Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of
Ethanol Extract of *Clematis trichotoma* Nakai

Jaemee Jung, Mijoon Shin, Naeun Jeong, Dahyun Hwang

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Life and Health Sciences, Hoseo University, Asan, Korea

할미밀망 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성 평가

정재미, 신미준, 정나은, 황다현

호서대학교 생명보건대학 임상병리학과

ARTICLE INFO

Received May 21, 2021

Revised May 25, 2021

Accepted May 26, 2021

Key words

Anti-inflammation

Antioxidant

Clematis trichotoma Nakai

Functional foods

ABSTRACT

Clematis trichotoma Nakai (CTN) is a broad-leaved vine plant belonging to the family *Ranunculaceae*, native to Korea. Young leaves are used as food, and the stem and roots are used as medicinal materials. Antioxidant studies have been reported on the stems of CTN, but no studies have been conducted on the leaves. In this study, a 70% ethanol extract of CTN was prepared and its antioxidant and anti-inflammatory activities were investigated. For measuring the antioxidant activity, five assays (polyphenol and flavonoid content, reducing power, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity) were performed and CTN showed a concentration-dependent effect in all assays. To investigate the anti-inflammatory activity, we used RAW 264.7 cells. The concentrations (from 31.25 to 250 µg/mL) of CTN did not show cytotoxicity. CTN (250 µg/mL) inhibited dendritic transformation (34.4%) and also inhibited inflammation as seen by reduced levels of NO (77.4%), IL-6 (85.5%) and TNF-α (41.2%) compared to lipopolysaccharide (LPS). CTN (250 µg/mL) also suppressed the expression of the following genes: *COX-2* (79.8%), *iNOS* (93.9%), *IL-6* (87.6%), and *TNF-α* (77.3%) compared to LPS. These results demonstrated that CTN has excellent antioxidant and anti-inflammatory activities and can therefore be used as a natural biological resource.

Copyright © 2021 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

현대사회는 빠른 고령화와 생활습관 등으로 인한 만성질환의 발병이 증가하고 있다. 이에 따른 만성질환의 예방과 관리에 대한 요구가 급증하고 있다. 통계청의 사망원인통계연보에 따르면 2019년 기준으로 사망원인이 암, 심혈관질환, 당뇨병 순으로 높았고, 이는 전체 사망자의 40.7%를 차지한다고 보고되고 있다[1]. 이처럼 암이나 심혈관질환과 같은 만성질환은 생체대

사과정에서 발생하는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 기인한다고 알려져 있으며, 이는 미토콘드리아 및 peroxisome, xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase, cyclooxygenase (COX) 등의 다양한 효소들에 의해 유발된다[2]. 적절한 활성산소는 생체 내 방어나 손상을 복구시키기 위한 생리활성기전에 의해 조절되지만, 과다하게 생성되면 세포 내 DNA, RNA, 단백질 등과 반응하여 세포의 항상성을 파괴하여 조직을 손상시킨다[3].

산화적 스트레스는 세포가 반응하는 신호전달 체계를 작동시키고 과산화수소 등의 활성산소의 발생을 증가시켜 항산화 효소의 발현을 감소시킨다[4]. 항산화제(antioxidant)는 생체 내에서 생성되는 각종 활성산소에 의한 지질과산화반응을 억제하여

Corresponding author: Dahyun Hwang

Department of Biomedical Laboratory Science, Hoseo University, 20 Hoseo-ro 79 beon-gil, Baebang-eup, Asan 31499, Korea

E-mail: hhdh@hoseo.edu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1605-8509>

압, 동맥경화증 및 염증을 예방해주는 생리활성물질로서 각광을 받고 있다[5]. 그 중 합성항산화제는 대량생산이 가능하고 가격이 저렴하지만 발암성 및 독성 등 안전성 문제가 제기되면서 인체에 무해하고 항산화 효능이 우수한 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다[6].

