

## 추출 방법에 따른 홍삼의 항산화 및 항염 효과

### Antioxidant and Anti-inflammatory Effect of Red Ginseng by Different Extraction Methods

김경아<sup>1)</sup> · 한인화<sup>1)</sup> · 금경숙<sup>2)</sup> · 안예빈<sup>3)</sup> · 이지영<sup>3)</sup> · 정수지<sup>3)</sup> · 조진아<sup>1),\*</sup>

충남대학교 식품영양학과 교수<sup>1)</sup>, 충남대학교 식품영양학과 석사과정<sup>2)</sup>,

충남대학교 식품영양학과 학사과정<sup>3)</sup>

Kim, Kyung-Ah<sup>1)</sup> · Han, In-Hwa<sup>1)</sup> · Keum, Kyeong-sook<sup>2)</sup> · An, Yebin<sup>3)</sup> · Lee, Jiyeong<sup>3)</sup> ·  
Jeong, Suji<sup>3)</sup> · Cho, Jin Ah<sup>1),\*</sup>

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University<sup>1),2),3)</sup>

#### Abstract

Red ginseng (RG) is known for its preventive effects on various disease, including inflammatory diseases and cancer. However, few studies have compared the effects of different RG extraction methods. In this study, the effect of RG extracts prepared by agitation or ultrasound on antioxidant and anti-inflammatory activities was investigated. Total phenol and flavonoid content and DPPH radical scavenging activity were considerably increased by the RG extracts in dose-dependent manners, but there was no significant difference between the extraction methods. Raw 264.7 macrophages treated with up to 400 µg/mL of RG extracts proliferated significantly but decreased to less than 50% at 800 µg/mL of either extract. The expression of the inflammatory marker COX-2 protein was decreased in a dose-dependent manner, especially with ultrasonicated RG extract, indicating increased anti-inflammatory activity of RG. In conclusion, our data demonstrated that RG extract prepared by either agitation or ultrasound extraction methods had antioxidant effects and promoted immune cell proliferation. However, RG extract extracted by ultrasound exerted a greater anti-inflammatory effect on immune cells, suggesting that the extraction method should be selected based on the intended application.

**Keywords:** Red ginseng, Antioxidant, Anti-inflammatory, Ultrasound extraction, Agitation extraction

## I. 서론

최근 우리 나라는 인구의 초고령화와 더불어 서구화된 식생활로 인해 고지혈증, 고혈압, 당뇨병 등의 생활습관병 유병률이 증가하고 있다. 이를 예방하고 건강을 증진하기 위한 다양한 기능성 식품의 요구 및 소비 또

한 증가 추세이며, 인삼은 그 중 가장 대표적인 기능성 식품이다. 오래전부터 동양권에서 인삼의 다양한 효능이 알려져 있으며, 전통적으로 민간요법, 차 혹은 요리에 많이 활용되어 왔다.

인삼은 가공하지 않은 자연상태 그대로인 수삼과 가공 방법에 따라 백삼, 홍삼, 흑삼으로 분류된다(남기열

본 논문은 2022년 대한민국 교육부와 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2022R1A2C1091570)

\* Corresponding author: Cho, Jin Ah

Tel:+82-42-821-6833, Fax:+82-42-821- 8887

E-mail: jacho@cnu.ac.kr

© 2023, Korean Association of Human Ecology. All rights reserved.

외, 2012). 수삼을 햇볕이나 열풍 등의 방법으로 건조시키면 백삼이며, 껍질이 있는 상태에서 찢 후에 말리면 홍삼이다. 수삼을 아홉 번 찢고 말리는 과정을 반복하는 전통적 한약의 가공법인 '구중구포'로 제조된 인삼은 점차 검은색을 띠게 되어 흑삼이라 불린다(이지현 외, 2006). 이와 같은 다양한 가공법으로 인삼의 보존력과 주요 성분 함량을 변화시켜 효능을 향상시킬 수 있으며, 특히 홍삼과 흑삼의 경우 열처리 과정에서 각종 효소들이 불활성화되어 저장성이 좋아질 뿐 아니라 전분 입자가 호화 되어 백삼보다 소화율이 증가된다(남기열 외, 2012; Kitagawa et al., 1987).

