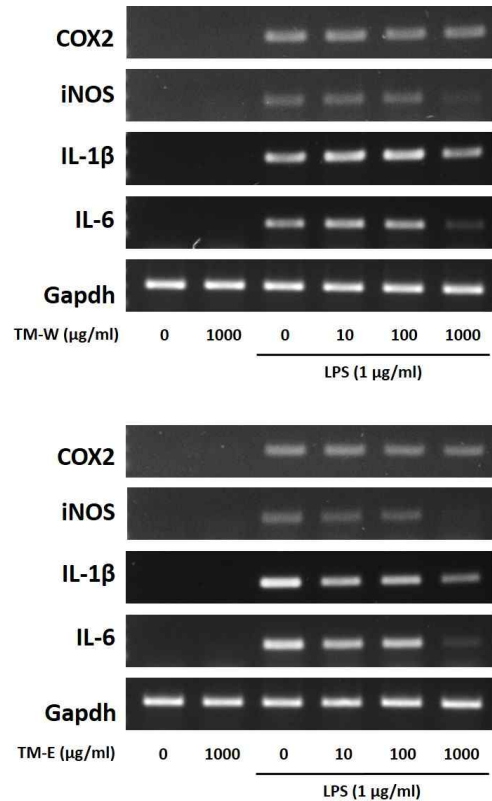


Fig 3. Inhibitory effect of water (TM-W) and ethanol (TM-E) extracts from *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* on Cox2, iNOS, IL-1β and IL-6 expression in LPS-induced inflammation. The mRNA expression levels were identified by RT-PCR. Gapdh was used as the control.

4. 섬백리향 추출물이 세포의 미토콘드리아 내 활성산소 축적에 미치는 영향

Macrophage 세포에서 LPS 자극에 의한 염증 사이토카인의 발현 및 분비는 미토콘드리아 내 ROS의 과축적으로 인해 촉발된다고 알려져있다¹⁰⁾. 또한 본 연구에서의 항염 활성 확인 결과

섬백리향 추출물이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성과 염증 사이토카인의 발현을 효과적으로 억제함을 확인하였기에, 섬백리향 추출물의 항염 효능이 미토콘드리아 내 ROS 축적과 연결되어 있는지 확인하기 위하여 MitoSOX-Red assay를 통해 미토콘드리아 내 ROS의 축적을 시각적으로 확인하였다. 실험 결과, fig. 4와 같이 염증을 유도하지 않은 대조군에서는 MitoSOX-red의 신호가 매우 약하게 나타나는 반면, LPS 단독 처리군에서는 그 신호가 매우 강하게 나타나, LPS에

의한 염증 반응이 미토콘드리아 내 활성산소를 크게 축적시킴을 알 수 있었다. 반면 LPS로 염증 반응이 유도된 세포에 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 섬백리향 추출물을 처리했을 때에는 열수 및 에탄올 추출물 처리군 모두 음성 대조군에 가까운 수준으로 MitoSOX-red의 신호가 감소하였다. 이를 통해 섬백리향 추출물이 미토콘드리아 내 활성산소의 과발생 혹은 과축적을 억제하여 염증 사이토카인의 발현 증가를 막음으로써 항염 효능을 나타낸다는 결론을 얻을 수 있었다.

