



## Evaluation of cyclooxygenase (COX) inhibition in rosemary extract

Sehee Lee<sup>1</sup> · Soo-yeon Park<sup>1</sup> · Kyeong Jin Kim<sup>2</sup> · Sonwoo Kim<sup>3</sup> ·  
Yanghoon P. Jung<sup>3</sup> · Ji Yeon Kim<sup>1,2</sup>

### 로즈마리 추출물의 cyclooxygenase (COX) 효소 및 유전자 발현에 미치는 영향

이세희<sup>1</sup> · 박수연<sup>1</sup> · 김경진<sup>2</sup> · 김선우<sup>3</sup> · 정양훈<sup>3</sup> · 김지연<sup>1,2</sup>

Received: 31 January 2023 / Accepted: 10 March 2023 / Published Online: 23 March 2023  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

**Abstract** Selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibition is a novel strategy to reduce the risk of gastrointestinal side effects caused by conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. However, some selective COX-2 inhibitors have become apparent to increase the risk of severe cardiovascular disease. The aim of this study was to examine the anti-inflammatory effect of rosemary extract (RE) and confirm the safety of cardiovascular side effects. Inhibition of COX enzyme activity was assessed, and the levels of COX-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and COX-1 and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) were evaluated in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. The 40% RE group showed increased COX-2 inhibition activity in a dose-dependent manner, whereas the 50% RE group only exhibited at 100 µg/mL. In a cell-based study, COX-2 mRNA expression was similar in both RE groups and PGE<sub>2</sub> levels tended to decrease in the 40% RE

group compared to the LPS group in the LPS pretreatment condition. In the LPS posttreatment condition, the COX-2 mRNA expression decreased in the 40% RE group, and PGE<sub>2</sub> levels were increased in the 40 and 50% RE groups. In both conditions, there was no significant difference in COX-1 and TXB<sub>2</sub> levels. In conclusion, 40 and 50% RE showed significant COX-2 inhibition, similar to the positive control group. It was confirmed that the inhibition of the COX-2 expression, but the effect did not affect the balance between prostacyclin and TXB<sub>2</sub>. These results indicate that rosemary showed COX-2 inhibition activity with a low risk of cardiovascular diseases.

**Keywords** Cyclooxygenase-1 · Prostaglandin E<sub>2</sub> · Rosemary · Selective cyclooxygenase-2 · Thromboxane B<sub>2</sub>

Ji Yeon Kim (✉)  
E-mail: jiyeonk@seoultech.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology; 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Nano Bio Engineering, Seoul National University of Science and Technology; 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Republic of Korea

<sup>3</sup>CJ CheilJedang Food & Nutrition Tech; 330 Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서론

로즈마리는 꿀풀과에 속하며, 꿀풀과의 식물들은 높은 항산화 작용을 하는 활성 성분을 가지고 있다. 로즈마리의 주요 활성 성분에는 ursolic acid (UA), carnosic acid, carnosol 등이 있으며, 특히 2차 대사산물 그룹인 트리테르펜 중 하나인 UA는 항염 및 항암 기능이 있다고 알려져 있다[1-5]. 로즈마리를 포함한 9종의 허브의 UA 함량을 분석한 연구에서 로즈마리와 세이지에서 UA 함량이 제일 높았으며[6], Huang 등의 연구에 따르면 로즈마리 메탄올 추출물을 HPLC로 분석한 결과 16.5-19.2%의 UA가 carnosic acid, carnosol 대비 높게 함유된 것으로 나타났다[4]. 이처럼 로즈마리 추출물은 높은 함량의 UA를 함유하고 있다.

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid가 prostaglandin (PG) 및 thromboxane (TX)로 대사되는 과정에 작용하는 효소이다[7]. COX의 isoform에는 COX-1과 COX-2가 있다. COX-1은 대부분의 세포에서 구성적으로 발현되며 위나 신장에서 생리적으로 중요하게 작용하는 prostanoids를 생산한다. 반면 COX-2는 염증 자극에 의해 유도되면서, 염증을 일으키는 PGs를 합성한다[8,9].

Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs)는 해열, 진통, 소염 기능을 하는 약이다. NSAIDs는 COX-1, 2를 비선택적으로 저해하여 PG, TX 및 prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)의 생성을 막아 염증을 조절한다[10]. 하지만 NSAIDs는 신장의 기능에 영향을 주고, 위장관 출혈을 일으키는 등 여러 부작용이 있으며 이는 COX-1의 작용을 억제하여 생기는 것으로 알려져 있다[11].

이에 NSAIDs의 위장관 부작용을 줄일 수 있는 방법으로 선택적 COX-2 억제제가 개발되었다. 선택적 COX-2 억제제는 염증 반응 시에 유도되어 통증, 부기, 불편함을 유발하는 COX-2만 억제하고, 장 독성 부작용이 적다. 하지만 선택적 COX-2 저해제는 내피세포에서 COX-2 유래의 혈관확장, 항응집성의 PGI<sub>2</sub>의 생성을 감소시켜 COX-1 유래의 혈소판 응집 및 혈관 수축 기능을 하는 TXA<sub>2</sub>의 작용에 유리하게 만들어 심혈관 혈전을 일으킬 수 있다고 알려져 있다[12,13].

이처럼 부작용을 극복하는 문제와 관련 지어 최근에는 천연물에서 활성성분 및 기능성을 확인하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 최적화된 추출공정을 통하여 유효성분인 UA의 함량을 극대화하였고, UA 함량에 따른 로즈마리 추출물(RE)의 COX 효소와 유전자 발현에 미치는 항염증 효과와 이와 관련하여 심혈관계 부작용의 위험성을 가지는지 안전성을 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 로즈마리 추출물 제조

RE의 제조는 로즈마리 분말에 물과 에탄올을 1:1 비율로 혼합한 용액을 고형분 대비 5배 첨가하여 85 °C에서 2시간 30분 동안 추출기를 이용하여 3회 반복 추출하였다. 추출물은 감압농축기로 농축하고, 분무건조기를 사용하여 분무건조 후 분말을 제조하였다. 분무건조가 완료된 시료는 HPLC 분석을 통해 UA 함량이 40%와 50% 되도록 하여 최종적으로 40% RE와 50% RE를 제조하였다.

