Check for updates

Korean Journal of Human Ecology
2024. Vol. 33, No. 5, 793-802

http://dx.doi.org/10.5934/kjhe.2024.33.5.793
ISSN 1226-0851(Print)/ISSN 2234-3768(Online)

Raw264.7 세포에서 맥문동 에탄올 추출물과 구기자 에탄올 추출물 혼합물의 항염증 효능

Anti-inflammatory efficacy of a mixture of Liriope platyphylla root ethanol extract and Lycium chinense fruit ethanol extract in Raw264.7 cells

김예지[1] • 김지민[1] • 남유리[2] • 이선영[3] • 김경아[3] • 배은영[4],*
충남대학교 식품영양학과 석사과정[1] • 충남대학교 식품영양학과 박사과정[2] •
충남대학교 식품영양학과 교수[3]• 엘로힘연구소 소장[4],*

Kim, Yeji[1] • Kim, Jimin[1] • Nam, Youree[2] • Ly, Sunyung[3] • Kim, Kyungah[3] • Bae, Eunyoung[4],*
Department of Food & Nutrition, Chungnam National University[1),2),3)] • R&D Center, Elohim[4)]

Abstract

This study aimed to investigate effects of a mixture of Liriope platyphylla (LP) root and Lycium chinense (LC) fruit extract on NO production, gene expression of proinflammatory cytokines and chemokines, and inflammatory protein expression in Raw264.7 cells. Three mixtures of extracts were used, including LP:LC=1:1, LP:LC=5:1, LP:LC=10:1. Cells were treated with extracts at concentrations of 12.5, 25, and 50 μg/mL. In LPS-induced inflammation, a 1:1 mixture of LP extract and LC extract significantly inhibited NO production at a concentration of 50 μg/mL. All concentrations of the mixture reduced gene expression of the proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α except for the mixture of 10:1 at 12.5 μg/mL on TNF-α. They also reduced gene expression of chemokines such as monocyte chemoattracted protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1α, as well as expression of the inflammatory protein cyclooxygenase (COX)-2. Among all tested combinations, the 1:1 mixture of LP extract and LC extract demonstrated a significant anti-inflammatory effect. These results suggest that the anti-inflammatory effects of the mixture of Liriope platyphylla (LP) root and Lycium chinense (LC) fruit extracts have the potential to be used as a composite mixture for the development of functional food.

Keywords: Liriope platyphylla, Lycium chinense, Mixture of extracts, Anti-Inflammation, Nitric oxide

Ⅰ. 서론

염증(inflammation) 반응은 세균, 바이러스와 같은 미생물 등의 병원균에 의한 감염이나 외부 물리적 상해 시에 우리 몸에서 신체를 보호하기 위해 일어나는 방어 체계로, 다양한 염증 매개체를 분비하여 손상된 조직을 치유하고

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(육성 품종 활용 지역특화 약용작물 기능성 소재 이용 확대 연구, 과제번호: RS-2022-RD010228)의 지원에 의해 이루어진 것임
본 논문은 2024년 한국생활과학회 하계학술대회에 발표된 논문임.
* Corresponding author: Bae, Eunyoung
Tel: +82-70-4333-7721, Fax: +82-42-931-7732
E-mail: eun-js@daum.net
ⓒ 2024, Korean Association of Human Ecology. All rights reserved.

재생시키는 과정이다(Jeong et al., 2012). 염증 반응은 체내의 면역 세포가 자극을 인지하는 것으로부터 시작되는데, 면역 세포 중 하나인 대식세포의 경우 그람 음성 박테리아 외막의 주요성분인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 염증 신호 기전이 활성화된다(최가미 외, 2022). LPS는 대식세포의 표면에 있는 Toll-like receptors (TLRs)를 자극하여 전사 요소로 핵인자인 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF-kB)를 활성시킨다(Kim et al., 2014). 이를 통해 염증성 cytokine인 interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α, 염증성 chemokine인 monocyte chemoattracted protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1α를 유도하는 유전자가 발현된다. 염증성 cytokine과 chemokine은 염증 반응 매개 물질인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2를 활성화시키고, 이를 통해 염증 매개체인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E_2 (PGE_2)가 생성된다(Kwon et al., 2013).

염증 반응은 면역 과정 중 필수로 일어나는 반응이나 과다하게 발생하면 조직의 손상이 유발되고, 천식, 다발성 경화증, 동맥경화증, 암 등의 여러 질병들이 발생되는 것으로 보고되어 있다(Isomäki & Punnonen, 1997). 따라서 염증 반응이 과도하게 일어나지 않도록 적절히 조절하는 것은 질병의 예방과 치료를 위해 중요하다.

염증을 치료하는 여러 의약품과 소재 중 가장 많이 사용되고 있는 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)의 경우 위장관 합병증 빈도가 높고, COX-2 선택적 길항제의 경우에도 혈전증의 위험이 있는 환자의 경우 심혈관계 부작용을 초래할 수 있음이 밝혀지며 최근에는 의약품에 비해 부작용이 적은 천연 소재의 잠재력에 대한 관심이 증가하고 있다(유주희, 김경아, 2023; Ryu et al., 2011). 이로 인해 식물성 천연물을 활용한 건강기능식품의 소비가 증가하고 있으며, 천연 소재들의 항염 효능에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있다(왕춴 외, 2023).