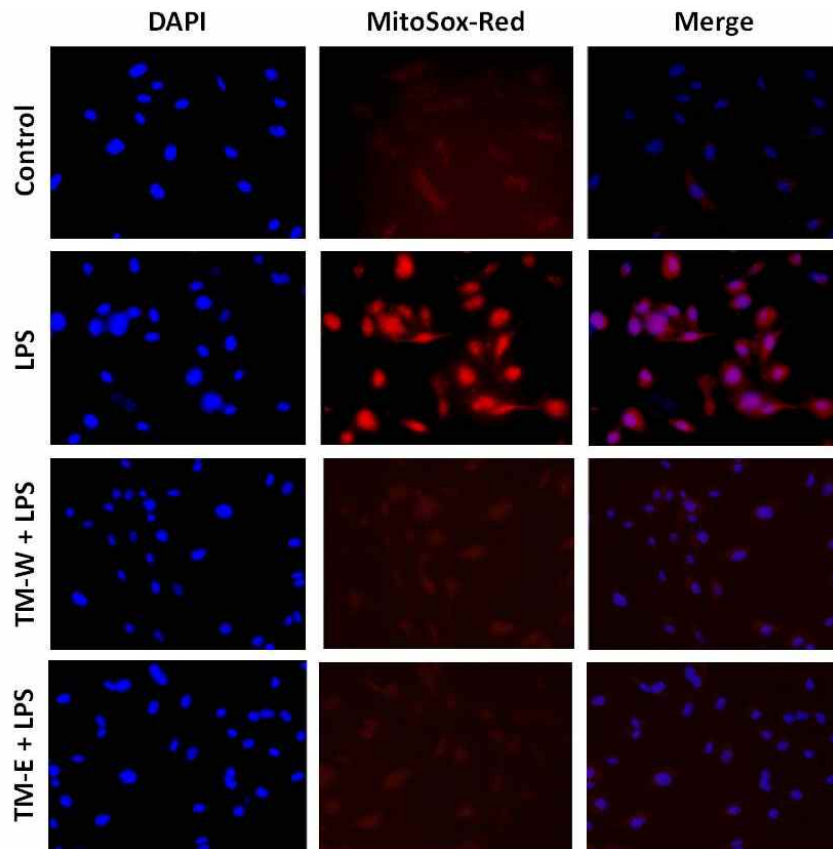


Fig. 4. Inhibition of mitochondrial ROS accumulation by administration of water (TM-W) and ethanol (TM-E) extracts from *Thymus quinquecristatus* var. *japonica*. Mitochondrial ROS was visualized by MitoSOX-red, and the nuclei were counterstained with DAPI (blue). Magnification: $\times 200$.

5. 섬백리향 추출물이 미토콘드리아의 막전압 유지에 미치는 영향

앞선 실험의 결과, LPS 자극이 미토콘드리아 내 활성산소의 축적을 야기함으로써 염증 반응을 유도하였으며, 이는 섬백리향 및 백리향 추출물의 전처리에 의해 효과적으로 예방됨을 확인하였다. 미토콘드리아 내 과도한 활성산소의 축적은 미토콘드리아의 막전위 손상을 초래하고, 그것은 결국 미토콘드리아의 기능 상실로 이어져 세포 전체의 손상 및 사멸로 이어진다¹¹⁾. 이에 본 연구에서의 LPS 유도성 활성산소 과축적이 결과적으로 미토콘드리아의 기능 손상에 어떤 영향을 주는지 확인하고자 JC-1 assay를 통해 미토콘드리아 막전위의 상실 여부를 관찰하였다. Raw 264.7 세포 내에서 관찰되는 붉은색과 녹색 형광의 상대적 비율을 관찰한 결과, 음성 대조군의

정상 미토콘드리아에서는 막전위가 잘 유지되어 JC-1이 붉은색 형광 신호를 발산하는 반면, LPS로 염증이 유도된 세포에서는 붉은색 형광이 거의 관찰되지 않음으로써 미토콘드리아의 막전위가 붕괴되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 그러나 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물 1000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 세포에서는 JC-1의 다량체가 발산하는 붉은색 신호가 다시 증가하였으며, 이는 섬백리향 추출물의 전처리로 미토콘드리아 막전위가 유지될 수 있었음을 보여주는 결과이다.

앞선 실험의 결과를 종합하여 추론하였을 때, 섬백리향 추출물은 LPS 자극으로 인한 미토콘드리아 내 활성산소의 과축적을 효과적으로 예방하였고 그로 인해 정상적인 미토콘드리아의 막전위가 유지되었으므로, 결국 섬백리향 추출물이 염증 반응으로 인한 세포의 손상 또는 사멸로부터 세포를 보호하는 역할을 할 가능성이 있다고 기대할 수 있다.