### COX-2, COX-1 효소 활성 저해율 측정

COX-2, COX-1 효소 활성 저해확인용 COX-2 inhibitor screening kit (fluorometric) (Abcam, Cambridge, UK), COX-1 inhibitor assay kit (fluorometric) (Abcam)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행되었다. 40, 50% RE와 rofecoxib (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich Co.), celecoxib (Sigma Aldrich Co.)는 ethanol (Sigma Aldrich Co.)에 용해 및 희석하여 사용하였다. 96 well black/clear bottom plate에 각 시료를 10 µL/well 분주 후 reaction master mix를 80 µL 넣어주었다. 이후 모든 well에 멸균한 3차 증류수로 희석한 arachidonic acid/NaOH 용

액을 10 µL 넣어 반응을 시작시킨 후 25 °C, kinetic, Ex/Em = 535/587 nm 조건에서 10분간 30초 간격으로 multimode fluorescence microplate reader (Molecular devices, LLC., San Jose, CA, USA)를 이용해 형광을 측정하였다.

### 세포배양

본 연구에서 사용한 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest, Nuaille', Cholet, France), 2% penicillin-streptomycin (Biowest)과 2% HEPES (Biowest)가 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Biowest)배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 배양하였다.

### 세포 생존율 측정

40, 50% RE와 celecoxib, rofecoxib의 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 방법을 이용하였다[14]. 40, 50% RE와 rofecoxib는 DMSO, celecoxib는 ethanol에 용해하여 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Biowest)로 농도에 맞게 희석한 후 사용하였다. 96-well plate에 RAW 264.7 세포 1.8×10<sup>4</sup> cells/well을 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 제거하고 FBS를 제외한 배지 180 µL를 넣어주고 각 시료 20 µL를 처리한 후 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이어서 빛을 차단하고 MTT 시약(Sigma Aldrich Co.) 5 mg/mL를 분주한 후 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 생성된 formazan을 DMSO 100 µL로 녹여준 후 microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음과 같이 계산하였다. Cell viability (%) = (시료 처리군의 흡광도/시료 무처리군의 흡광도)×100

### COX-2, COX-1 유전자 발현 분석

40, 50% RE와 celecoxib, rofecoxib의 RAW 264.7 세포에서 COX-2, COX-1 유전자 발현을 확인하기 위해 real-time PCR을 수행하였다. 6-well plate에 세포를 1.0×10<sup>6</sup> cells/well 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 40, 50% RE 및 rofecoxib는 DMSO, celecoxib는 ethanol에 용해한 후 DPBS로 농도에 맞게 희석하여 사용하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 FBS를 제외한 배지 1.8 mL를 넣어주었다. 그 후 조건에 맞게 각 시료 및 lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/mL) 200 µL를 처리하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 배양하였다. 그 후 Trizol (Life Technologies, Rockville, MD, USA)을 사용하여 RNA를 추출하였고, transcript first strand cDNA synthesis kit (Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 cDNA를 역전사 방법으로 합성하였다. mRNA 발현은 comparative 2-ΔΔCT method를 이용하여 계산하였고 GAPDH로 정규화 하였다. 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다: COX-1 forward 5'-AGTGC GGTC CAACCTTATCC-3' and reverse 5'-CCGCAG GTGATACTGTCGTT-3'; COX-2 forward 5'-GATGCTCTTCC GAGCTGTG-3' and reverse 5'-GGATTGGAACAGCAAGGAT TT-3'; GAPDH forward 5'-AAGAGGGATGCTGCCCTTAC-3'

and reverse 5'-CCATTTGTCTACGGGACGA-3'

### Prostaglandin E<sub>2</sub> 측정

40, 50% RE와 celecoxib, rofecoxib의 RAW 264.7 세포에서 PGE<sub>2</sub> 생성을 확인하기 위해 Prostaglandin E<sub>2</sub> Assay를 수행하였다. 6-well plate에 세포를 1.0×10<sup>6</sup> cells/well 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 40, 50% RE 및 rofecoxib는 DMSO, celecoxib는 ethanol에 용해한 후 DPBS로 농도에 맞게 희석하여 사용하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 FBS를 제외한 배지 1.8 mL를 넣어주었다. 그 후 조건에 맞게 각 시료 및 LPS (1 µg/mL) 200 µL를 처리하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 배양하였다. 그 후 세포 배양액을 회수하여 1,000 rpm, 4 °C에서 3분 동안 원심분리 하여 다시 상층액을 회수한 후 -20 °C에 보관하였다. 세포 배양액의 PGE<sub>2</sub> 농도는 Prostaglandin E<sub>2</sub> Parameter Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다. Plate에 각 시료 및 primary antibody 시약을 분주 후 23 °C, micro plate shaker 500±50 rpm에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 PGE<sub>2</sub> conjugate 시약을 분주하고 같은 조건의 shaker에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 wash buffer로 4차례 wash 후 암실에서 substrate solution을 분주하였으며 23 °C에서 30분 동안 방치하였다. Stop solution을 분주하고 시약을 잘 섞어준 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Thromboxane B<sub>2</sub> 측정