맥문동(*Liriope platyphylla*)은 백합과(*Liliaceae*)에 속하는 상록 다년생 초본으로 중국, 대만, 한국, 일본 등 주로 동아시아에 분포하고, 뿌리 부분을 주로 사용하며 기침, 가래, 해열 등의 약효 성분이 있어 한약재로 사용되어 왔다(Cho et al., 2013). 우리나라에서는 충남 청양과 부여, 경남 밀양 일부에서 재배되어 왔으며 봄철 영농기 이전에 수확하는 작물이다(박현주 외, 2022). 맥문동의 유효 성분으로는 steroid계 saponin인 ophiopogonin A, B, C, D, B', C', D'와 spicatoside A, β-sitosterol, stigmasterol 등의 phytosterols가 있다(신정식, 2002; Lee et al., 1989; Watanabe et al., 1977). 우리나라 식품공전에서는 식품 제조, 가공의 원료로서 맥문동의 뿌리인 괴근만을 사용하도록 허용하고 있으며, 맥문동은 항산화, 폐보호, 항염증, 지질대사 개선, 항암, 신경보호 등의 효능이 있음이 알려져 있다(노성수 외, 2008; 이응석 외, 2011; 이인자 외, 2003; Cho et al., 1998; Kang & Lee, 2006, Kim et al., 1995).

가지과(*Solancae*)에 속하는 낙엽성 활엽관목인 구기자나무(*Lycium chinense*)는 네팔, 인도, 한국, 일본, 중국 유럽 등에 분포하며 세안, 소염, 해열, 강장, 당뇨, 치통 등에 사용되어 왔다(김경순 외, 1998). 구기자(*Lycii fructus*)는 구기자나무의 과실을 건조한 것으로 'Goji berries'라고도 불리며 유효 성분으로는 carotenoids, 비타민 C, 비타민 B군, quercetin, β-sitosterol 등이 있다(김지은 외, 2022). 현재까지 간보호, 항산화, 항암, 항염, 혈중지질 저하, 혈당강하 등의 효능이 보고되어 있다(김경순 외, 1998; 박윤자 외, 2002; 조영제 외, 2005; Luo et al., 2004; Zhang et al., 2010).

맥문동과 구기자 단독 추출물의 생리 활성 효능에 대한 연구는 현재까지도 진행되고 있으나 이들의 혼합물에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 이 두 물질의 추출 혼합물의 항염 효능을 확인하여 건강기능식품의 복합 혼합물 소재로서의 개발 가능성을 확인하고자 실험을 진행하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 맥문동과 구기자 추출물 혼합물 제조

실험에서 사용한 맥문동(*Liriope platyphylla* root, LP)과 구기자(*Lycium chinense* fruit, LC)는 충청남도농업기술원 구기자연구소에서 구입하여 실험에 사용하였다. 맥문동은 70% 에탄올, 구기자는 30% 에탄올을 사용하여 추출 온도 70°C에서 맥문동은 6시간 동안 그리고 구기자는 8시간 동안 추출한 후 감압 농축하였다. 그 후 추출한 맥문동과 구기자를 1:1, 5:1, 10:1 비율로 혼합하여 실험에 사용하였다.

2. 세포배양

한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)

으로부터 구매한 마우스 대식세포인 Raw264.7 세포주를 실험에 사용하였다. 10% fetal bovine serum(Hyclone, Victroia, Australia)과 1% penicillin-streptomycin(Gibco, Grand Island, NY., USA)을 함유하는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Gibco, USA) 배지를 사용하였고, 37℃ incubator(BB15, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양을 하였다. 세포는 90 x 20mm cell culture dish(SPL Life Science Co., Pocheon, Korea)에서 배양되었고, 세포의 density가 80% 이상일 때 계대배양을 진행하였다.

3. 세포 독성 평가 (water soluble tetrazolium salts [WST] assay)

세포독성 측정을 위해 96-well plate에 Raw264.7 세포를 1×10^4 cell/well로 분주한 후, 24시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 그 후, 추출물 12.5, 25, 50, 100 μg/mL를 처리 후 24시간 배양한 후 세포 배양액에 EZ-Cytox WST assay reagent(Daeil lab service Co. Ltd., Seoul, Korea)를 10μL씩 첨가하고 2시간과 3시간 후에 450 nm에서 ELISA reader(Bio-Rad Laboratories, Inc.)로 흡광도를 측정하였다. 결과는 2시간과 3시간 측정값을 평균 내어 사용하였다. 세포의 생존율은 무처리군의 세포 생존율 대비 상대 세포 생존율(%)로 계산하여 나타내었다.

4. 항염증 활성 Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO 생성량 측정을 위해 Raw264.7 세포를 6-well plate에 5×10^5 cells/well 농도로 2mL씩 분주하고, 48-well plate에 1×10^5 cells/well 농도로 300μL씩 분주한 후 24시간 동안 incubator에 배양하였으며, 추출물을 12.5, 25, 50 μg/mL 농도로 처리하고 1시간 뒤에 1μg/mL 농도의 LPS(Sigma-Aldrich Co.)를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. NO 생성량 측정을 위해 세포 배양액을 따서 96-well plate에 배양액 100μL와 Griess reagent(Promega, Madison, WI, USA) 100μL를 혼합하여 암실에 10분간 방치시킨 후 550nm에서 흡광도를 ELISA reader(Bio-Rad Laboratories, Inc.)로 측정하였다. 생성된 NO의 함량은 아질산나트륨($NaNO_2$)을 기준으로 작성한 표준 검량곡선에 대입하여 산출하였다.

5. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α와 염증성 chemokine인 MCP-1, MIP-1α의 mRNA 발현 정도를 측정하기 위하여 6-well plate에 세포를 5×10^5 cells/well 농도로 2mL씩 분주하였다. 그 후 추출물을 12.5, 25, 50μg/mL 농도로 처리하고 1시간 뒤에 1μg/mL 농도의 LPS를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. Trizol 시약을 이용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 각 유전자에 특이적인 primer와 SYBR green qPCR mix(Biofact, Daejeon, Korea)을 혼합하여 사용하였다. Real-time PCR의 조건은 pre-denaturation 과정을 50℃에서 2분, 95℃에서 15분간 수행하였고, 증폭은 95℃에서 20초, 60℃에서 40초간 40 cycles로 수행하였다. 나온 결과 값은 Internal standard로 GAPDH를 사용하였다.

6. Western blot analysis

염증에 관여하는 효소 단백질인 COX-2의 단백질 발현 확인을 위하여 세포를 5×10^5 cells/well 농도가 되도록 6-well plate에 2mL씩 분주하였다. 그 후 추출물을 12.5, 25, 50μg/mL 농도로 처리하고 1시간 뒤에 1μg/mL 농도의 LPS를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 cold PBS로 세척한 후 RIPA buffer를 사용하여 단백질을 추출하였다. 그 후 Bradford reagent(Sigma-Aldrich Co.)로 시료를 처리한 세포 속 단백질 농도를 정량하였다. 정량한 값으로 단백질 전기영동을 통해 10% SDS-PAGE(Polyacrylamide gel)로 단백질을 분리한 후 5% skim milk에 1시간 동안 blocking 하였다. COX-2의 발현량을 확인하기 위하여 1차 항체로 anti-rabbit COX-2 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)를 사용하고, 2차 항체로 anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology Inc.)를 사용하였다. Exwestlumi-plus(ATTO CO., Tokyo, Japan)를 Membrane에 묻힌 후 ChemiDoc (LuminoGraph, ATTO Co.)을 이용하여 단백질 발현량을 측정하였고, 밴드의 정량 분석은 Image J intensity(US Naional Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용해 분석하였다. COX-2의 밴드는 Internal standard로 β-actin을 사용하였다.

7. 통계분석

실험 결과 분석은 SPSS 26(Statistical Package for the Social Science, IBM, Chicago, IL, USA)를 사용하여 통계분석을 실시하였고, 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 무처리군과 LPS 처리군 간 평균값 비교, LPS 처리군과 시료 처리한 군 간의 평균값 비교, 그리고 시료 처리한 각 군의 농도별 평균값 차이의 유의성은 일원 배치 분산분석(one-way ANOVA)과 사후 검증으로는 Tukey's multiple comparison test를 사용하여 α=0.05 수준에서 검증하였다.

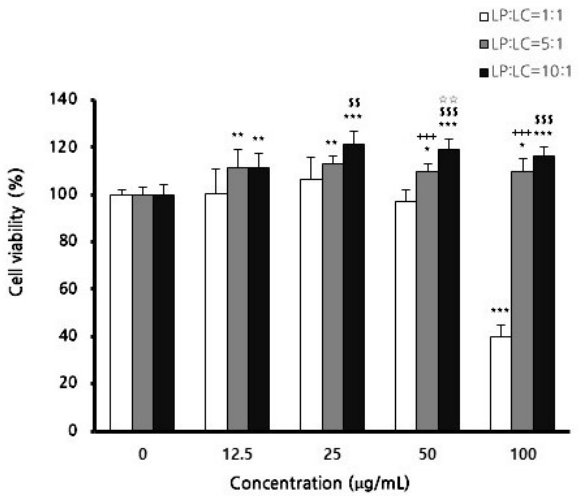
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물 세포독성 평가

맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물이 Raw264.7 세포의 생존율에 끼치는 영향을 확인하기 위하여 각 추출물 혼합물을 12.5, 25, 50, 100μg/mL 농도로 처리한 후 측정하였다. 측정한 결과는 [그림 1]과 같으며 맥문동(LP)과 구기자(LC) 추출물을 5:1과 10:1로 혼합한 혼합물의 경우 농도가 높아짐에 따라 세포생존능이 유의적으로 높아짐을 확인할 수 있었고, 혼합 비율 5:1과 10:1을 비교해 보면 맥문동의 비율이 높은 10:1로 혼합한 것의 Raw264.7 세포의 세포 생존율이 높은 것을 확인할 수 있었다. 맥문동(LP)과 구기자(LC) 추출물을 1:1로 혼합한 혼합물의 경우 100μg/mL 농도에서 40% 미만으로 세포독성을 나타내는 것을 확인하여 향후 실험에서는 세포독성을 나타내지 않는 50μg/mL 농도까지 처리하여 실험을 진행하였다.

2. Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 Nitric oxide 생성량 측정

NOS에 의하여 L-Arginine/nitric oxide pathway를 통해 생성되는 NO는 free radical 중의 하나로 산소나 superoxide에 의해 세균을 사멸시키는 기능을 나타내지만, 과도하게 생성된 NO는 세포 내 염증을 유발하고, 조직의 손상과 유전자 변이 등의 원인이 된다(조영제, 안봉전, 2008). 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 항염 효능을 확인하기 위해 LPS로 자극된 Raw264.7 세포에서 생성된 NO 생성량 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과는 [그림 2]에서 본 바와 같이 LPS를 처리한 경우 NO의 생성이 유의성 있



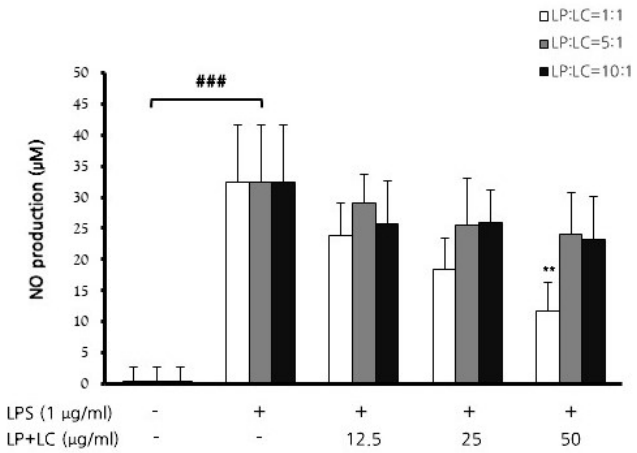
[그림 1] Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 세포 생존율.

맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=1:1 혼합, 맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=5:1 혼합, 맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=10:1 혼합.
무처리군과 비교 *p<.05, **p<.01, ***p<.001.
LP:LC=1:1과 LP:LC=5:1 비교 $^{+}$p<.05, $^{++}$p<.01, $^{+++}$p<.001.
LP:LC=1:1과 LP:LC=10:1 비교 $^{\$}$p<.05, $^{\$\$}$p<.01, $^{\$\$\$}$p<.001.
LP:LC=5:1과 LP:LC=10:1 비교 $^{☆}$p<.05, $^{☆☆}$p<.01, $^{☆☆☆}$p<.001.

게 유도되었음을 확인하였다. 각각의 맥문동과 구기자 추출물 혼합물을 12.5, 25, 50μg/mL 농도로 처리하고 LPS (1μg/mL)로 자극한 결과 1:1, 5:1, 10:1 혼합물에서 생성된 NO는 LPS 처리군에 비해 감소하는 경향을 보였고, 1:1로 혼합한 시료는 50μg/mL 농도에서 NO 생성을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 기존에 보고된 구기자 및 맥문동 추출물이 NO 생성에 미치는 영향 연구를 살펴보면 Bae et al.(2019)는 Raw264.7 세포에 구기자를 단독으로 처리했을 때 31.25μg/mL에서 NO의 생성이 유의하게 저해되었다고 보고하였다(Bae et al., 2019). 박시덕 외(2007)의 연구에 의하면 열수 추출 맥문동을 Raw264.7 세포에 처리했을 때 100μg/mL에서 NO의 생성이 유의하게 저해되었으며, Kim et al.(2012)의 보고에 의하면 열수 추출 맥문동을 Raw264.7 세포에 처리했을 때 NO의 생성은 25μg/mL 농도에서 유의적으로 저해되었다고 보고하였다(박시덕 외, 2007; Kim et al., 2012). 본 실험 결과 맥문동과 구기자의 에탄올 추출물 혼합물의 경우에서도 NO 저해 효능을 관찰하였고, 그중 맥문동과 구기자 추출물을 1:1로 혼합한 시료의 효과가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다.

3. Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물이 염증성 cytokine과 chemokine 발현에 미치는 영향

염증성 cytokine은 염증 반응이 발생하면 대식세포와 같은 염증세포와 상피세포 등에서 분비되는 당단백질로서 면역 및 염증 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다(정민교, 2007). IL-1β는 림프구와 대식세포를 활성화하고, 호중구의 내피세포 접착을 항진시키며, 급성기 단백질 합성과 분비를 유도하고, chemokines를 유도함으로 염증을 유발하는 작용을 함이 알려져 있으며, IL-6는 감염 발생 시 즉각적으로 생성되며 조혈 및 염증을 조절하는 역할을 하고, TNF-α는 주로 자극된 대식세포에서 분비되며 대식세포 및 림프구에 대한 화학 유인을 하고, IL-6와 CRP와 같은 다른 급성기 reactant를 유도할 수 있다고 알려져 있다(김재구, 2011; 이용현, 임은미, 2013; Tanaka et al., 2014). 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 염증성 cytokine의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Raw264.7 세포에 LPS로 자극을 주어 염증 상태를 유도하고, 생성된 염증성 cytokine의 mRNA 발현 수준을 낮추는 능력을 확인하였다. 그 결과는 [그림 3]에서 본 바와 같이 LPS 처리에 의해 염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현이 높아지는 것을 확인하였고, IL-1β와 IL-6는 맥문동과 구기자 추출물을 1:1, 5:1, 10:1로 혼합한 시료 모두 12.5μg/mL 농도에서부터 유전자 발현 수준이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. TNF-α의 경우 맥문동과 구기자 추출물 1:1과 5:1 혼합물은 12.5μg/mL 농도에서부터, 그리고 10:1 혼합물의 25μg/mL 농도에서부터 유전자 발현 수준이 유의적으로 감소하였다. 맥문동과 구기자 추출물 1:1 혼합물은 12.5μg/mL 농도에서부터 TNF-α의 수준을 농도 의존적으로 감소시켰고, 맥문동과