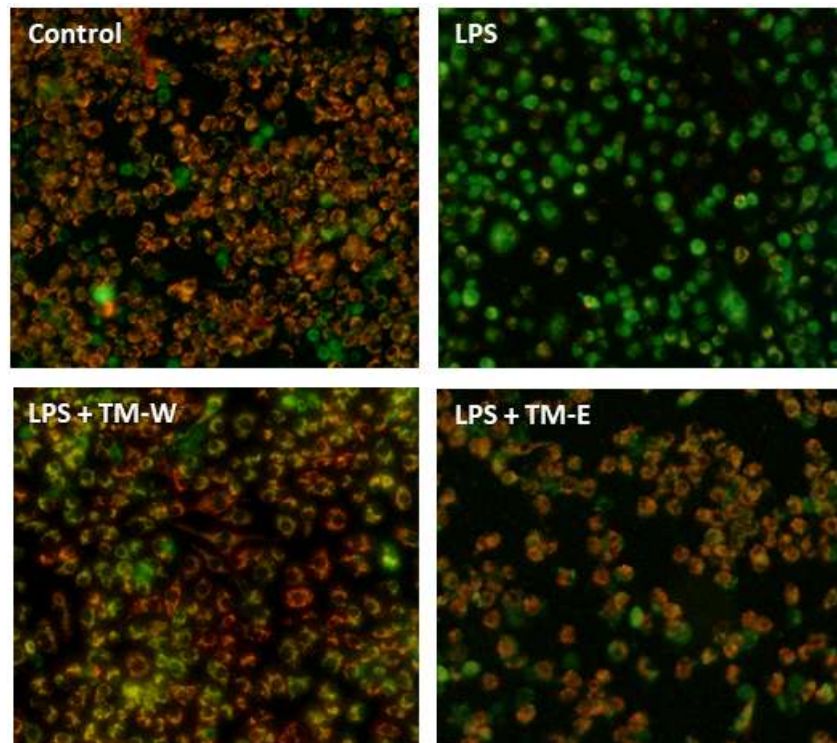


Fig. 5. Protective effect of water (TM-W) and ethanol (TM-E) extracts from *Thymus quinquecristatus* var. *japonica* on maintenance of mitochondrial membrane potential. JC-1 assay was performed in Raw 264.7 cells. Fluorescence emission shift from red (590 nm) to green (529 nm) was monitored at 488 nm excitation. Magnification: $\times 100$.

IV. 고 찰

본 연구에서는 한국의 천연기념물인 섬백리향이 가지는 다양한 생물학적 효능 중 항염 작용을 세포에서 검증하고 그 작용 기전을 확인하였다. 열수 및 에탄올을 용매로 추출한 섬백리향 추출물은 대표적인 염증 유도 인자인 IL-1 β 와 IL-6의 발현을 효과적으로 감소시켰으며, NO 생성에 기여하는 iNOS 효소의 발현 역시 크게 억제하여 결과적으로 NO의 분비량을 유의하게 감소시켰다. 다른 한 편 염증 반응과 밀접하게 연결되어 있는 활성산소 (ROS)의 축적과 관련하여, 섬백리향의 두 가지 추출물이 미토콘드리아 내 활성산소의 과축적을 억제하여 미토콘드리아 막전위를 유지시킴으로써 염증성 사이토카인의 분비를 효과적으로 억제할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 세포 사멸 신호의 활성화를 확인할 수 있는 추가적인 실험이 이루어져야 하겠으나, 미토콘드리아의 막전위 붕괴가 미토콘드리아의 기능 상실로 이어지고 그것이 곧 세포 사멸 경로를 활성화 시킨다는 것은 많은 선행 연구들을 통해 확인된 바 있다. 따라서, 섬백리향 추출물이 LPS 유도성 염증 반응 자체의 억제에서 더 나아가 그로 인한 Raw 264.7 세포의 사멸로부터 세포를 보호하는 역할을 할 것이라는 가능성을 추론할 수 있다.