염증은 생체에 외부 물질이 감염 또는 침입하였거나 물리·화학적 손상을 입었을 때 이를 방어하기 위한 국소적 현상이지만, 과잉의 생체 방어 반응은 정상 조직을 손상시켜 염증성 질환을 일으킨다[7]. 이 과정에서 활성산소의 일종인 산화질소(nitric oxide, NO)는 면역세포에 의해 생성되어 생리 및 병리적 과정에 중요한 역할을 한다[8]. 또한, 대식세포는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6)와 같은 염증성 사이토카인을 증가시켜, 체내 면역을 조절하고 염증 반응, 조혈 등에도 관여하는 면역계의 주요 방어기구이다[9, 10]. 그러나 이러한 숙주에서의 면역반응이 적절하지 못할 경우, 염증을 촉진시킬 뿐 아니라 염증매개체의 생합성을 가속화하고 염증을 진행시켜 조직의 손상, 신경손상 및 유전자 변이 등을 일으킨다[11]. 이러한 관점에서 염증을 저해하는 것은 체내의 면역력 관리를 위한 중요한 방안으로 대두되고 있으며, 최근 이러한 기대에 부응하여 항산화 및 항염증 효능을 가진 천연물 개발에 관심이 집중되고 있다.

1993년 생물다양성협약(Convention of Biological Diversity, CBD)이 발효된 이후, 유전자원의 공평한 접근 및 이익 공유(access to genetic resources and Benefit-Sharing, ABS)를 위해 채택된 '나고야의정서'를 이행해야 하는 상황이며, 우리나라도 생물자원을 이용하는 국가로, 국내 자원 부족으로 인한 국가 간 생물자원 이용 경쟁에 대비하여 국내 천연 생물 자원의 확보가 중요하다[12]. 현재 할미밀망의 줄기에 대한 항산화 연구는 보고되었으나 잎에 대한 연구는 보고된 바가 없으므로 본 연구의 소재로 선택했다. 할미밀망(*Clematis trichotoma* Nakai, CTN)은 미나리아재비과의 낙엽활엽 덩굴식물로서, 국내의 강원도와 백두대간 숲 가랑자리에 분포하고 있다. 할미밀망의 어린잎은 식용으로 사용되고, 줄기와 뿌리는 약재로 사용되고 있다[13]. 이전 연구에 의하면 할미밀망의 줄기에는 rutin, kaempferol 3-O-neohesperionside, adenosine, adenine, hirustrin, caffeic acid 4- β -glucoside, 3-methoxyarbutin, uridine 등이 포함되어 있고, 이는 활성산소의 생성을 억제하고 항산화작용을 한다고 알려져 있다[13]. 따라서 본 연구에서는 할미밀망 잎의 70% 에탄올 추출물을 이용하여 *in vitro*에서 항산화 및 항염증 분석을 통해 생리활성의 효능을 검증하고 천연 생물자원의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료 분양

할미밀망 추출물은 경기도경제과학진흥원 바이오센터에서 분양 받아 사용하였다(Suwon, Korea). 바이오센터에서 제공해 준 추출 조건은 다음과 같다. 건조된 54.5 g의 할미밀망에 70% 에탄올 1 L 넣은 후 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 여과하고(Advantec No.2) 40°C에서 진공 농축하였다(EYELA rotary evaporator, Japan). 최종적으로 동결 건조하여 11.46 g의 잔류물을 얻었다. 본 연구실은 이 최종 형태의 분말을 분양 받았으며, 실험 전 100 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹여 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 함량 측정

할미밀망의 총 폴리페놀 화합물의 함량 측정은 Folin-Ciocalteu법을 이용하였다[14]. 추출물을 농도별로 희석한 용액과 2% Na₂CO₃ (DAEJUNG CHEMICALS & METALS Co., Ltd, Siheung, Korea)를 동량 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 3분간 방치한 다음 50% folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 μ L를 첨가하여 plate shaker로 약 10초 교반하여 혼합하였다. 암소에서 30분 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, California, USA) 750 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다. 이때 gallic acid (DAEJUNG CHEMICALS & METALS Co., Ltd)를 이용한 표준곡선은 gallic acid의 최종 농도가 0~500 μ g/mL가 되도록 하고 이로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

3. 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Stanković MS (2011)의 방법을 약간 변형하여 추출물 10 μ L에 80% 에탄올 40 μ L를 가한 후 10% aluminium nitrate (DAEJUNG CHEMICALS & METALS Co., Ltd) 20 μ L, 1 M potassium acetate (DAEJUNG CHEMICALS & METALS Co., Ltd) 20 μ L 및 80% 에탄올 150 μ L를 순차적으로 혼합하였다[15]. 혼합액을 암소에서 10분 반응시킨 후 415 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 quercetin (Sigma-Aldrich)을 사용하여 시료와 같은 방법으로 측정하였으며 표준 검량 곡선으로부터 시료의 플라보노이드 함량을 계산하였다.

4. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

할미밀망 추출물의 환원력은 FRAP assay 측정하였다[16]. FRAP reagent를 300 mM acetate buffer (pH 3.6) 200 mL에 10 mM 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich) 20 mL, 20 mM FeCl₃ (DAEJUNG CHEMICALS & METALS Co., Ltd) 20 mL 및 DW 20 mL를 혼합하여 제조하였다. FRAP reagent 200 µL와 추출물 10 µL를 첨가시켜 암소에서 4분 동안 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 iron (II) sulfate heptahydrate (Sigma-Aldrich)를 사용하여 시료와 같은 방법으로 측정하였으며 표준 검량 곡선으로부터 시료의 환원력을 계산하였다.

5. 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 및 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성

ABTS 자유 라디칼 소거능을 이용하여 추출물의 항산화 활성을 측정하였다[17]. ABTS working solution의 제조를 위해 ABTS (Sigma-Aldrich) 7.4 mM과 potassium persulfate (DAEJUNG CHEMICALS & METALS Co., Ltd) 2.6 mM을 4°C 암소에서 24시간 이상 반응시켰다. 반응액을 734 nm에서 흡광도 값이 약 1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석한 ABTS working solution 200 µL와 추출물 10 µL를 첨가하여 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 ascorbic acid를 사용하여 시료와 같은 방법으로 측정하였으며 표준 검량 곡선에 상응하는 시료의 양이온 자유 라디칼 소거능을 구하였다.

DPPH 자유 라디칼 소거를 이용하여 추출물의 항산화 활성을 측정하였다[12]. DPPH working solution의 제조를 위해 0.2 mM의 DPPH (Alfa Aesar, Haverhill, USA)를 4°C에서 반응시켰다. 반응액을 514 nm에서 흡광도 값이 약 0.8이 되도록 메탄올로 희석하였다. 희석한 DPPH working solution 200 µL와 추출물 10 µL를 첨가하여 암실에서 30분 반응시키고 514 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 ascorbic acid를 사용하여 시료와 같은 방법으로 측정하였으며 표준 검량 곡선에 상응하는 시료의 양이온 자유 라디칼 소거능을 구하였다.

6. 세포 형태 변화 관찰 및 세포 독성 평가

RAW 264.7 마우스 대식세포 세포주는 한국세포주 은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였다. RAW 264.7 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Grand

Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin (P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)이 첨가된 DMEM (HyClone, San Angelo, TX, USA) 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37°C 배양기에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

우리는 세포의 생존력을 분석하기 위해 Cho 등 (2020)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다[18]. RAW 264.7 cell (1 × 10⁶ cell/mL)를 96 well plate에 200 µL씩 분주하고 12~16시간 동안 5% CO₂ incubator (37°C)에서 안정화 하였다. 그리고 세포의 밀도가 70~80%에 도달하면 할미밀망(31.25~250 µg/mL)을 30분 동안 세포에 먼저 처리한 후, 염증 유발 물질로 lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/mL를 넣어 24시간 동안 재배양 하였다. 음성 대조군은 LPS 없이 배양 배지만 넣은 그룹이며, 양성 대조군은 다른 물질 없이 LPS 1 µg/mL만 넣은 그룹이다. 배양이 끝난 후 세포 형태 변화를 도립 현미경(CKX53, OLYMPUS, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 활성화 지수의 백분율(%)은 5개의 무작위 필드에서 총 세포 수에 대한 수지상 돌기가 나온 세포의 비율로 정량화 하였다. 이후 세포 독성 평가를 위해 상등액을 제거한 후 serum free media에 용해시킨 10% E-Z cytotox (DoGenBio, Seoul, Korea) 100 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 30분 추가 배양하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(cell viability, %)은 LPS 처리군에 대한 백분율로 계산하였다.

7. RAW 264.7 대식세포에서 산화질소(NO) 및 전 염증성 사이토카인(TNF-α 및 IL-6) 평가

RAW 264.7 cell (1 × 10⁶ cell/mL)를 96 well plate에 200 µL씩 분주하고 12~16시간 정도 5% CO₂ incubator (37°C)에서 안정화 하였다. 그리고 세포의 밀도가 70~80%에 도달하면 할미밀망(31.25~250 µg/mL)을 30분 동안 세포에 먼저 처리한 후, 염증 유발 물질로 LPS 1 µg/mL를 넣어 24시간 동안 재배양 하였다. 음성 대조군은 LPS 없이 배양 배지만 넣은 그룹이며, 양성 대조군은 다른 물질 없이 LPS 1 µg/mL만 넣은 그룹이다. 이후, 세포 배양 상등액에 존재하는 NO₂⁻를 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 세포 배양 상등액 50 µL과 Griess 시약(sulfanilamide+85% phosphoric acid+N-(1-Naphthyl) ethylenediamide dihydrochloride) 50 µL를 96 well plate에 동량 혼합하여 10분 동안 암소에 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 sodium nitrite를 사용하여 표준 검량 곡선을 얻었다.