홍삼은 아시아 국가에서 여러 질병을 치료하기 위한 전통적 약재로 사용되어 왔다(Lee et al., 2015). 홍삼에는 면역, 피로, 알레르기, 암에 약리학적 효과가 있으며(Choi et al., 2011; Kee et al., 2017), 홍삼에 있는 주요 성분인 진세노사이드(ginsenoside)들 중, Rg3, Rh1, Rh2, Rh4, Rf2 등이 한국 홍삼에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이 중 Rh1은 비알코올성 지방간이나 만성 염증 질환을 완화한다고 보고 하였다(Chen et al., 2017; Li et al., 2014). 또한 홍삼은 면역 체계를 조절하여 질병에 대한 저항력을 향상시킨다고 알려졌으며, 특히 고려 홍삼의 농도에 따른 비장에 있는 면역세포의 기능 향상을 보고하였다(정노팔, 2007; 박이성, 2012).

그러나 현재까지 추출 방법에 따른 홍삼 추출물의 기능성을 비교한 연구는 여전히 부족하다. 이에 본 연구에서는 교반법과 초음파를 이용한 홍삼 에탄올 추출물의 항산화 기능을 비교하고, 각각의 추출물을 처리한 RAW264.7 면역세포에 염증을 일으킨 후 COX-2의 발현양을 조사하여 각 추출법에 따른 추출물의 항염증 효과를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 추출

본 연구에서 홍삼은 금산에서 재배된 4년생 고려 홍삼 가루(Yangjihongsam, Geumsan, Korea)를 구입하여 사용하였다. 홍삼 시료의 교반 추출을 위해 홍삼 시료 5 g에 80 % 에탄올(Daejung Chemicals & Metals, Siheung-si, Korea) 30 mL을 혼합한 후 마그네틱 플레이트에서 30

분간 300 rpm의 속도로 교반 후 Whatman No.1 여과지(Whatman, Maid Stone, UK)로 여과하여 여과액을 수집하였다. 이 여과액에 새로운 10 mL의 에탄올을 혼합하고 동일하게 교반 후 여과지를 통해 여과액을 수집하였고 이 과정을 추가 반복하여 50 mL의 추출액을 수집하였다. 100 mg/mL로 농도를 맞춘 추출액은 0.2  $\mu$ m membrane(Biofact, Daejeon, Korea)에 여과하여 -20  $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 홍삼 시료의 초음파(ultrasound) 추출을 위해 시료 5 g에 80 % 에탄올 30 mL를 혼합한 후 40 KHz 초음파기(DAIHAN<sup>®</sup> Analog Ultrasonic Cleaner "WUC-A", DAIHAN Scientific, Daegu, Korea)에서 15분 동안 추출한 후 Whatman No.1 여과지로 여과하는 과정을 3번 반복하여 50 mL 초음파 추출액을 준비하였다. 추출액의 농도는 100 mg/mL로 맞추어 0.2  $\mu$ m membrane에 여과 후 -20  $^{\circ}$ C에 보관하였다.

### 2. 항산화능 평가

#### 1) 총 페놀 함량 측정

교반과 초음파 추출법으로 준비된 홍삼 추출액을 1/2로 각각 희석 후 원액과 희석액의 총 페놀 함량을 Folin-Ciocalteu 법을 변형하여 측정하였다(김혜진 외, 2015). 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Daejung Chemicals & Metals, Gyeonggi-do, Korea) 용액 20 mL를 시료 추출액 0.2 mL와 혼합하고 2분 뒤 50 % Folin-Ciocalteu's (JUNSEI, Kyoto, Japan) 시약 0.2 mL를 넣고 섞은 후 상온에서 30분간 방치한 후 UV-1800 UV-VIS 분광광도계(uv-1800 uv/visible scanning spectrophotometer SHIMADZU, Kyoto, JAPAN)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferulic acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 사용하여  $\mu$ g Ferulic Acid Equivalent(FAE)/mL로 표시하였다.

#### 2) 총 플라보노이드 함량 측정

교반 추출법과 초음파 추출법으로 준비된 홍삼 추출액을 1/2로 각각 희석 후 원액과 희석액의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 시료 추출물 0.2 mL에 2 mL의 diethylene glycol(Daejung Chemicals & Metals)과 0.2 mL의 1 N NaOH(Daejung Chemicals & Metals)를 첨가하여 37  $^{\circ}$ C의 water bath (B-491, Buchi labortechnik AG, Flawil, Switzerland)

에서 1시간 동안 반응시킨 후, UV-VIS분광광도계(uv-1800 uv/visible scanning spectrophotometer SHIMADZU)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin(Sigma-Aldrich)을 사용하여 mg Quercetin Equivalent(QE)/g으로 나타내었다(NFRI, 1990).