40, 50% RE와 celecoxib, rofecoxib의 RAW 264.7 세포에서 TXA<sub>2</sub> 생성을 확인하기 위해 Thromboxane B<sub>2</sub> Assay를 수행하였다. TXB<sub>2</sub>는 TXA<sub>2</sub>가 가수분해된 형태로 더 안정하여 TXA<sub>2</sub>의 양을 측정할 때 대신 사용된다. 실험에 사용한 세포 배양액은 PGE<sub>2</sub>와 동일한 방법으로 회수 및 보관하였다. 세포 배양액의 Thromboxane A<sub>2</sub> 농도는 Thromboxane B<sub>2</sub> Parameter Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다. Plate에 각 시료 및 primary antibody 시약을 분주 후 23 °C, micro plate shaker 500±50 rpm에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 TXB<sub>2</sub> conjugate 시약을 분주하고 같은 조건의 shaker에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 wash buffer로 4차례 wash 후 암실에서 substrate solution을 분주하였고 23 °C에서 30분 동안 방치하였다. Stop solution을 분주하고 시약을 잘 섞어준 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계처리

결과 값은 Statistical Analysis Systems package version 9.4 (SAS institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 분석하였고, 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 각 시험군 간 유의성( $p < 0.05$ )을 확인하기 위해 일원배치 분산분석(One-way analysis of variance)을 시행한 후, 사후 검정으로 Duncan's multiple range test 및 Dunnett's test를 수행하였다. Duncan의 결과는 알파벳으로, Dunnett의 결과는 별표(\*)로 표시하였다.

## 결 과

### 로즈마리 추출물이 COX-2 및 COX-1 효소 활성 억제에 미치는 영향

40, 50% RE의 COX-2, COX-1 효소 활성 억제 결과를 Fig. 1에 나타내었다. COX-2 저해 결과 40% RE의 COX-2 저해율은 농도 의존적으로 증가하여 100 µg/mL에서 85.92%의 유의한 저해율을 보였고, 50% RE는 100 µg/mL에서 65.09%의 유의한 저해 효과를 보였다. 양성 대조군인 celecoxib는 1, 10, 100 µM에서 각각 67.86, 89.30, 96.02%로 농도 의존적으로 저해율이 유의적으로 증가하였고, rofecoxib는 83.40, 92.26, 87.14%로 농도에 관계없이 비슷한 저해율을 보였다(Fig. 1A).

COX-1 저해 결과 40, 50% RE는 100 µg/mL에서 각각 29.12, 18.29%의 COX-1 저해 효과를 보였다. 양성 대조군인 celecoxib는 10과 100 µM에서 각각 40.15, 40.28%의 유의한 저해율을 보였고, rofecoxib는 모든 농도에서 저해 효과를 보이지 않았다(Fig. 1B).

따라서 40, 50% RE는 100 µg/mL 농도에서 각각 양성 대조군과 비슷한 수준으로 COX-2 효소 활성을 억제하였으며, 40% RE 10 µg/mL 이하의 농도에서는 미미한 COX-2 저해율을 보였다. COX-1 효소 활성 억제를 관련하여 celecoxib를 제외한 샘플에서 거의 저해하지 않은 것으로 확인 되었다.

### 로즈마리 추출물의 세포 독성 농도 확인

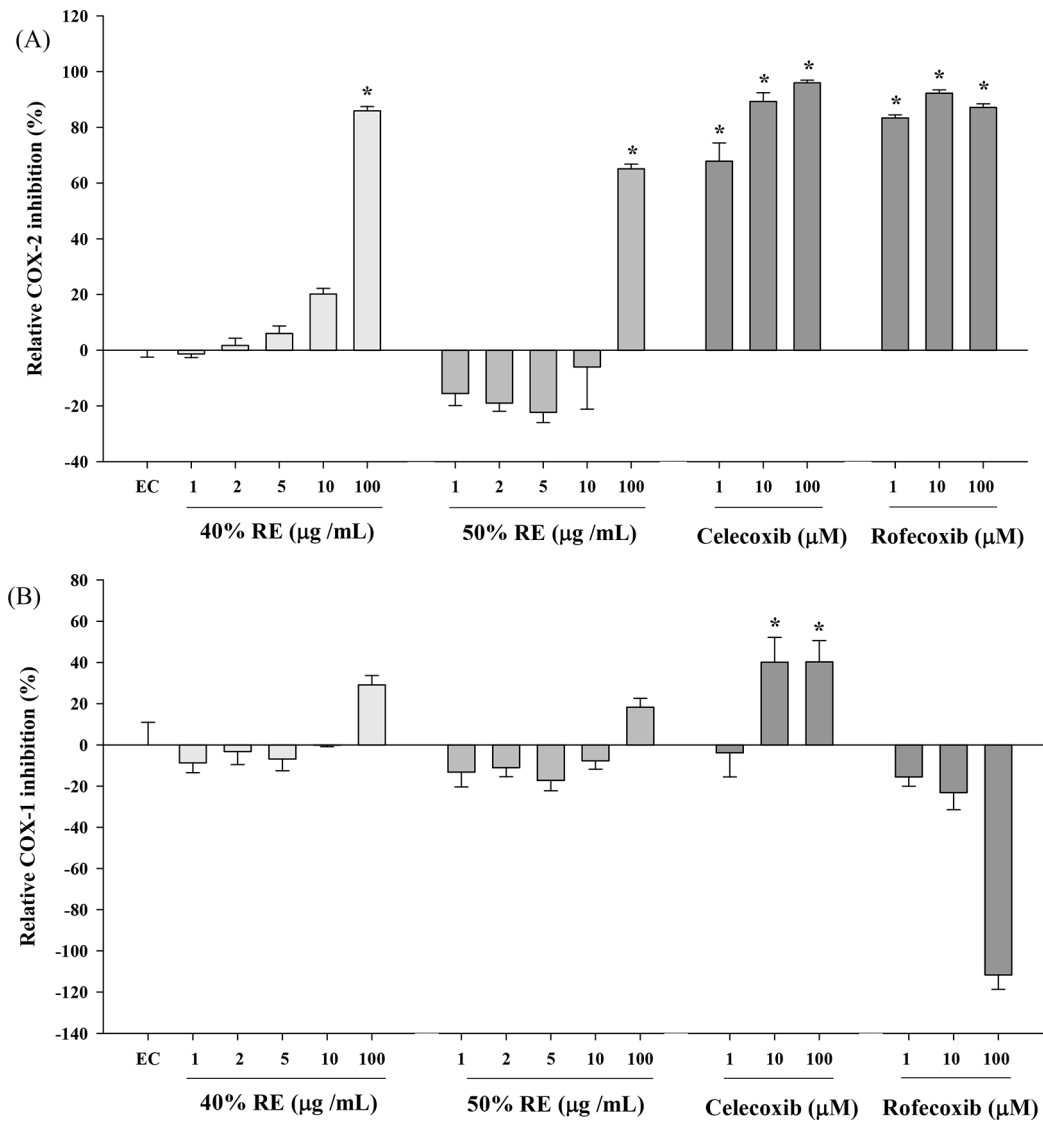
RAW 264.7 세포에 40, 50% RE와 celecoxib, rofecoxib를 농도별로 처리한 MTT assay결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험 결과 40, 50% RE는 1 µg/mL, celecoxib와 rofecoxib는 100 µM 이하의 농도에서 80% 이상의 생존율을 보였다. 이후 실험에서는 독성을 나타내지 않는 40, 50% RE 1 µg/mL, celecoxib와 rofecoxib는 100 µM를 사용하였다.