ROS는 다양한 세포 반응을 매개하는 세포 대사의 부산물로, 세포 내에서 그 농도가 일정하게 유지되며 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 다만 세포 내외의 여러 자극에 의해 세포 내 ROS가 과생성되거나 제거되지 못하여 축적이 되면 단백질과 지질 등 세포 구성 물질의 산화, DNA 손상, 염증

반응 유도 등을 통해 심각한 세포 손상을 초래하여 세포를 사멸에 이르게 하기 때문에 다양한 질환의 직접적 원인이 된다. ROS 과축적으로 인한 염증 반응의 촉진은 많은 선행연구에서 규명된 바 있으며, 특히 LPS와 결합하는 세포막 수용체인 Toll-like receptor (TLR-4)의 활성화는 이와 직접적으로 상호작용하는 NADPH oxidase 4 (NOX 4)를 통해 ROS의 과생성을 초래한다¹²⁾. 과도하게 축적된 ROS는 MAPK와 PI3/AKT 신호전달 경로를 활성화시켜, 최종적으로 Nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성화를 유도함으로써 결국 염증 반응을 더욱 촉진하게 된다^{12,13)}. NF- κ B는 TNF- α 및 여러 interleukin을 포함한 염증성 사이토카인의 발현을 촉진하는 전사인자로서, TLR-4 신호 전달 경로를 따라 I κ B kinase (IKK)에 의해 I κ B가 인산화되면 그와 결합하고 있던 NF- κ B가 분리되어 핵 내부로 이동하고, DNA의 특정 인식 부위에 결합하여 다양한 염증 관련 인자들의 발현을 촉진한다¹⁴⁾.

또한 이렇게 활성화된 염증 반응은 역으로 ROS의 축적을 더욱 유도하여 그 악순환이 반복되어 결국 세포는 사멸 경로를 따르게 된다¹⁵⁾. 따라서 ROS의 과축적을 막는 것은 염증 반응을 억제할 수 있는 훌륭한 방법으로 여겨진다. 실제 몇몇 연구에서는 항산화 효과를 가지는 플라보노이드 또는 폴리페놀 물질을 세포 또는 마우스에 적용시킴으로써, 세포 내 ROS 농도의 감소가 LPS에 의해 활성화되는 TAK1/IKK/NF- κ B, MAPK, 그리고 PI3/AKT 신호전달 경로를 억제한다는 것을 확인하였으며, 그를 통해 항염 효과가 나타날 수 있음을 제시하였다^{3,16)}.

본 연구에서는 LPS로 유도된 염증 반응에서 섬백리향 추

출물에 의한 염증 매개 인자의 발현 억제와 함께 미토콘드리아 내 ROS의 축적 방식을 확인하였으며, 이 결과는 LPS 유도성 염증 반응에 대한 섬백리향 추출물의 항염 활성이 세포 내 미토콘드리아의 ROS 과축적의 억제와 연결될 수 있음을 보여주었다는 것에 그 의미가 크다. 특히 천연 식물의 추출물에는 그 정도의 차이는 있으나 다양한 종류의 항산화 물질이 포함되어 있다. 본 연구에서 사용된 섬백리향 추출물의 성분 분석을 통해 두 가지 서로 다른 추출물에 동시에 존재하는 물질 중 해당 기전에 주요하게 기능하는 유효 성분을 도출하고, 그에 대한 기전 연구를 수행한다면 염증성 질환에 폭넓게 활용 가능한 천연 기능성 소재를 발굴할 수 있을 것이라 기대된다.