### 3) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능 측정

Blois의 방법을 변형하여 DPPH 라디칼 소거능 측정으로 홍삼 추출액의 항산화 활성을 측정하였다(Blois, 1958). 홍삼 추출물 0.5 mL에 0.4 mM의 DPPH 용액(Sigma-Aldrich) 5 mL를 넣고 30분간 암실에 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)(Sigma-Aldrich)를 표준물질로 하여,  $\mu\text{g}$  Trolox Equivalent Antioxidant Capacity(TEAC)/mL로 표시하였다.

### 3. 세포 배양

RAW264.7 대식 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10 % heat inactivated fetal bovine serum(Gibco, paisley, UK)과 1 % penicillin-streptomycin solution(CORINING, New York, USA), DMEM 배지(GIBCO, in Grand Island, New York)를 사용하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

### 4. 세포 생존율

홍삼의 추출법 및 농도 별 독성 여부를 확인하기 위해 RAW264.7 대식 세포와 EZ-Cytox 키트(DOGEN, Seoul, Korea)를 사용하여 Water-Soluble Tetrazolium (WST) assay를 실시하였다.  $2 \times 10^4$  개의 RAW264.7 세포가 깔린 96 well plate에 홍삼 추출물 0, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 별로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 100  $\mu\text{L}$  배지당 EZ-Cytox 10  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 3시간 후 microplate reader(Tecan Sunrise-Basic, Männedorf, Swiss)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 홍삼이 없는 배지를 처리한 세포군(대조군)을 100 %로 기준하여 상대적 비율로 계산하였다.

### 5. COX-2(cyclooxygenase) 단백질 발현 측정

항염증 활성은 western blot 분석을 통해 COX-2의 단백질 발현량을 측정하였다. Raw 264.7을 6 well plate에 배양 후 0, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 홍삼 추출물에서 24시간 동안 배양하였다. 염증 반응 유도를 위해 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS를 추가로 24시간 처리한 후, 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. Protease inhibitor(Roche, Mannheim, Germany)와 phosphatase inhibitor(Roche)가 들어간 lysis buffer(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 10 mL에 세포를 용해한 후에 4 °C,  $110 \times g$ 에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific)로 단백질을 정량하여, 각 30  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 10 % polyacrylamide gel에 넣어 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)로 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기(BIORAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane(Sigma-Aldrich)에 옮긴 다음, 실온에서 1시간 동안 blocking buffer(5 % skim milk in tris-buffered saline and tween 20 (TTBS), VWR Life Science, Suwon, Korea)에 방치하였다. COX-2 단백질 발현량을 확인하기 위해 COX-2 (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA),  $\beta$ -actin(Santa Cruz, Dallas, TX, USA) 1차 항체를 1:1,000으로 희석하여 4 °C에 16시간 반응 후, 5분 간격으로 TTBS로 3 회 세척하였다. COX-2의 2차 항체는 horseradish peroxidase가 결합된 anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology)를 1:2,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 배양한 후 TTBS로 5분간 3 회 세척하였다.  $\beta$ -actin의 2차 항체는 anti-mouse(Santa Cruz, Dallas, TX, USA)를 사용하고 1:1,000 비율로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 다시 TTBS로 3 회 세척한 후 membrane에 Ez West Lumi-plus(ATTO, Tokyo, Japan)를 분주하여 Chemi-doc(LuminoGraph II, ATTO Co., Tokyo, Japan)로 단백질을 가시화하고, CS Analyzer 4(ATTO)를 사용하여 COX-2와  $\beta$ -actin을 정량화하였다. COX-2 단백질량은  $\beta$ -actin 단백질량에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

### 6. 통계분석

데이터의 통계 처리는 Statistical Package for Social

Science (SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 신뢰수준  $p < 0.05$ 에서 평균값들에 대한 유의성을 검증하였다. 각 항목은 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 시행하고, Duncan's test로 사후 검정 하였으며, 두 군간의 비교는 t-test로 평균 차이의 유의성을 검증하였다.