### 로즈마리 추출물이 COX-2 및 COX-1 유전자 발현에 미치는 영향

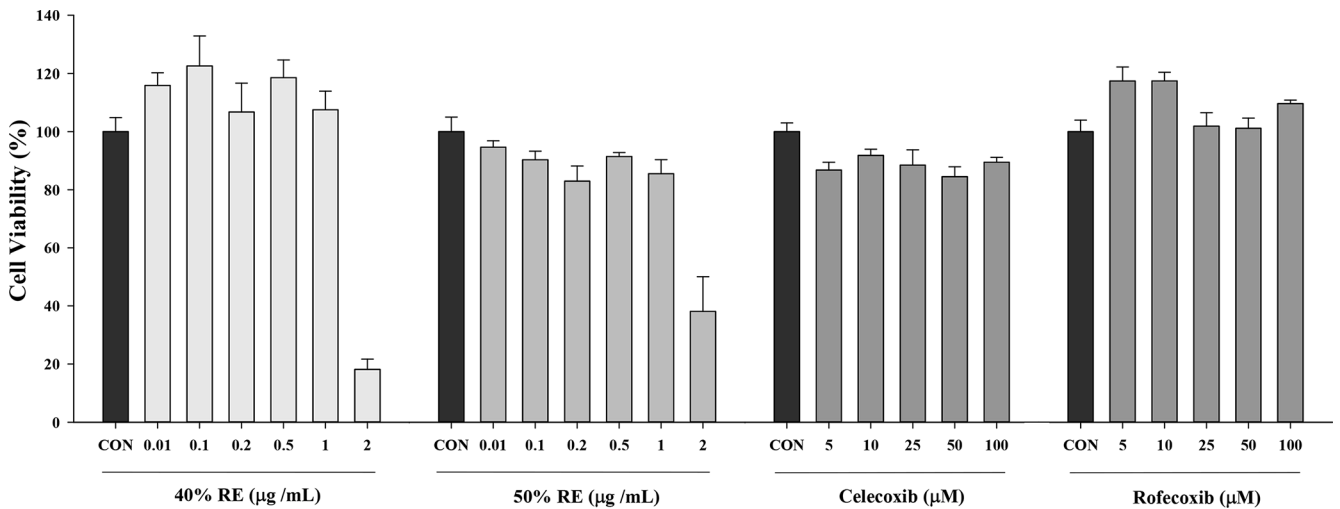
RAW 264.7 세포에 조건에 따라 40, 50% RE 1 µg/mL, celecoxib, rofecoxib 100 µM과 LPS 1 µg/mL를 처리한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. LPS를 24시간 전처리한 후 시료를 24시간 처리한 조건에서는 LPS 유도군 대비 40, 50% RE 및 양성 대조군 rofecoxib 처리군에서 COX-2 유전자 발현에 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면에 양성 대조군인 celecoxib는 LPS 유도군 대비 COX-2 유전자 발현이 유의적으로 감소하였다. COX-1 유전자 발현은 모든 군에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3A).

40, 50% RE와 양성 대조군 celecoxib, rofecoxib를 24시간 처리한 후 LPS를 24시간 후처리한 조건에서 LPS 유도군 대비 40% RE 처리군에서 COX-2 유전자 발현은 유의적으로 감소하였고, 50% RE 처리군에서는 유의적으로 증가하였다. 양성 대조군인 celecoxib와 rofecoxib는 LPS 처리군 대비 COX-2 유전자 발현이 유의적으로 감소하였다. COX-1 유전자 발현은 모든 군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3B).