전 염증성 사이토카인은 상등액으로 유리된 TNF-α 및 IL-6의 함량을 보고자 각각의 sandwich ELISA set (BD bio-

science, Vancouver, Canada)로 측정하였다. 이는 ELISA 키트의 사용 설명서에 따라 수행되었다. TNF- α 및 IL-6의 함량은 제조사에서 제공하는 lyophilized recombinant standard protein을 통해 작성된 표준곡선을 이용하여 각각의 생성량 (pg/mL)을 계산하였다.

8. 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qPCR)

RAW 264.7 cell (1×10^6 cell/mL)를 96 well plate에 200 μ L씩 분주하고 12~16시간 정도 5% CO₂ incubator (37°C)에서 안정화하였다. 그리고 물질 처리방법은 산화질소 및 전 염증성 사이토카인 측정방법과 동일하다. 유전자의 발현정도를 mRNA수준에서 확인하기 위해 24시간 배양 후 Trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)를 이용하여 cDNA로 역전사 시킨 후, SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) 시약으로 Magnetic Induction Cycler PCR Machine (Bio Molecular Systems, Coomera, Australia) 기계를 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 염기서열은 Table 1에 표시하였다. 결과는 음성대조군의 유전자 발현량을 1로 상대정량 하였다($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) [19].

9. 통계처리

모든 시험은 3회 반복 실험을 통해 얻은 결과를 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. Statistical Package

for the Social Science (SPSS V12.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 통계분석을 시행하였다. 측정된 각 값의 유의성을 Student's t test로 분석하고, 대조군과의 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

1. 할미밀망 추출물의 항산화 활성효과 측정

할미밀망의 항산화 활성을 보기 위해 31.25~250 μ g/mL의 농도에서 측정하였고 Table 2에 나타내었다. Gallic acid 표준 물질로 분석한 할미밀망 추출물의 총 폴리페놀 함량은 농도에 따라 각각 142.4 μ g/mL, 161.5 μ g/mL, 220.4 μ g/mL, 386.0 μ g/mL이었으며, 할미밀망 추출물에서 농도의존적으로 폴리페놀의 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

Quercetin 표준물질로 분석한 할미밀망 추출물의 플라보노이드 함량은 농도에 따라 각각 2.63 μ g/mL, 4.18 μ g/mL, 7.33 μ g/mL, 12.89 μ g/mL이었으며, 할미밀망 추출물에서 농도의존적으로 플라보노이드의 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

Ferric ion이 ferrous ion으로 전환되는 환원력을 분석함으로써 시료 내의 총 항산화력을 측정하였다. Iron (II) sulfate heptahydrate를 표준물질로 분석한 할미밀망 추출물의 환원력은 농도에 따라 각각 363.1 μ M/mL, 830.9 μ M/mL, 1757.1 μ M/mL, 3274.5 μ M/mL이었으며, 할미밀망 추출물에서 농도의존적으로 환원력이 증가하는 것으로 나타났다.

Ascorbic acid를 표준물질로 분석한 할미밀망 추출물의 소

Table 1. PCR primer lists

Genes	Accession number	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	XM_017321385.2	ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC	TTG ATG TTA GTG GGG TCT CGC
<i>iNOS2</i>	NM_001313921.1	GCG CTC TAG TGA AGC AAA GC	TGA TGG ACC CCA AGC AAG AC
<i>COX-2</i>	NM_011198.4	CCC AGA GCT CCT TTT CAA CC	ATT TGG CAC ATT TGT TCC CC
<i>TNF-α</i>	NM_013693.3	AGC ACA GAA AGC ATG ATC CG	GTT TGC TAC GAC TG GGC TA
<i>IL-6</i>	NM_031168.2	CGA TGA TGC ACT TGC AGA AA	TGG AAA TTG GGG TAG GAA GG