### III. 결과 및 고찰

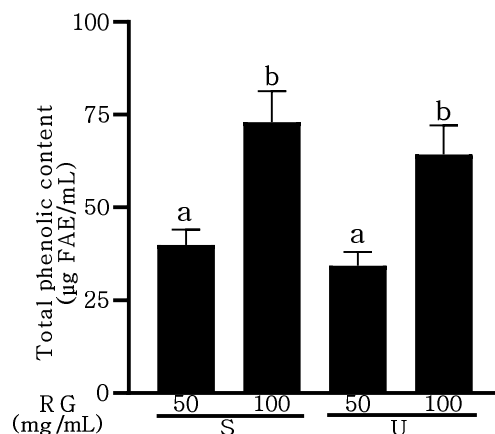
#### 1. 홍삼 추출물의 총 페놀 함량

홍삼을 교반과 초음파 적용한 80 % 에탄올 추출물에서 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하여 페놀 화합물의 총량을 측정하였고 표준물질 Ferulic acid의 분자량을 기준으로  $\mu\text{g FAE}$ 로 환산하여 [그림 1]에 나타내었다. 총 페놀 함량은 두 가지 추출법 모두에서 추출액의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다( $p < 0.001$ ). 가장 많은 총 페놀 함량을 나타낸 추출물은 100 mg/mL 교반 에탄올 추출물로 72.96  $\mu\text{g FAE/mL}$ 을 포함하였으나, 같은 농도의 초음파 에탄올 추출물과 방법상의 유의적인 차이는 없었다. 가장 적은 총 페놀 함량을 나타낸 추출물은 50 mg/mL 초음파 추출물로 34.26  $\mu\text{g FAE/mL}$ 을 포함하였으나, 같은 농도의 교반 에탄올 추출물과 유의적인 차이는 없었다. 고려 인삼과 미국 인삼을 백삼이나 홍삼으로 가공하는 과정에서 maltose, AFG (Arg-Fru-Glc), maltol 함량이 증가하는 것을 확인하였으며, 미국 인삼보다 고려 인삼으로 가공한 홍삼에서

maltol이 더 많이 생성되는 것을 확인할 수 있었다(배봉석 외, 2021). Maltol은 수삼에서는 발견되지 않는 홍삼의 특유한 성분으로 활성 산소 소거능이 뛰어나 생체 조직 손상을 방어해 준다고 알려져 있다. 추출 방법에 따른 6종 약용식물(당귀, 백복령, 상백피, 상엽, 총목피 및 홍삼)의 항산화 효과를 비교한 기존의 연구(정현진 외, 2010)에서 에탄올 추출방법과 초음파 추출 방법을 사용하여 추출방법을 달리 한 홍삼의 페놀성 물질 함량에 차이가 없다고 보고되어 본 연구 결과와 유사한 결과를 보였다.

#### 2. 홍삼 추출물의 총 플라보노이드 함량

추출 방법을 달리한 홍삼 80 % 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 [그림 2]와 같다. 플라보노이드는 유리 라디칼을 중화할 수 있는 항산화능이 높다고 알려져 있으며(Tsao, 2010), 항염증, 항암 효과가 있다고 보고되었다(Heim et al., 2002). 총 페놀 함량 측정과 동일하게 플라보노이드 함량은 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다( $p < 0.001$ ). 가장 많은 총 플라보노이드 함량을 나타낸 추출물은 100 mg/mL 교반 추출물로 113.51 mg QE/g이었으나, 초음파 추출물과 추출 방법에 따른 유의적인 차이는 없었다. 가장 적은 총 플라보노이드 함량을 보인 추출물은 50 mg/mL 교반 추출물로 34.28 mg QE/g을 나타냈으나, 역시 초음파 추출물과 유의적인 차이는 없었다. 총 플라보노이드 물질 함량은 추출 방법보다는 추출 농도에 의한

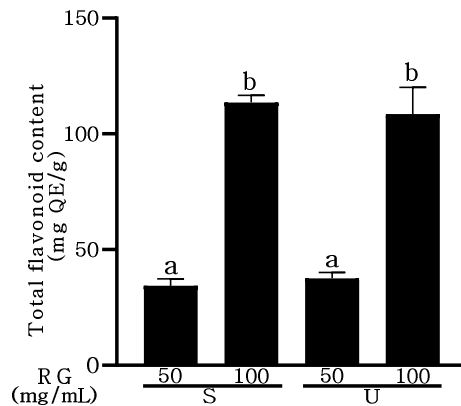


[그림 1] Total phenol content of 80% ethanol extract of red ginseng (RG) by agitation (S) or ultrasound (U). Values are expressed as mean±standard deviation, and values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