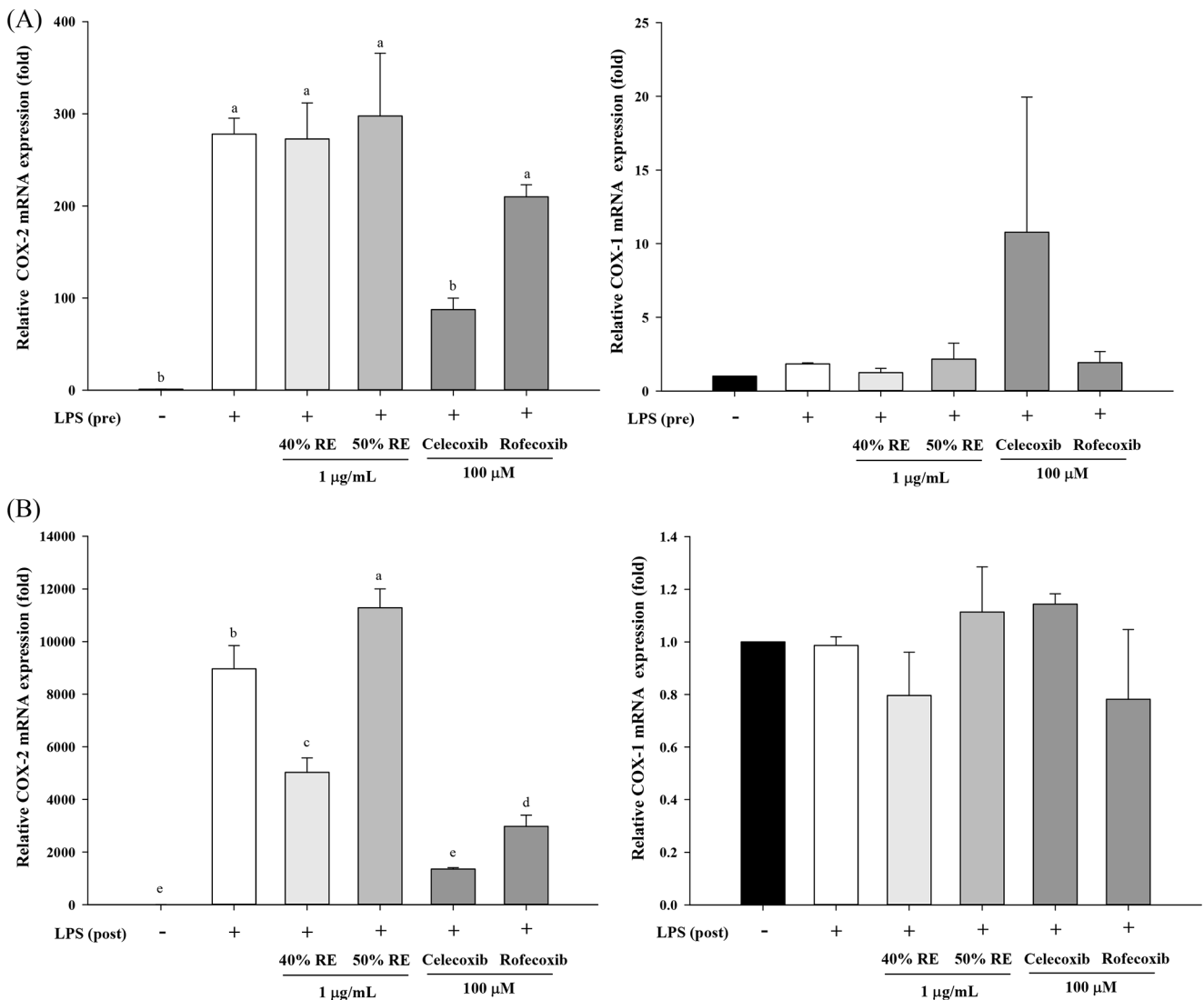
따라서 LPS를 후처리한 조건에서만 40% RE가 양성 대조군



**Fig. 1** Analysis of COX-2 (A) and COX-1 (B) inhibition by 40% RE, 50% RE, celecoxib, and rofecoxib. COX, cyclooxygenase; RE, rosemary extract



**Fig. 2** Viability of RAW 264.7 cells treated with 40% RE, 50% RE, celecoxib, and rofecoxib. RE, rosemary extract



**Fig. 3** Analysis of COX-2 and COX-1 mRNA expression in RAW 264.7 cells preinduced (A) and postinduced (B) for 24 hours with LPS (1 µg/mL) treated with 40% RE, 50% RE, celecoxib, and rofecoxib for 24 h. COX, cyclooxygenase; LPS, lipopolysaccharide; RE, rosemary extract