Table 2. Antioxidant activities of *Clematis trichotoma* Nakai

CTN (μ g/mL)	Total phenols (μ g GAE/mL)	Flavonoids (μ g QE/mL)	FRAP (μ M FSE/mL)	Radical scavenging (%)	
				ABTS	DPPH
31.25	142.4 $\pm$ 3.8	2.63 $\pm$ 0.4	363.1 $\pm$ 8.4	34.1 $\pm$ 0.5	20.0 $\pm$ 1.0
62.5	161.5 $\pm$ 2.6	4.18 $\pm$ 1.0	830.9 $\pm$ 13.5	51.1 $\pm$ 1.0	53.0 $\pm$ 0.8
125	220.4 $\pm$ 1.2	7.33 $\pm$ 1.0	1757.1 $\pm$ 12.2	81.2 $\pm$ 1.4	85.2 $\pm$ 0.5
250	386.0 $\pm$ 18.8	12.89 $\pm$ 1.4	3274.5 $\pm$ 37.8	98.6 $\pm$ 0.7	86.4 $\pm$ 0.3

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP, ferric reducing antioxidant power; GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent; FSE, ferrous sulfate equivalent; CTN, *Clematis trichotoma* Nakai.

거 활성은 농도의존적인 결과를 나타내었다. 즉, ABTS는 250 µg/mL 농도에서 98.6%의 억제율을 보였고 DPPH는 250 µg/mL 농도에서 86.4%의 억제율을 보였다. 이는 ABTS와 DPPH에서 할미밀망 추출물이 농도의존적으로 free radical 소거 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

2. 할미밀망 추출물의 RAW 264.7 세포 독성 측정

할미밀망이 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 확인한 결과, 할미밀망의 31.25~250 µg/mL의 농도에서 LPS 1 µg/mL 단독처리군 대비 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 1). 일반적으로 비색법을 통한 세포 독성 시험에서는 무처리 대조군과 비교하여 80% 이상의 생존율을 보이는 시료에 대해서 독성이 없다고 간주되므로[12], 본 연구 결과로 확인된 할미밀망 추출물의 31.25~250 µg/mL 농도 범위에서 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않았다.

3. 할미밀망 추출물의 RAW 264.7 세포의 수지상적 형태 변화 측정

LPS는 RAW 264.7세포를 활성화시키고, 이는 분화를 통해 세포의 수지상적 형태학적 변형을 유도하는 것으로 알려져있다[20]. 따라서 할미밀망이 LPS로 유도된 RAW 264.7세포의 형태학적 변화에 영향을 미치는지 조사하였다. LPS 단독 처리군은 세포에 수지상의 형태적 변화를 유도하였지만, 할미밀망은 농도의존적 방식으로 세포의 수지상의 변화를 감소시켰다

(Figure 2A). 이를 정량분석 한 결과, LPS 단독처리군에서 수지상 형태를 갖는 세포는 40.7%로 대조군(2.0%)과 비교했을 때 크게 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 31.25~250 µg/mL 할미밀망을 처리하고 LPS를 처리했을 때, 수지상 형태를 가진 세포가 38.0%, 33.3%, 22.7%, 14.0%로 농도의존적으로 감소하였다. 할미밀망 250 µg/mL에서의 수지상 억제효과를 LPS 단독처리군과 비교한다면, 추출물이 세포 변화를 34.4% 억제한

Figure 1. Cytotoxic effect of CTN in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL of CTN for 30 min and co-treated by LPS for 24 h. NC was treated with only the culture medium, and the LPS group was treated with only 1 µg/mL LPS. Results are expressed as mean±SD of three independent tests in triplicate. Asterisks mean a significant difference between LPS group and each group by Student's t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Abbreviations: NC, Negative control; LPS, Lipopolysaccharides; CTN, *Clematis trichotoma* Nakai.

Figure 2. Effect of CTN on dendritic transformation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL of CTN for 30 min and co-treated by LPS for 24 h. NC was treated with only the culture medium, and the LPS group was treated with only 1 µg/mL LPS. Cell morphology was monitored under a light microscope at ×400 magnification. Activated RAW 264.7 cells are indicated by arrows. The activation index percentage was expressed as the number of cells with activated morphology relative to the total number of cells, quantified in 5 random fields. Results are expressed as mean±SD of three independent tests in triplicate. Asterisks mean a significant difference between LPS group and each group by Student's t-test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Abbreviations: See Figure 1.; ns, not significant.