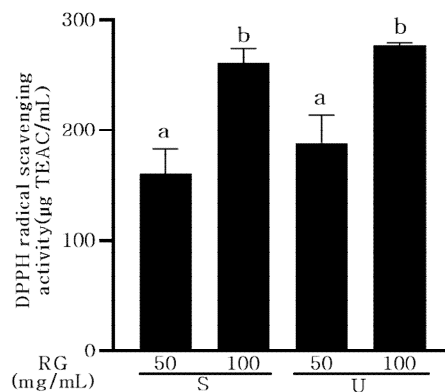
영향이 큰 것으로 유추된다. 이는 기존 연구에서 당귀, 백복령, 상백피, 상엽, 총목피, 홍삼의 플라보노이드 함량을 약탕기를 이용하여 98 °C에서 2시간 열수 추출한 추출물과 상온 24시간 침지추출을 2회 반복한 80 % 에탄올 추출물, 초음파 추출 3가지 추출 방법에 따라 비교하였을 때 다른 추출물들에 비해 홍삼 초음파 추출물에서 플라보노이드 함량이 가장 낮았으나, 홍삼의 에탄올 침지 추출물과 유의적인 차이는 없다고 보고되어 홍삼 추출 방법에 따른 플라보노이드 함량의 차이가 없다는 본 연구와 유사한 결과를 보였다(정현진 외, 2010).

### 3. 홍삼 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

추출 방법을 달리한 홍삼 80 % 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정은 [그림3]에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거 활성이란 항산화 효과를 가진 물질이 DPPH 라디칼에 전자를 공여해 환원하는 능력을 측정하는 방법이다(Yen et al., 1995). 100 mg/mL의 초음파 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 276  $\mu$ g TEAC/g으로 가장 높은 수치를 보였지만, 같은 농도의 교반 추출물(260  $\mu$ g TEAC/g)과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 50 mg/mL의 초음파 추출물(188  $\mu$ g TEAC/g) 또한 같은 농도의 교반 추출물(161  $\mu$ g TEAC/g)보다 높은 수치를 나타냈지만, 유의적 차이를 보이지는 않았



[그림 2] Total flavonoid content of 80% ethanol extract of red ginseng (RG) by agitation (S) or ultrasound (U). Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation, and values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .



[그림 3] DPPH radical scavenging activity of 80% ethanol extract of red ginseng (RG) by agitation (S) or ultrasound (U). Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation, and values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

다. 즉, 홍삼의 DPPH 라디칼 소거능은 총 페놀과 플라보노이드 함량과 동일한 패턴으로 홍삼 추출물의 농도에 따라 증가하되 추출 방법에 의한 차이는 보이지 않았다. 기존의 연구에서 라디칼 소거능은 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물의 항산화 활성을 보기 위해 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때, 추출물의 농도에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 증가함을 보여 본 연구와 동일한 결과이다(장아영 외, 2016). 또 다른 연구에서는 500  $\mu\text{g/mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 홍삼 추출물 농도에서 15 % 미만의 활성을 보였으나, 그 이상의 홍삼 농도에서는 시료의 농도가 증가함에 따라 활성도가 유의적으로 증가하는 양상을 보였다(신정혜 외, 2009).

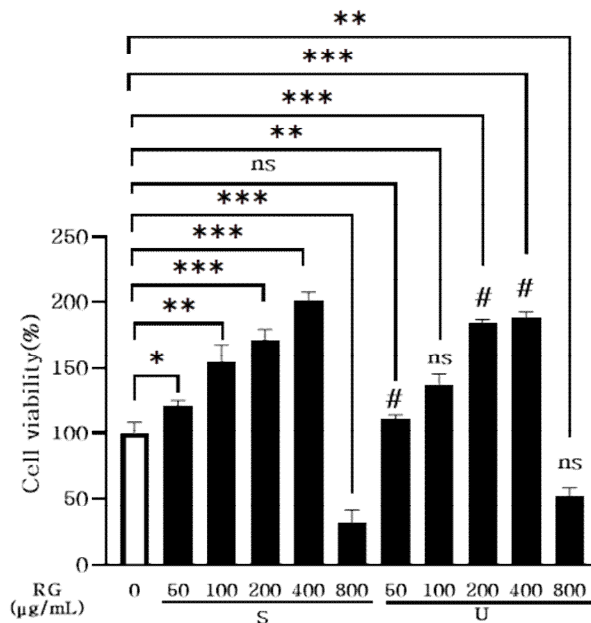
#### 4. 홍삼 추출물의 Raw264.7 대식 세포 증식 효과

추출법에 따른 80 % 에탄올 홍삼 추출물을 처리하였을 때 Raw 264.7 대식 세포의 생존율은 [그림 4]와 같다. 홍삼 추출물을 처리하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100 %로 기준하였을 때, 50  $\mu\text{g/mL}$  초음파 추출물을 제외한 50 ~ 400  $\mu\text{g/mL}$  농도의 모든 홍삼

추출물 실험군들이 대조군에 비하여 유의적으로 높은 생존율을 보였다. 가장 높은 생존율은 400  $\mu\text{g/mL}$  교반 추출물(201.02 %)이었으며, 같은 농도의 초음파 추출물 188.35 %의 생존률과 유의적 차이( $p < 0.05$ )를 보였다. 농도 의존적으로 홍삼 추출물의 농도가 높을수록 생존율도 높아지는 것으로 보아 홍삼 추출물은 면역 세포 증식을 도와주는 기능이 있음을 유추할 수 있다. 50  $\mu\text{g/mL}$ 와 400  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 교반법에 의한 추출물이 초음파에 의한 추출물보다 세포 생존율이 유의적으로 높았으며, 반면에 200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 초음파에 의한 추출물이 교반법에 의한 추출물보다 세포 생존율이 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ).