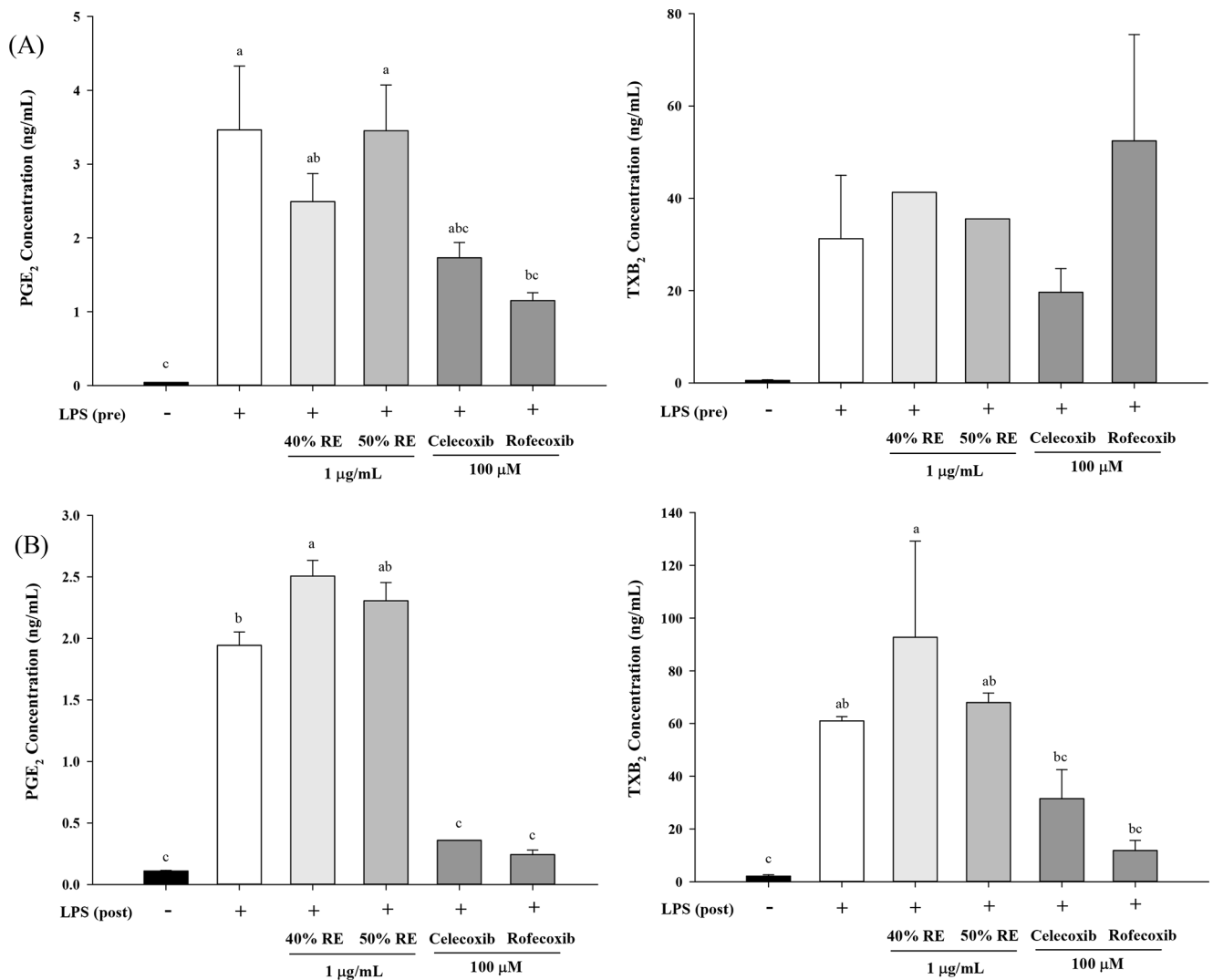
과 유사한 수준으로 COX-2 유전자 발현을 억제하였고, LPS를 전처리한 후 시료를 처리한 조건의 양성 대조군인 celecoxib가 COX-2 유전자 발현을 억제하였다.

**로즈마리 추출물 처리 세포 배양 상층액의 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 농도 확인**

세포 배양액의 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 농도를 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. LPS를 24시간 전처리한 후 시료를 24시간 처리한 조건에서는 LPS 유도군의 PGE<sub>2</sub> 농도는 3.5 ng/mL로 측정되었다. 40% RE 처리군의 PGE<sub>2</sub>는 2.5 ng/mL로 LPS 유도군 대비 낮은 경향을 보였고, 50% RE 처리군의 PGE<sub>2</sub> 농도는 3.5 ng/mL로 LPS 처리군과 유의적인 차이가 없었다. 반면, LPS 유도군 대비 양성 대조군 celecoxib는 PGE<sub>2</sub>의 농도가 감소하는 경향을 보였고 rofecoxib는 유의적으로 감소하였다. TXB<sub>2</sub> 수준에 대해서는 구간 유의적인 차이가 없었다(Fig. 4A).

40, 50% RE, celecoxib, rofecoxib를 24시간 처리한 후 LPS를 24시간 후처리한 조건에서 LPS 유도군의 PGE<sub>2</sub> 농도는 1.9 ng/mL로 측정되었다. 40% RE 처리군에서는 PGE<sub>2</sub> 농도는 2.5 ng/mL로 LPS 대비 유의적으로 증가하였고, 50% RE 처리군의 PGE<sub>2</sub> 농도는 2.3 ng/mL로 LPS 대비 증가하는 경향을 보였다. 양성 대조군 celecoxib와 rofecoxib는 대조군 농도만큼 유의적으로 감소하였다. TXB<sub>2</sub> 농도는 LPS 유도군에서 61.0 ng/mL로 측정되었고, 40, 50% RE 처리군에서는 각각 92.7과 68.0 ng/mL이었으며 LPS군 대비 증가하는 경향을 보였다. 반면에 celecoxib와 rofecoxib는 LPS 대비 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4B).

따라서 40, 50% RE 처리군이 염증 조건에서 LPS 유도군과 비슷하거나 미비한 감소 결과를 보인 것으로 보아 40, 50% RE가 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 조절에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다.



**Fig. 4** Analysis of PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub> concentrations in the supernatants of LPS (1 µg/mL) preinduced (A) and LPS (1 µg/mL) postinduced (B) RAW 264.7 cells treated with 40% RE, 50% RE, celecoxib, and rofecoxib for 24 h. COX, cyclooxygenase; LPS, lipopolysaccharide; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; RE, rosemary extract; TXB<sub>2</sub>, thromboxane B

## 고찰

NSAIDs의 COX-1 저해로 인한 위장관 부작용을 줄이기 위해 선택적 COX-2 저해제가 개발되었지만, 선택적 COX-2 저해제가 심혈관 혈전 생성을 증가시킬 수 있다는 의견이 제기되었다 [12]. COX는 arachidonic acid가 PGs 및 TX로 대사되는 과정에 관여하는 효소로 COX-1과 COX-2로 나뉜다[7]. COX-2는 혈관 내벽 세포에서 항응집, 혈관 확장을 일으키는 PGI<sub>2</sub>를 생성하고, COX-1은 혈소판에서 친응집, 혈관 수축을 일으키는 TXA<sub>2</sub>를 생성한다. 따라서 COX-2를 선택적으로 저해할 경우 친응집성의 TXA<sub>2</sub>의 작용이 커지면서 심혈관계에 혈전을 형성할 가능성이 있다고 보고되었다[13,15]. 선택적 COX-2 저해제의 종류에는 celecoxib, rofecoxib, valdecoxib 등이 있는데, 심혈관 질환의 발생을 증가시킨다는 임상시험 결과가 있으며[16-18], 이중 rofecoxib와 valdecoxib는 시장에서 철수되었다[10,19].