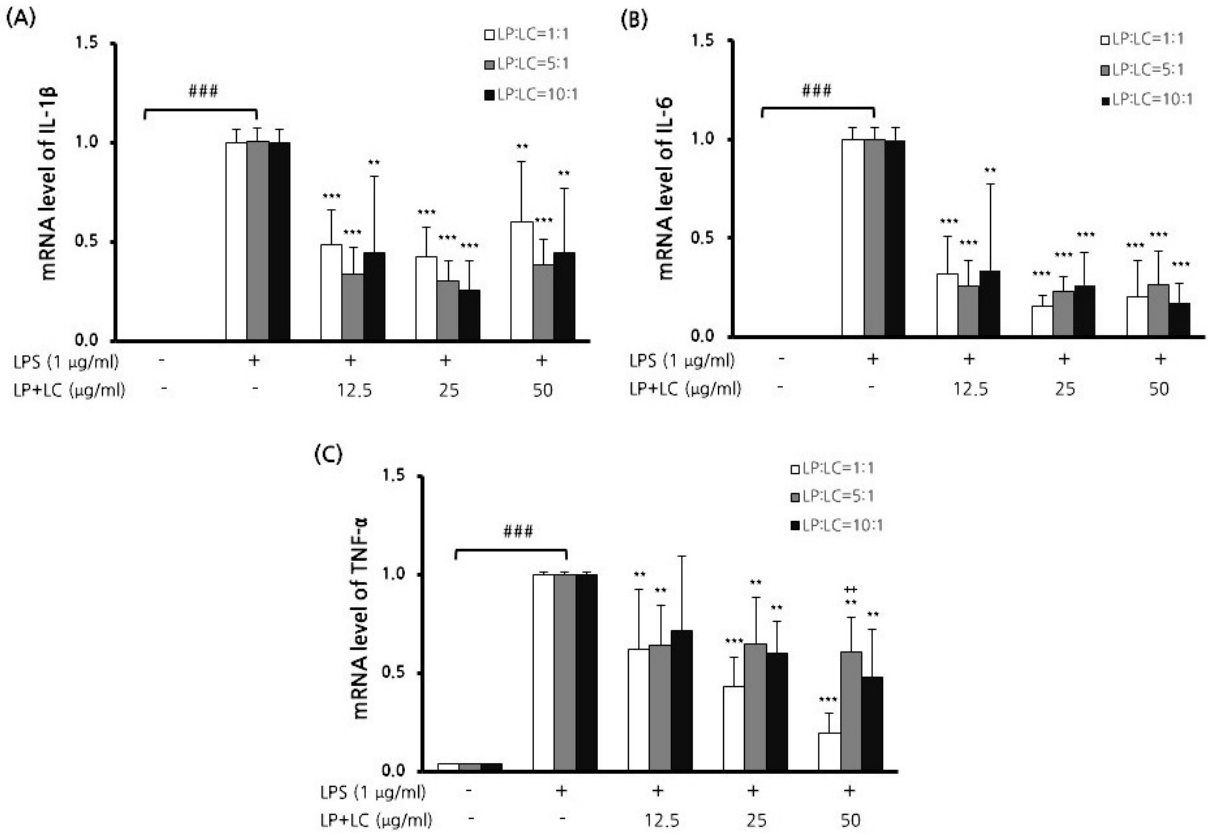


[그림 2] Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 NO 생성량.

맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=1:1 혼합, 맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=5:1 혼합,
맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=10:1 혼합.
Control과 비교 $^{\#}p<.05$, $^{\#\#}p<.01$, $^{\#\#\#}p<.001$, LPS 처리군과 비교 $^{*}p<.05$, $^{**}p<.01$, $^{***}p<.001$.

구기자 추출물 10:1 혼합물은 12.5μg/mL 농도에서부터 IL-6의 수준을, 그리고 25μg/mL 농도에서부터 TNF-α의 수준을 농도 의존적으로 감소시켰다. 김호석 외(2014)의 연구에 의하면 맥문동 80% 에탄올 추출물을 PMACI로 염증이 유도된 비만세포인 Human Mast Cell (HMC)-1 세포에 처리했을 때 IL-6와 TNF-α의 분비가 각각 10μg/mL 농도, 100μg/mL농도에서 유의하게 감소하였다고 보고하였다(김호석 외, 2014).

염증 상태에서 분비되는 염증성 chemokine은 접착과 활성화를 통해 특정 백혈구의 일정 방향으로의 이동을 증강시키는 화학 유인성 cytokine이다(정민교, 2007). MCP-1은 상피세포, 내피세포, 단핵구 등 많은 세포 유형에서 생성되며 손상된 조직 부위와 감염부위에 단핵구, T 세포, 수지상 세포를 모집하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Yadav et al., 2010). MIP-1α는 급성 호중구 염증으로 이어질 수 있는 과립구를 활성화시키고, 대식세포에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 염증성 cytokines의 합성을 유도하는 역할을 한다고 알려져 있다(이용현, 임은미, 2013). 염증성 chemokine의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Raw264.7 세포에 LPS로 자극을 주어 염증 상태를 유도하고, 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물을 처리하여 생성된 염증성 chemokine의 mRNA 발현 수준을 낮추는 능력을 확인하였다. [그림 4]에서 본 바와 같이 MCP-1, MIP-1α의 발현이 맥문동과 구기자 추출물을 1:1, 5:1, 10:1로 혼합한 시료 모두 12.5μg/mL 농도에서부터 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히 맥문동과 구기자 추출물 1:1 혼합물은 MCP-1, MIP-1α의 유전자 발현 수준을 농도 의존적으로 감소시켰다. 본 실험 결과들을 종합하여 보면 맥문동과 구기자 추출물을 1:1, 5:1, 10:1로 혼합한 시료 모두 염증성 cytokines와 chemokines