다고 볼 수 있다(Figure 2B).

4. 할미밀망 추출물의 항염증 활성효과 측정

LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 할미밀망 추출물은 모두 통계적으로 유의한 염증매개인자 억제 활성을 나타내었다. 각각의 염증성 사이토카인을 단백질 수준에서 정량한 결과, 최고농도인 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 NO (9.1 $\mu\text{g/mL}$), IL-6 (489.3 pg/mL), TNF- α (49470 pg/mL)으로 LPS 대조군 대비 77.4%, 85.5%, 41.2%의 억제 활성을 보였다(Figure 3).

RT-PCR 결과에서 할미밀망 추출물은 모두 통계적으로 유의한 염증매개인자 억제 활성을 나타내었다. 각각의 염증성 사이토카인의 mRNA 발현량을 정량한 결과, 최고 농도인 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 LPS 대조군 대비 COX-2 (79.8%), iNOS (93.9%), IL-6 (87.6%), TNF- α (77.3%)의 억제 활성을 보였다. mRNA 및 단백질 수준에서 모두 농도 의존적으로 억제 활성을 보이는 것으로 나타났다(Figure 4).

고 찰

현재 나고야의정서가 시행됨에 따라 우리나라도 천연유래자원의 확보가 중요한 실정이다[11]. 이에 할미밀망 추출물을 연구 소재로 사용하였는데, 할미밀망은 강원도 백두대간 숲에서 자라나는 낙엽활엽 덩굴식물이며 우리나라에서만 자생하는 천

연 생물 자원이다. 할미밀망 줄기에 대한 연구는 보고되었으나 잎에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 할미밀망 잎의 70% 에탄올 추출물을 사용하여 생리활성을 분석하였다.

식물은 천연 항산화제의 잠재적 공급원으로, 태양의 방사선을 흡수하고 광합성의 2차 대사 산물로 높은 수준의 산소를 생성한다[21]. 산소 분자는 엽록체나 미토콘드리아에서 호기성 대사를 통해 활성산소(reactive oxygen species; ROS)를 지속적으로 생산하는데, 이는 생체 방어로 작용하기도 하지만 축적되었을 때 지질 산화를 일으켜 산화적 스트레스와 노화, 대사증후군과 같은 질병을 유발한다[22, 23]. 이러한 활성산소를 제거하는 항산화제로서의 효능을 평가하기 위해 5종류의 항산화 실험을 진행하였다.

우선 할미밀망의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하였다. 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분이지만, 폴리페놀 중에서도 활성산소종을 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있어 추가적으로 측정하였다[24]. 폴리페놀은 gallic acid를 기준으로 측정하였는데, 그 결과 gallic acid의 50% 효과농도(effective concentration 50; EC50) 값은 0.17 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 할미밀망의 EC50값은 0.16 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 이를 통해 할미밀망은 항산화능이 높다고 알려진 gallic acid와 비슷하거나 조금 더 높은 항산화능이 있음을 확인할 수 있었다[25]. 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준으로 측정하였는데 할미밀망의 EC50은 quercetin보다 높은 농도를 보

Figure 3. Anti-inflammatory activity of CTN in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 31.25, 62.5, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ of CTN for 30 min and co-treated by LPS for 24 h. Supernatants were collected and (A) NO, (B) IL-6, (C) TNF- α were measured. NC was treated with only the culture medium, and the LPS group was treated with only 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent tests in triplicate. Asterisks mean a significant difference between LPS group and each group by Student's t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Abbreviations: See Figure 1.

Figure 4. Changes in the mRNA expression level of inflammatory mediators by CTN in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL of CTN for 30 min and co-treated by LPS for 24 h. The cells were collected and (A) *COX-2*, (B) *iNOS*, (C) *IL-6*, (D) *TNF-α* mRNA level were estimated. NC was treated with only the culture medium, and the LPS group was treated with only 1 µg/mL LPS. Results are expressed as mean±SD of three independent tests in triplicate. Asterisks mean a significant difference between LPS group and each group by Student's t-test. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. Abbreviations: See Figure 2.

였다. 이를 통해 할미밀망의 높은 항산화력은 플라보노이드 이외의 페놀 성분에 의한 것임을 예측해 볼 수 있었다.