로즈마리는 꿀풀과의 식물로 주요 활성 성분에는 UA, carnosic acid,arnosol 등이 있으며, 다양한 활성 성분들로 인해 RE는 항염, 항암, 항산화 효과를 가지고 있다[1]. RE의 항염증 효과를 연구한 논문에 따르면 RE가 선택적 COX-2 선택적 저해를 보였으며[20], 활성 성분인 carnosic acid와arnosol이 선택적 COX-2 저해를 보여 기존의 NSAIDs보다 부작용이 적을 것이라고 보고된 바가 있다[21].

따라서 본 연구는 UA의 함량을 40, 50%로 극대화한 RE의 항염증 효과를 COX-2 효소 및 유전자 발현을 통해 확인하였고, COX-2를 선택적으로 억제함에 따라 심혈관계 부작용 안전성 여부를 COX-1 및 TXA<sub>2</sub> 농도를 통해 확인하였다.

COX 효소 활성 저해 실험 결과, 40% RE는 농도 의존적으로 COX-2 저해율이 증가하여 100 µg/mL 농도로 처리한 샘플에서 85.92%의 유의한 저해효과를 보였고, 50% RE는 100 µg/mL에서만 65.09%로 유의한 저해효과를 보였다. 양성 대조군인

celecoxib 10, 100  $\mu\text{M}$ 을 제외하고, 40, 50% RE와 양성 대조군인 rofecoxib에서는 COX-1의 유의적인 저해율이 나타나지 않았다.

이후 RAW 264.7 세포에 40, 50% RE 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , celecoxib 및 rofecoxib 100  $\mu\text{M}$ 과 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 조건에 따라 처리하여 염증상태에서 COX-2, COX-1 유전자 발현 및 세포 배양액의  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TXB}_2$  농도를 확인하였다. 그 결과 LPS를 24시간 전처리한 후 40, 50% RE를 24시간 처리한 조건에서는 COX-2 유전자 발현에 유의적인 차이가 없었고, RE를 24시간 처리하고 LPS를 24시간 후처리한 조건에서는 40% RE가 COX-2 유전자 발현을 억제하였다. 또한,  $\text{PGE}_2$ 와  $\text{TXB}_2$  생성에는 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

Shishodia 등의 연구에 따르면 RE에 함유된 주요성분 중 하나인 UA가 Nuclear Factor (NF)- $\kappa\text{B}$  활성화를 억제하였으며, I $\kappa\text{B}$  분해 및 인산화를 억제하였다는 보고가 있으며[22], LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 RE를 처리한 실험에서 NF- $\kappa\text{B}$  및 MAPKs 활성화를 억제하고 NO, COX-2, iNOS 및  $\text{PGE}_2$  생성을 억제하였다는 결과가 있다[23]. 이처럼 RE는 염증 반응에 관여하는 다양한 인자들을 억제하여 염증을 억제하는 효과가 있으며 본 실험에서도 RE가 COX-2 효소 활성 저해 및 COX-2 유전자 발현을 억제하여 항염증 효과를 보였다. 결과적으로 40, 50% RE는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 양성 대조군과 비슷한 수준으로 유의한 COX-2 효소 활성 저해를 보였고, 40% RE를 24시간 전처리한 후 LPS를 후처리한 RAW 264.7 세포에서 유의적으로 COX-2 유전자 발현 억제 효과를 확인하였다.

COX-1은 혈관수축과 혈소판 응집을 촉진하는  $\text{TXA}_2$  생성을 매개하고, COX-2에 의해 생성되는  $\text{PGI}_2$ 는 반대로 혈소판 응집 억제 및 혈관확장 작용을 한다. 이들  $\text{TXA}_2$ 와  $\text{PGI}_2$ 는 균형을 유지함으로써 혈관건강을 유지할 수 있고, 대부분의 NSAID 의약품들은 COX-1과 COX-2 모두를 저해하여 이들 사이의 균형을 유지할 수 있다[24]. 하지만, COX-2를 선택적으로 저해할 경우, 혈전을 억제하는  $\text{PGI}_2$ 의 생성을 저해하여 그 균형이 깨지게 되고  $\text{TXA}_2$ 의 발현이 되면서 혈전을 형성할 가능성이 있다고 가정하여 추가적인 연구를 진행하였다. RE를 처리한 시료군에서 COX-1의 대사산물인  $\text{TXA}_2$ 의 생성에 유의미한 변화는 없었으며, COX-2의 대사산물인  $\text{PGE}_2$  발현에도 영향을 미치지 않았다.

따라서 40, 50% RE는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 COX-2 효소 저해 효과를 보였지만, COX-1과  $\text{TXB}_2$ 의 작용에 큰 영향을 주지 않았기 때문에 혈전 생성에 관여하는 PGs 사이의 균형에 영향을 주지 않아 심혈관 혈전 생성의 위험성이 적을 것으로 사료된다. 향후에는 RE의 성분 분석 및 동물실험에서의 추가적인 메커니즘 확인이 필요할 것으로 생각된다.