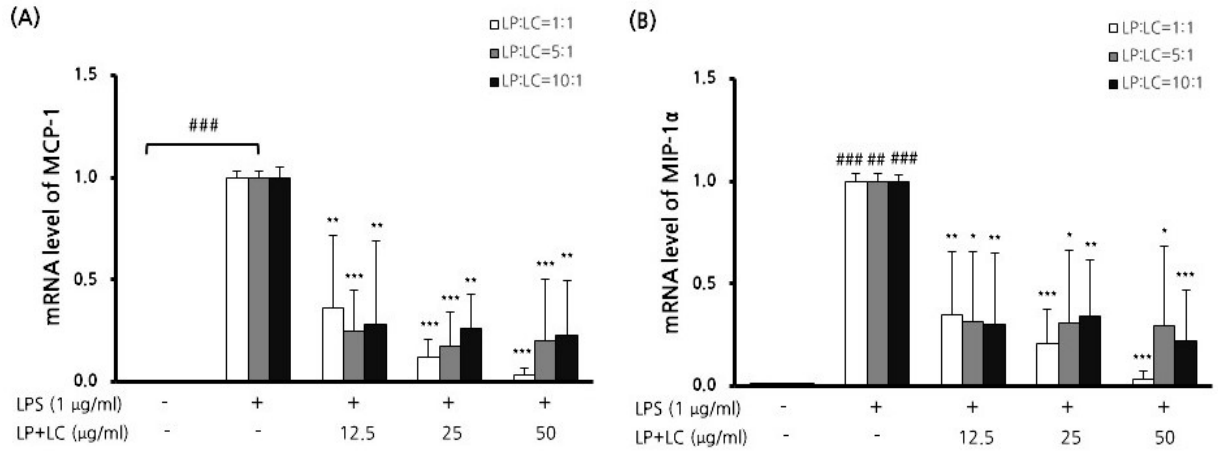
[그림 3] Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 염증성 cytokine 유전자 발현.

맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=1:1 혼합, 맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=5:1 혼합,
맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=10:1 혼합.
(A) IL-1β, (B) IL-6, (C) TNF-α. GAPDH를 기준으로 계산.
Control과 비교 $^{\#}p<.05$, $^{\#\#}p<.01$, $^{\#\#\#}p<.001$, LPS 처리군과 비교 $^{*}p<.05$, $^{**}p<.01$, $^{***}p<.001$.
LP:LC=1:1과 LP:LC=5:1 비교 $^{+}p<.05$, $^{++}p<.01$, $^{+++}p<.001$.

의 유전자 발현을 감소시켰고, 그중 맥문동과 구기자 추출물을 1:1로 혼합한 시료가 농도가 높아질수록 가장 큰 효과를 보였다. MCP-1과 같은 화학 유인성 chemokine은 세균성 폐렴에서 큰 역할을 함이 알려져 있으며, 기관지폐포 세척액 내 MCP-1의 수치는 간질성 폐 질환의 심각도와 상관 관계가 있는 것으로 보고되어 있다(Yong et al., 2016). Kim et al.(2012)의 연구에 의하면 LPS로 유도된 염증 상태에서 맥문동 괴근 열수 추출물을 Raw264.7 세포에 처리했을 때 MCP-1의 생성량이 감소됨을 확인하였다(Kim et al., 2012). 맥문동은 한약재로 진해거담을 위해 오래전부터 사용되어 왔는데, 이러한 효능이 염증 상태에서 chemokine의 발현 수준을 낮추는 것을 통해 이루어짐을 유추할 수 있다.

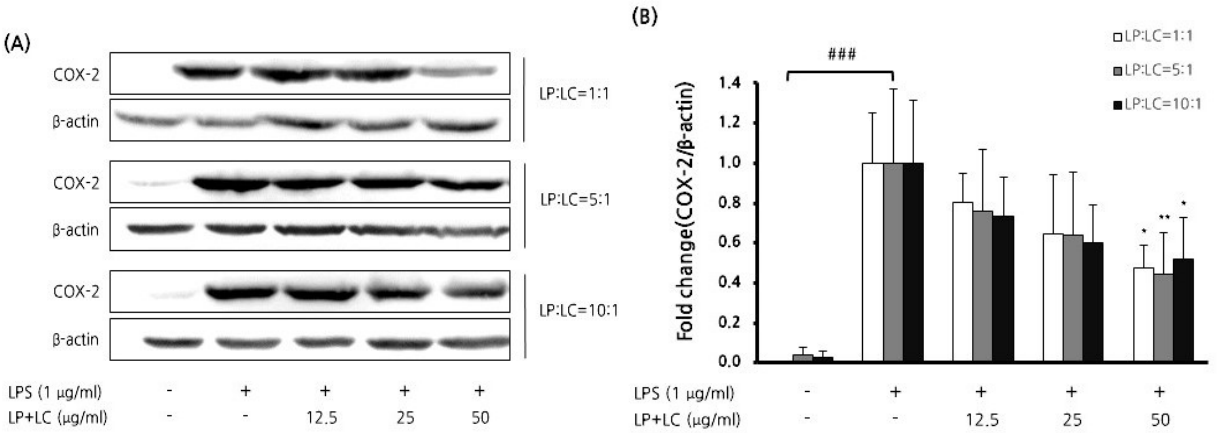
4. Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

COX-2는 염증 자극, cytokine 등에 의해 이차적으로 발현이 유도되며 arachidonic acid를 prostaglandin endoperoxide H2로 전환시키는 효소 단백질로 염증 지표로 사용되고



[그림 4] Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 염증성 chemokine 유전자 발현.

맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=1:1 혼합, 맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=5:1 혼합,
맥문동 추출물(LP): 구기자 추출물 (LC)=10:1 혼합.
(A) MCP-1, (B) MIP-1α. GAPDH를 기준으로 계산.
Control과 비교 #p<.05, ##p<.01, ###p<.001, LPS 처리군과 비교 *p<.05, **p<.01, ***p<.001.



[그림 5] Raw264.7 세포에서 맥문동 추출물과 구기자 추출물 혼합물의 COX-2 단백질 발현.

(A) 맥문동과 구기자 추출물 혼합물의 COX-2 밴드 사진, (B) COX-2 밴드를 이미지J로 정량한 값 (n>3)
Control과 비교 #p<.05, ##p<.01, ###p<.001, LPS 처리군과 비교 *p<.05, **p<.01, ***p<.001.