ABTS와 DPPH는 항산화능을 측정하는 방법 중 하나로 radical이 소거되면서 고유의 색이 발색을 잃는 원리를 이용하여 측정하였다. ABTS radical 소거 활성은 청록색으로 탈색되는 free radical의 제거 정도를 이용하였고, DPPH radical 소거 활성은 자색을 띠는 free radical로 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 탈색되는 것을 이용하여 항산화력을 확인하였다[3]. 그 결과, 할미밀망 추출물은 농도의존적으로 폴리페놀과 플라보노이드의 함량, 활성산소 소거능 및 환원력을 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 할미밀망 추출물의 우수한 항산화 활성이 있음을 시사하며 추후에 세포 실험을 통하여 활성산소(ROS)와 초과산화물 불균등화효소(superoxide dismutase; SOD) 등을 측정함으로써 그 효과를 더 명확히 입증할 예정이다.

LPS는 그람 음성균의 외막 성분으로 RAW 264.7세포의 형태학적 변형을 유도하는 것으로 알려져있다 [20]. LPS의 과도한 자극은 대식세포에서 TNF-α, IL-1β 및 IL-6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비하고, NO, prostaglandin E2 (PGE2) 등의 염증매개물질을 증가시킨다[26]. 이러한 염증성 사이토카인의 분비량이 증가할 경우 eicosanoid, 산화질소, 활성산소 등을 다량 분비시켜 조직 손상을 촉진하게 되므로 이들 효소나 유전자의 발현을 조절하는 항염증 효능을 평가하는 것은 면역질환 관리에 매우 중요하다[27]. 항염증 효과를 측정하기 위해 세포의 형태학적 변화를 관찰하고, 염증 인자의 mRNA 및 단백질 발현

양 변화를 측정하였다. 그 결과 할미밀망은 농도의존적으로 세포의 수지상의 형태학적 변화를 억제시켰다. NO는 NOS가 L-arginine을 L-citrullin으로 전환시키면서 형성되고, NOS는 *iNOS*에 의해 발현된다[11]. *iNOS*의 발현은 NF-κB 경로로 유도되며, 이는 LPS나 cytokine에 의해 과잉의 염증성 매개물들이 생산되는 중요한 메커니즘이다[28]. 특히 대식세포는 LPS 자극에 의해 생체신호전달 경로를 거쳐 면역세포가 활성화되고, 동시에 염증성인자들의 발현양이 증가하게 되는데 이 과정의 첫 단계로 mRNA 발현이 증가하게 된다[29]. mRNA level을 확인하기 위해 RT-PCR을 이용하여 *iNOS*의 염증성 사이토카인 발현량이 어떻게 변하는지 알아보았고, 실제로 사이토카인 산물인 NO의 생성을 어떻게 억제하는지 ELISA를 실시하여 확인하였다. 그 결과, mRNA, protein level에서 억제 활성이 유의하게 나타났다. 인체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 NO와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필수적으로 염증성 사이토카인이 동반되는데, 대표적인 사이토카인으로서는 TNF-α와 IL-6가 있다. TNF-α와 IL-6도 mRNA, protein level에서 억제 활성이 유의하게 나타났다. 이는 할미밀망 추출물의 항염증 효능이 우수함을 나타내고 있다.

결과를 종합하여 볼 때, *in vitro*에서 할미밀망의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, free radical 소거능 및 환원력 실험으로 우수한 항산화 효능을 입증하였다. 또한 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 NO, IL-6, TNF-α의 생산량과 *COX-2*, *iNOS*, *IL-6*, *TNF-α*의 발현을 유의하게 억제하였으며 세포의

형태학적 변화도 억제하였다. 이러한 결과는 할미밀망의 항산화 활성 및 항염증 효과를 증명하며, 향후 천연 유래 생물자원으로써 사용될 수 있을 것이다.