## 초 록

선택적 cyclooxygenase (COX)-2 억제제는 기존의 비스테로이드성 소염제의 위장 부작용을 줄일 수 있는 새로운 대체제이다. 하지만, 최근 혈전을 일으켜 심혈관 질환의 위험을 증가시킨다는 보고가 있다. 따라서 본 연구에서는 유효성분인 ursolic acid를 각각 40, 50%로 극대화한 로즈마리 추출물(RE)의 항염증

효과와 이에 따른 심혈관 부작용의 안전성을 확인하였다. RE의 COX 효소 활성 저해 평가 결과 40, 50% RE는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 양성 대조군인 celecoxib 및 rofecoxib와 비슷한 COX-2 저해 활성을 보였고, COX-1 저해 활성은 미미하였다. 이후 Lipopoly-saccharide (LPS)를 조건에 따라 처리한 RAW 264.7 세포에 40, 50% RE 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하여 COX-2, COX-1 유전자 발현, 세포 배양액의 prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), thromboxane  $\text{B}_2$  ( $\text{TXB}_2$ ) 농도를 확인하였다. 실험 결과 COX-2 유전자 발현은 40% RE가 LPS를 24시간 후처리한 조건에서 감소하였고, 40, 50% RE는 COX-1 유전자 발현 및  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TXB}_2$  농도에는 유의한 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 RE는 혈전 생성에 관여하는 prostaglandins의 균형에 영향을 주지 않아 심혈관 혈전 생성의 위험성이 적을 것으로 사료된다.

**Keywords** 로즈마리 · 사이클로옥시게나제-1 · 선택적 사이클로옥시게나제-2 · 트롬복산 · 프로스타글란딘

**감사의 글** 본 연구는 CJ제일제당의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Ngo SNT, Williams DB, Head RJ (2011) Rosemary and Cancer Prevention: Preclinical Perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51: 946–954. doi: 10.1080/10408398.2010.490883
2. Loussouam M, Krieger-Liszkay A, Sivilar L, Bily A, Birtic S, Havaux M (2017) Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms. *Plant Physiol* 175: 1381–1394. doi: 10.1104/pp.17.01183
3. Liu J (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49: 57–68. doi: 10.1016/0378-8741(95)90032-2
4. Huang M-T, Ho C-T, Wang ZY, Ferraro T, Lou Y-R, Stauber K, Ma W, Georgiadis C, Laskin JD, Conney AH (1994) Inhibition of Skin Tumorigenesis by Rosemary and Its Constituents Carnosol and Ursolic Acid. *Cancer Res* 54: 701–708
5. Borrás-Linares I, Stojanović Z, Quirantes-Piné R, Arráez-Román D, Švare-Gajić J, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A (2014) Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int J Mol Sci* 15: 20585–20606. doi: 10.3390/ijms151120585
6. ZANNOU O, İPEKÇİ B, İLKAY K, ODABAŞ Hİ (2022) Assessing ursolic acid contents of some commonly consumed herbs grown in Turkey. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 12: 301–308. doi: 10.17714/gumusfenbil.931509
7. Lee E, Lee J, Han H (2015) Drug-induced cardiovascular disorders. *J Med Life Sci* 12: 20–22. doi: 10.3390/ijms151120585
8. Pairet M, Engelhardt G (1996) Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* 10: 1–15. doi: 10.1111/j.1472-8206.1996.tb00144.x
9. Donnelly M, Hawkey C (1997) COX-II inhibitors—a new generation of safer NSAIDs? *Aliment Pharmacol Ther* 11: 227–235. doi: 10.1046/j.1365-2036.1997.154330000.x
10. Kim D, Sung Y-K (2016) New COX-2 Inhibitors. *Korean J Med* 91: 250–256
11. Rainsford KD (1999) Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med* 107: 27S–35S; discussion 35S–36S. doi: 10.1016/S0002-9343(99)00365-4
12. Mukherjee D (2002) Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and

- potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol* 63: 817–821. doi: 10.1016/S0006-2952(02)00842-0
13. Iadecola C, Gorelick PB (2005) The Janus face of cyclooxygenase-2 in ischemic stroke: shifting toward downstream targets. *Stroke* 36: 182–185. doi: 10.1161/01.STR.0000153797.33611.d8
  14. Gerlier D, Thomasset N (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 94: 57–63. doi: 10.1016/0022-1759(86)90215-2
  15. Park M-G, Yoo J-D, Lee K-H (2020) Current Guidelines for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *J Korean Orthop Assoc* 55: 9–28. doi: 10.4055/jkoa.2020.55.1.9
  16. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanus A (2005) Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 352: 1092–1102. doi: 10.1056/NEJMoa050493
  17. Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoefl A, Parlow JL, Boyce SW, Verburg KM (2005) Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* 352: 1081–1091. doi: 10.1056/NEJMoa050330
  18. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zuber A, Hawk E, Bertagnoli M (2005) Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* 352: 1071–1080. doi: 10.1056/NEJMoa050405
  19. Antman EM, DeMets D, Loscalzo J (2005) Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 112: 759–770. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.568451
  20. Yi W, Wetzstein HY (2010) Biochemical, biological and histological evaluation of some culinary and medicinal herbs grown under greenhouse and field conditions. *J Sci Food Agric* 90: 1063–1070. doi: 10.1002/jsfa.3921
  21. Mengoni ES, Vichera G, Rigano LA, Rodriguez-Puebla ML, Galliano SR, Cafferata EE, Pivetta OH, Moreno S, Vojnov AA (2011) Suppression of COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia* 82: 414–421. doi: 10.1016/j.fitote.2010.11.023
  22. Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB (2003) Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  Kinase and p65 Phosphorylation: Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D11. *Cancer Res* 63: 4375–4383
  23. Yu M-H, Choi J-H, Chae I-G, Im H-G, Yang S-A, More K, Lee I-S, Lee J (2013) Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem* 136: 1047–1054. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.085
  24. Segev G, Katz RJ (2004) Selective COX-2 inhibitors and risk of cardiovascular events. *Hospital Physician Feb*: 39–43