있다(박영숙, 2007). COX-2의 발현이 증가하게 되면 세포 증식이 활성화되고 세포의 부착성을 강화시킴으로써 다양한 염증성 질환 발병과 진행에 중요한 작용을 한다(Lee et al., 2010). 맥문동과 구기자 추출물 혼합물이 염증과 관련된 효소 단백질인 COX-2의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 [그림 5]에서 본 바와 같이 LPS에 의해 유도된 COX-2 단백질 발현이 맥문동 추출물과 구기자 추출물을 1:1, 5:1, 10:1로 혼합한 시료 모두에서 시료의 농도가 높아짐에 따라 발현이 감소하는 경향을 보였고, 50μg/mL 농도에서는 모두 LPS 처리군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Han et al.(2013)의 연구에 의하면 맥문동 괴근으로부터 추출한 prosapogenin III를 Raw264.7 세포에 처리했을 때 COX-2의 단백질 발현이 10μmol/L 농도에서부터 유의성 있게 감소하였다고 보고하였으며, Bae et al.(2019)도 구기자 단독 추출물을 Raw264.7 세포에 처리했을 때 COX-2가 농도 의존적으로 감소하였다고 보고하였다(Bae et al., 2019; Han et al., 2013). 보고된 연구들과 본 실험 결과를 비교해 본 결과 맥문동과 구기자 추출물 혼합물 모두 단독 처리군들과 비슷하게 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다.

Ⅳ. 요약 및 결론

본 연구는 맥문동과 구기자 추출물 혼합물을 이용하여 항염 효능의 건강기능성 소재 가능성을 확인하기 위해 NO 생성, 염증성 cytokine과 chemokine의 유전자 발현, 염증성 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 맥문동과 구기자 추출물을 1:1, 5:1, 10:1 비율로 혼합한 3종류의 시료를 사용하였으며, Raw264.7 세포에서 맥문동과 구기자 추출물을 1:1로 혼합한 시료가 100μg/mL 농도에서 세포독성을 보여 50μg/mL 이하의 농도를 실험에 사용하였다. LPS로 염증을 유도한 세포에 혼합 시료를 처리하였을 때 맥문동과 구기자를 1:1로 혼합한 시료의 경우 50μg/mL 농도에서 NO의 생성을 유의하게 저해하는 효과를 확인하였으며, 혼합물 10:1 비율 12.5μg/mL 한 농도에서 TNF-α 수준 변화를 제외하고 모든 혼합물의 혼합 비율에서 IL-1β, IL-6, TNF-α와 MCP-1, MIP-1α의 유전자 발현 감소를 확인하였고, COX-2의 발현 감소 효능도 관찰하여 항염 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 혼합 시료들 모두 유사한 항염 효능을 보였으나 그중 맥문동과 구기자 추출물의 혼합 비율이 1:1인 시료가 전체 반응을 종합해 볼 때 효과가 큰 것으로 확인되었다. 본 연구를 통해 맥문동과 구기자 추출물의 혼합물들의 염증 완화 효능을 확인하였고, 이는 기능성 소재 개발에 있어 복합 혼합물 소재로서의 활용 가능성이 있음을 시사한다. 추후 연구를 통해 염증과 관련한 세포 수준의 기전연구 등이 추가로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

주제어: 맥문동, 구기자, 추출물 혼합물, 항염, 산화질소

REFERENCES

김경순, 심상희, 정기화, 정춘식, ... 김박광(1998). 구기자 성분의 혈당강하작용. *한국응용약물학회지, 6(4),* 378-382.

김재구(2011). 요가 수련이 여성 고령자의 혈중 지질과 TNF-α, IL-6, CRP 에 미치는 영향. *한국사회체육학회지, 44(2),* 585-591.

김지은, 이성진, 배은영, 이선영(2022). 구기엽-구기자 혼합물의 항산화 및 항염 효능. *한국식품영양과학회지, 51(6),* 531-540.

김호석, 박지혜, 김현갑, 김재현, ... 손영주(2014). 麥門冬 에탄올 추출물이 알레르기 염증 반응에 미치는 영향. *동의생리병리학회지, 28(5)*, 512-519.

노성수, 최학주, 김동희, 서영배(2008). NOD 당뇨병 생쥐에 미치는 맥문동의 항염증 효과. *동의생리병리학회지, 22(4)*, 766-770.

박시덕, 이금홍, 이영선, 권영규, ... 신상우(2007). 보음약인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽, 황정의 면역조절 효과 비교. *동의생리뱅리학회지 제, 21(2).*

박영숙(2007). 염증성 장질환에서 COX-2 억제제의 역할: 이로운가? 해로운가?. *대한소화기학회지, 50(6)*, 350-355.

박윤자, 김미향, 배송자(2002). 구기자 추출성분의 항발암 효과 및 비타민 C 첨가에 의한 상승효과. *한국식품영양과학회지, 31(1)*, 143-148.

박현주, 유경혜, 이선영, 배은영(2022). 대전 지역 중년 여성의 맥문동차에 대한 인지도와 기호도. *한국생활과학회지, 31(6)*, 811-821.

신정식(2002). 한국산 맥문동과 중국산 소엽맥문동의 사포닌 성분. *한국작물학회지, 47(3)*, 236-239.

왕천, 옌징, 임유리, 박진우, ...김혜미(2023). 해조류 에탄올 추출물의 In vitro 항염 및 항비만 활성. *한국식품과학회지, 55(1),* 50-56.

유주희, 김경아(2023). RAW264. 7 대식세포에서 미선나무 잎 추출물의 항산화, 항염증 효능 및 기전연구. *한국영양학회지, 56(5)*, 455-468.

이용현, 임은미(2013). 女貞實이 LPS 로 유발된 Raw264.7 cell 의 염증에 미치는 영향. *대한산부인과학회지, 26(4),* 066-081.