V. 결 론

섬백리향의 열수 및 에탄올 추출물의 LPS 유도성 염증 반응에 대한 항염 효과 및 관련 기전을 Raw 264.7 세포에서 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물은 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성 및 분비를 효과적으로 억제하였다.
2. 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물의 NO 생성 억제는 iNOS의 발현 억제를 통해 이루어진 것으로 판단되며, 주요 염증성 사이토카인 IL-1 β 와 IL-6의 발현 역시 감소시킴으로써 항염 활성을 나타내었다.
3. 염증성 사이토카인의 발현 및 분비를 촉진하는 주요 상위 기전은 미토콘드리아 내 활성산소의 과축적으로, 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물이 이를 효과적으로 차단하였다.
4. 미토콘드리아 내 활성산소의 과축적으로 유발되는 미토콘드리아 막전위 상실이 섬백리향 열수 및 에탄올 추출물에 의해 억제되었다.

이상의 결과를 통해 섬백리향의 열수 및 에탄올 추출물이 LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성과 NO의 생성 및 분비를 효과적으로 억제하였으며, 동시에 미토콘드리아 내 활성산소의 과축적을 막음으로써 사이토카인의 과도한 활성을 억제할 수 있었음을 확인하였다. 본 결과를 바탕으로 섬백리향의 항염 활성이 실제 화장품, 식품 및 의약품의 기능성 소재로 유용하게 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

감사의 글

이 연구의 결과물은 한국연구재단 신진연구지원사업(NRF-2020R1C1C1005030)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 진심으로 감사드립니다.

References

1. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 ; 454 : 428-435.
2. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev*. 2010 ; 9 : 703-718.
3. Fan C, Wu LH, Zhang GF, Xu F, Zhang S, Zhang X, Sun L, Yu Y, Zhang Y, Ye RD. 4'-Hydroxywogonin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages and acute lung injury mice. *Plos One*. 2017 ; 12 : e0181191.
4. Hippeli S & Elstner EF. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radical Research*. 1999 ; 31 : 81-87.
5. Chevallier A. *Herbal Remedies*. London : Dorling Kindersley. 2007 : 87-89.
6. Shin SW, Kim JH. Antifungal activities of essential oils from *Thymus quinsuecostatus* and *T. magnus*. *Planta Med*. 2004 ; 70 : 1090-2.
7. Liang D, Li F, Fu Y, Cao Y, Song X, Wang T, Wang W, Guo M, Zhou E, Li D, Yang Z, Zhang N. Thymol inhibits LPS-stimulated inflammatory response via down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse mammary epithelial cells. *Inflammation*. 2014 ; 37 : 214-22.
8. Wang Q, Cheng F, Xu Y, Zhang J, Qi J, Liu X, Wang R. Thymol alleviates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response via downregulation of RhoA-mediated NF- κ B signalling pathway in human peritoneal mesothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2018 ; 15 : 210-220.
9. Aldridge C, Razzak A, Babcock TA, Helton WS & Espat NJ. LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide production is decreased by an omega-3 fatty acid lipid emulsion. *J Surg Res*. 2009 ; 149 : 296-302.
10. Park J, Min JS, Kim B, Chae UB, Yun JW, Choi MS, Kong IK, Chang KT & Lee DS. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. *Neuro Letters*. 2015 ; 584 : 191-196.
11. Georgieva E, Ivanova D, Zhelev Z, Bakalova R, Gulubova M & Aoki I. Mitochondrial dysfunction and redox imbalance as a diagnostic marker of "free radical diseases". *Anticancer Res*. 2017 ; 37 : 5373-5381.
12. Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: Direct interaction of TLR4 with

- NAH(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF- κ B. *J Immunol*, 2004 ; 173 : 3589–3593.
13. Ranneh Y, Akim AM, Hamid HA, Khazaai H, Fadel A, Mahmoud AM. Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2, NF- κ B and p38 MAPK. *Nutrition & Metabolism*. 2019 ; 16 : 15.
 14. Li X, Stark GR. NF κ B-dependent signaling pathways. *Exp Hematol*. 2002 ; 30 : 285–296
 15. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014 ; 20 : 1126–1167.
 16. Ma Q, Kinneer K, Ye J, Chen BJ. Inhibition of Nuclear Factor κ B by Phenolic Antioxidants: Interplay between Antioxidant Signaling and Inflammatory Cytokine Expression. *Mol Pharmacol*. 2003 ; 64 : 211–219.