일반적으로 세포생존율이 85 % 이상일 경우 세포 독성을 보이지 않는다고 알려져 있으므로(Sandoval et al., 2021), 본 연구 결과에서 800  $\mu\text{g/mL}$  농도의 교반 추출물과 초음파 추출물 모두 면역 세포의 생존율이 50 % 미만인 점을 보아 800  $\mu\text{g/mL}$  농도의 홍삼 추출물은 세포 독성을 보이는 것으로 사료된다.

기존 연구에서 감압 농축 방법을 이용하여 추출된 홍삼, 백삼, 흑삼 추출물의 세포 생존율은 1, 10, 100



[그림 4] Cell viability of Raw 264.7 macrophages treated with various concentrations of 80% ethanol extract of red ginseng (RG) by agitation (S) or ultrasound (U). Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

Significant difference between control group and RG-treated group using Student's t-test was indicated by \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Statistical difference between two extract methods on the same concentration was indicated using Student's t-test by # $p < 0.05$ , ns: non-significant

$\mu\text{g/mL}$  농도에서 세포 독성이 없는 것으로 확인되었으며 (장영아 외, 2019), 본 연구에서는 홍삼 추출물을  $100 \sim 800 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 면역 세포에 처리하였을 때, 교반 추출법과 초음파 추출법 모두  $400 \mu\text{g/mL}$ 까지는 세포 생존율이 증가하였고 이후의 농도에서는 세포 독성을 보이는 것을 확인하였다.

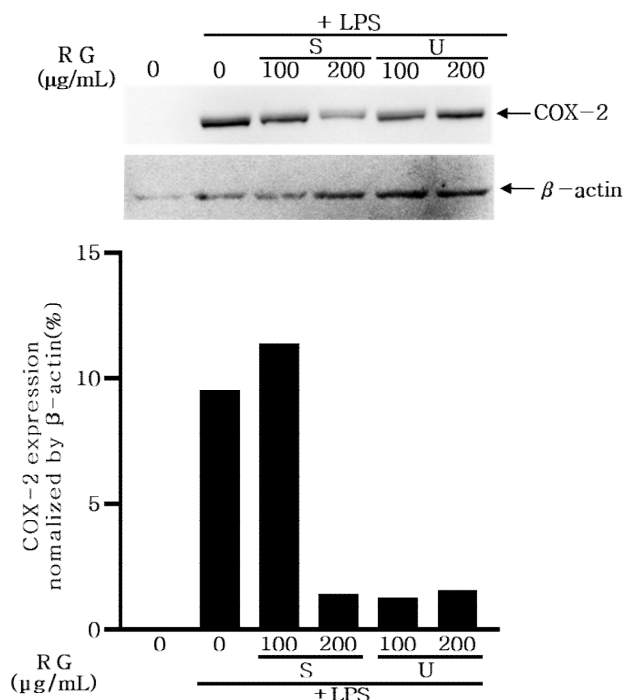
결론적으로, 본 실험 결과 홍삼 추출액이 면역 세포를 증식시키는 효과를 보이나  $800 \mu\text{g/mL}$ 의 높은 농도에서는 독성을 나타내었다. 또한 본 연구에서 사용된 농도에서  $200 \mu\text{g/mL}$ 을 제외하고는 모든 농도에서 교반 추출법이 초음파 추출법에 비해 면역 세포의 증식을 높이고 이를 바탕으로 면역기능에 도움을 줄 수 있음을 시사한다.

#### 5. Raw264.7 대식 세포에서 염증반응에 대한 홍삼 추출물의 항염 효과

Raw264.7 대식 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 합성 효소인 Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase,

cyclooxygenase-2) 혹은 COX-2의 단백질 발현에 대한 홍삼 추출물의 억제 효과를 Western blot 방법으로 조사하여 [그림 5]에 나타내었다. COX-2는 염증 발생 과정에서 arachidonic acid를 prostaglandin endoperoxide H2로 전환시키는 효소로 염증 지표로 사용되고 있다(de Souza et al., 2021).