이응석, 양수영, 김민희, 남궁욱, 박양춘(2011). 맥문동이 LPS로 유도된 폐손상에 미치는 영향. *동의생리병리학회지, 25(4)*, 641-649.

이인자, 김은정, 정성운, 양준호, 이인선(2003). 맥문동 엑스가 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. *생약학회지, 34(1)*, 65-69.

정민교(2007). 중이염의 발병기전에 있어 염증매개체들의 역할. *대한이비인후-두경부외과학회지, 50(1)*, 2-13.

조영제, 안봉전(2008). 청목노상 (Morus alba L.) 추출물에 의한 Lipopolysaccharide 로 유도된 Raw 246.7 cell 에서 염증 억제효과. *한국농화학회지, 51(1)*, 44-48.

조영제, 천성숙, 차원섭, 박준희, ...윤소정(2005). 구기자 (Lycii fructus) 추출물의 항산화와 항고혈압 효과. *한국식품영양과학회지, 34(9),* 1308-1313.

최가미, 김은영, 이윤경(2022). 다시마 추출물의 항산화와 염증 조절 효과. *한국식생활문화학회지, 37(5).*

Bae S. M., Kim J. E., Bae, E. Y., Kim, K. A., ...& Ly, S. Y. (2019). Anti-inflammatory effects of fruit and leaf extracts of Lycium barbarum in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells and animal model. *Journal of Nutrition and Health, 52(2)*, 129-138

Cho, H. J., Hyun, B. K., Sonn, Y. K., Park, C. W., ... & Yun, K. H. (2013). A Study on soil suitability criteria for Liriopis platyphylla. *Korean Society of Soil Science and Fertilizer, 46(6)*, 542-548.

Cho, S. J., Bang, M. H., Lee, I. J., Park, C. G., ... & Baek, N. I. (1998). Cytotoxicity of steroid-saponins from the tuber of Liriope platyphylla WT. *Applied Biological Chemistry, 41(5)*, 390-394.

Han, Y., Jung, H. W., Lee, D. H., Kwon, S. Y., ... & Park, Y. K. (2013). Anti-inflammatory effects of prosapogenin III from the dried roots of Liriope platyphylla in LPS-stimulated RAW264. 7 cells. *Journal of Asian Natural Products Research, 15(9)*, 1038-1049.

Isomäki, P., & Punnonen, J. (1997). Pro-and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals of Medicine, 29(6)*, 499-507.

Jeong, H. R., Sung, M. S., Kim, Y. H., Ham, H. M., ... & Lee, J. S. (2012). Anti-inflammatory activity of Salvia plebeia R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 41(7),* 888-894.

Kang, Y. G., & Lee, T. H. (2006). Liriopis Tuber improves stress-induced memorial impairments in rats. *The Korea Journal of Herbology, 21(2)*, 63-75.

Kim, H. K., Kim, Y. E., Do, J. R., Lee, Y. C., & Lee, B. Y. (1995). Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean Journal of Food Science and Technology, 27(1),* 80-85.

Kim, H. K., Lee, J. Y., Han, H. S., Kim, Y. J., ... & Lee, Y. J. (2012). Immunomodulatory effects of Liriope platyphylla water extract on lipopolysaccharide-activated mouse macrophage. *Nutrients, 4(12)*, 1887-1897.

Kim, K. A., Lee, I. A., Gu, W., Hyam, S. R., & Kim, D. H. (2014). β-Sitosterol attenuates high fat diet induced intestinal inflammation in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 in the NF-κB pathway. *Molecular nutrition & food research, 58(5)*, 963-972.

Kwon, D. J., Ju, S. M., Youn, G. S., Choi, S. Y., & Park, J. (2013). Suppression of iNOS and COX-2 expression by flavokawain A via blockade of NF-κB and AP-1 activation in Raw264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology, 58*, 479-486.

Lee, D. Y., Son, K. H., Do, J. C., & Kang, S. S. (1989). Two new steroidal saponins from the tubers of Liriope spicata. *Archives of Pharmacal Research, 12*, 295-299.

Lee, H. H., Park, C., Kim, M. J., Seo, M. J., ... & Choi, Y.

H. (2010). Inhibition of cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E2 production through down-regulation of NF-κB activity by the extracts of fermented beans. *Journal of Life Science, 20(3)*, 388-395.

Luo, Q., Cai, Y., Yan, J., Sun, M., & Corke, H. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from Lycium barbarum. *Life sciences, 76(2)*, 137-149.

Ryu, I. H., Cho, H.-B., Kim, S. B., Seo, Y. J., & Choi, C. M. (2011). The inhibitory effect of Picrasmae Lignum on inflammatory responses. *The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology, 24(1)*, 1-14.

Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6(10)*, a016295.

Watanabe, Y., Sanada, S., Tada, A., & SHOJI, J. (1977). Studies on the constituents of ophiopogonis tuber. IV. On the structures of ophiopogonin A, B', C, C', and D'. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 25(11)*, 3049-3055.

Yadav, A., Saini, V., & Arora, S. (2010). MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clinica Chimica Acta, 411(21-22)*, 1570-1579.

Yong, K. K., Chang, J. H., Chien, M. H., Tsao, S. M., ... & Yang, S. F. (2016). Plasma monocyte chemoattractant protein-1 level as a predictor of the severity of community-acquired pneumonia. *International Journal of Molecular Sciences, 17(2),* 179.

Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Kim, K. C., ... & Hyun, J. W. (2010). Cytoprotective effect of the fruits of Lycium chinense Miller against oxidative stress-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology, 130(2)*, 299-306.

Received 06 September 2024;
Accepted 02 October 2024