그람 음성균 세포막에 존재하는 LPS는 염증 반응을 일으켜 COX-2 단백질이 발현되도록 유도하기 때문에 (Guzik et al., 2003), 본 연구에서는 홍삼 추출물로 전처리 된 Raw264.7 대식 세포를 LPS로 처리하여 염증 반응을 유도한 후 홍삼에 의한 염증 반응 억제 효과를 측정하였다. COX-2 단백질의 발현은  $\beta$ -actin에 대한 %로 나타내었다. 먼저 COX-2 단백질의 발현은 LPS를 처리하지 않은 RAW264.7 세포에서는 관찰되지 않았으며, LPS 처리 후 COX-2 단백질 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 또한 LPS에 의해 유도된 COX-2 유전자의 단백질 발현은  $100 \mu\text{g/mL}$  농도의 홍삼 초음파 추출물에 의해 발현이 저하되지 않았으나(11.4 %),  $200 \mu\text{g/mL}$  농도에서 1.4 %로 저하되었다. 초음파 추출액  $100 \mu\text{g/mL}$  농도에서 1.2 %,  $200 \mu\text{g/mL}$



[그림 5] COX-2 protein expression in Raw 264.7 macrophages treated with 80% ethanol extract of red ginseng (RG) by agitation (S) or ultrasound (U). COX-2 protein expression was measured by western blot and  $\beta$ -actin was used as loading control. Intensity of COX-2 were measured and normalized by  $\beta$ -actin using Image J.

농도에서 1.5 % 로 낮은 농도에서도 COX-2 단백질 발현의 감소를 보였다. 그러므로 본 연구에서 홍삼의 교반 추출액은 농도 증가에 따라 COX-2 저해 효과를 보여주었으나, 초음파 추출 방법은 농도와 관계없이 COX-2 발현을 저해하며 홍삼의 항염증 효과를 보여주었다. 기존 연구에서 RAW 264.7 세포에 LPS 단독 처리된 군에 비해 홍삼을 처리한 군에서 홍삼 농도가 증가함에 따라 유의적으로 COX-2 발현량이 감소함을 보고하였다(장영아 외, 2019).

COX-2는 일반적으로 정상 세포에서는 존재하지 않는, 즉각적인 염증 초기 반응 유전자로, 염증 유발 사이토카인을 비롯한 다양한 염증 자극에 의해 염증 부위에서 주로 유도되기도 하지만, COX-2가 염증을 유발할 뿐만 아니라 종양을 촉진한다는 많은 근거들이 제시되었다(Wang et al., 2010). 그러므로 COX-2는 다양한 인간 암에서 자주 과발현되어 있고, COX-2 억제제를 항암제로 활용하고자 하는 연구들이 다양하게 존재하고 있다(Li et al., 2020). 이는 홍삼 추출물이 본 연구에서 보여준 항염증 효과뿐 아니라 추후에 항암 효과 또한 기대해 볼 수 있음을 시사한다.

#### IV. 요약

본 연구는 80 % 에탄올 용매로 홍삼의 교반 추출액과 초음파 추출액의 항산화 효과 및 세포 생존율, 항염 효과 측정을 통하여 기능성 식품으로서의 홍삼의 효능을 확인하고, 추출 방법에 따른 기능의 차이를 비교 수행하였다. 총 페놀, 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성은 홍삼의 농도에 비례하여 증가하였으나, 추출 방법에 따른 유의적 차이를 보이지 않았다. 50 ~ 400  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 두 가지 추출 방법 모두 세포 독성이 나타나지 않았고, 유의적으로 세포 생존율이 증가하였으나, 800  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 급격한 생존율 감소를 확인하였다. 즉, 적절한 농도의 홍삼은 면역 세포의 생존율에 긍정적인 효과를 보이나, 높은 농도에서는 세포 독성을 보임을 의미한다. LPS로 염증이 유도된 면역 세포에서 염증 지표 COX-2 단백질의 발현은 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 교반 추출액이 처리시 감소하였으며, 초음파 추출액은 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도 모두에서 발현이 감소되어, 홍삼의 항염증 효과를 확인하였다.

그러므로 교반법과 초음파 방법을 이용하여 추출한 홍삼 시료에서 항산화, 항염, 세포 생존율 증가 효과를 확인하였으며, 초음파 추출법이 교반 추출법에 비해 낮은 농도에서도 항염증 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구는 홍삼의 기능성을 확인하였으며, 추후 홍삼 사용 목적에 따라 추출 방법을 달리하는 자료 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

주제어: 홍삼 추출물, 항염, 항산화, 교반 추출법, 초음파 추출법

#### REFERENCES

- 김혜진, 박병진, 한인화(2015). 건조 및 추출 방법을 달리한 떡쭉(*Gnaphalium affine* D. DON)의 항산화 효과에 대한 연구. *한국식품영양과학회지*, 44(5), 695-701.
- 곽이성(2012). 고려인삼의 면역조절 효과. *식품과학과 산업*, 45(1), 23-38.
- 남기열, 이누리, 문병두, 송규용, ... 최재율(2012). 흑삼 제조과정 중 증포 횟수에 따른 색상 및 진세노사이드 함량 변화. *한국약용작물학회지*, 20(1), 27-35.
- 배봉석, 이명우, 이준수, 박철수, 한민우(2021). 국내 재배 6년근 고려인삼과 미국삼의 가공방법에 따른 성분 비교. *한국약용작물학회지*, 29(1), 35-44.
- 신정혜, 강민정, 이수정, 양승미, ... 성낙주(2009). 건조 마늘, 홍삼 및 이들 혼합물의 생리활성. *한국식품영양과학회지*, 38(12), 1633-1639.
- 이지현, 신귀남, 김의검, 신현중, ... 송규용(2006). 흑삼의 제조 및 항암효과. *동의생리병리학회지*, 20(4), 951-956.
- 장아영, 승윤철, 지중구(2016). 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물의 생리활성 비교 연구. *디지털융복합연구*, 14(5), 459-471.
- 장영아, 김한나, 김보애 (2019). 홍삼추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 염증반응에 미치는 효과. *한국유화학회지*, 36 (4), 1434-1442.
- 정노팔(2007). 면역증강 · 조절 효과. *최신고려인삼연구*, 201-216.



- 정현진, 김현정, 이성규, 이은주, 박우동, 김종부(2010). 약용식물의 추출방법에 따른 항산화 및 항당뇨 활성. *한국식품과학회지*, 42(5), 571-577.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Chen, X. J., Liu, W. J., Wen, M. L., Liang, H., ... & Ma, L. Q.(2017). Ameliorative effects of compound K and ginsenoside Rh1 on nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Scientific Reports*, 7(1), 41144.
- Choi, J. Y., Woo, T. S., Yoon, S. Y., Choi, Y. J., ... & Cheong, J. H. (2011). Red ginseng supplementation more effectively alleviates psychological than physical fatigue. *Journal of Ginseng Research*, 35(3), 331-338.
- de Souza, G., Silva, R. J., Milian, I. C. B., Rosini, A. M., ... & Barbosa, B. F. (2021). Cyclooxygenase (COX)-2 modulates *Toxoplasma gondii* infection, immune response and lipid droplets formation in human trophoblast cells and villous explants. *Scientific Reports*, 11(1), 12709.
- Guzik, T., Korbust, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology & Pharmacology*, 54(4), 469-487.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Kee, J. Y., Jeon, Y. D., Kim, D. S., Han, Y. H., ...& Hong, S. H. (2017). Korean Red Ginseng improves atopic dermatitis-like skin lesions by suppressing expression of proinflammatory cytokines and chemokines in vivo and in vitro. *Journal of Ginseng Research*, 41(2), 134-143.
- Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Noda, T., & Yoshikawa, M. (1987). Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2): comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 107(7), 495- 505.
- Lee, S. M., Bae, B. S., Park, H.W., Ahn, N. G., ...& Kwak, Y. S. (2015). Characterization of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* Meyer). *Journal of ginseng research*, 39(4), 384-391.
- Li, S., Jiang, M., Wang, L., & Yu, S. (2020). Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: Recent advancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110389.
- Li, J., Du, J., Liu, D., Cheng, B., ... & Ling, C. (2014). Ginsenoside Rh1 potentiates dexamethasone's anti-inflammatory effects for chronic inflammatory disease by reversing dexamethasone-induced resistance. *Arthritis Research & Therapy*, 16(3), 1-11.
- NFRI. (1990). Manuals of quality characteristic analysis for food quality evaluation II. *National Food Research Institute*, Skuba, Japan.
- Sandoval-Sicairos E. S., Milán-Noris A. K., Luna-Vital D. A., Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A. (2021) Anti-inflammatory and antioxidant effects of peptides released from germinated amaranth during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 343, 128394.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Wang, D., & DuBis, R. N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*, 29(6), 781-788.
- Yen, G. C., & Chen, H. Y., (1995) Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32.

Received 26 April 2023;

1st Revised 24 July 2023;

Accepted 24 August 2023