요약

할미밀망은 국내에서 자생하는 미나리아재비과의 낙엽활엽 덩굴식물이다. 어린 잎은 식용으로 사용되며 줄기와 뿌리는 약재로 사용된다. 할미밀망 줄기에 대한 항산화 연구는 보고되었으나 잎에 대한 연구는 현재 수행되지 않았다. 본 연구에서는 할미밀망을 70% 에탄올 추출물로 제조하고 항산화 및 항염증 생리 활성을 비교하였다. 항산화 활성을 측정하기 위해 5가지 분석(총 폴리 페놀 함량, 플라보노이드 함량, 환원력, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성)이 사용되었으며 모든 분석에서 농도 의존적 효과를 나타냈다. 항염증 활성을 조사하기 위해 RAW 264.7 세포를 사용했다. 할미밀망은 농도(31.25~250 µg/mL)에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 할미밀망(250 µg/mL)은 LPS에 비해 세포의 수지상적 형태 변화를 억제하였고(34.4%), NO (77.4%), IL-6 (85.5%) 및 TNF-α (41.2%)의 발현을 억제함으로써 염증을 낮추는 효과를 나타내었다. 또한 할미밀망 (250 µg/mL)은 LPS 단독 처리군에 비해 COX-2 (79.8%), iNOS2(93.9%), IL-6(87.6%) 및 TNF-α (77.3%)의 유전자 발현을 억제했다. 이러한 결과는 할미밀망이 우수한 항산화 및 항염증 작용을 가지고 있음을 보여준다. 그러므로 할미밀망은 향후 항산화 및 항염증 효과를 가진 천연 생물 유래 소재로 활용될 수 있을 것이다.

Acknowledgements: This research was supported by the Academic Research Fund of Hoseo University in 2020-0431.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Jung J, Graduate student; Shin M, Undergraduate student; Jeong N, Undergraduate student; Hwang D, Professor.

REFERENCES

1. Statistics Korea. Causes of death statistics in 2019 [Internet]. Seoul: Statistics Korea; 2020. 9. 22. [cited 2021 May 1]. Available from: <http://kostat.go.kr/portal/eng/pressReleases/8/10/index-board?bmode=read&bSeq=&aSeq=385629&pageNo=1&row-Num=10&navCount=10&currPg=&searchInfo=&sTarget=title&sTxt=>
2. Sung BK, Chung HY. Significances of molecular inflammation and energy metabolism during aging. *J Cancer Prev.* 2005;10: 6-17.
3. Lee SG, Kang H. Effects of Houttuynia cordata extracts of different aerial parts on antioxidants and anti-inflammatory. *Biomed Sci Lett.* 2018;24:87-92. <https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.2.87>
4. Han JS, Yi DH. Effects of pine needles fermentation extracts on antioxidant activity and inhibition of melanin synthesis. *Asian J Beauty Cosmetol.* 2012;10:619-624.
5. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Eugenol and its derivatives from Clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *J Korea Soc Food Sci Nutr.* 2011;40:1361-1369. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.10.1361>
6. Na EJ, Jang HH, Kim GR. Review of recent studies and research analysis for anti-oxidant and anti-aging materials. *J Korea Soc Food Sci Nutr.* 2016;14:481-491. <https://doi.org/10.20402/ajbc.2016.0107>
7. Park GH, Lee JY, Kim DH, Cho YJ, An BJ. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of Rosa multiflora root. *J Life Sci.* 2011;21: 1120-1126. <https://doi.org/10.5352/JLS.2011.21.8.1120>
8. Kim KS, Ryu MJ. Physiological activity of the Glycyrrhiza uralensis extracts as a cosmetic product. *Asian J Beauty Cosmetol.* 2017;15:11-22. <https://doi.org/10.20402/ajbc.2016.0084>
9. Cheon YP, Mohammad LM, Park CH, Hong JH, Lee GD, Song JC, et al. Bulnesia sarmienti aqueous extract inhibits inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *J Life Sci.* 2009;19:479-485. <https://doi.org/10.5352/JLS.2009.19.4.479>
10. Cho YJ, An BJ. Anti-inflammatory effect of extracts from Cheongmoknosang (morus alba L.) in lipopolysaccharide-stimulated Raw cells. *Appl Biol Chem.* 2008;51:44-48.
11. Kim DH, Hwang EY, Son JH. Anti-inflammatory activity of Carthamus tinctorious seed extracts in Raw 264.7 cells. *J Life Sci.* 2013;23:55-62. <https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.1.55>
12. Kim H, Kim TH, Jeon BR, Bang MH, Kim WJ, Park JW, et al. Evaluation of the physiological activity on the skin and identification of the active ingredient of leaf extract from Sanhyang sandolbae (*Pyrus ussuriensis*) as a new variety. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2020;49:35-44. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2020.49.1.35>
13. Tran MH, Phuong TT, Ki HB. Antioxidant effect of flavonoids isolated from the root of Clematis trichotoma Nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2005;13:227-231.
14. Folini O, Denis WA. Colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem.* 1915; 22:305-308.
15. Stanković MS. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of Marrubium peregrinum L. extracts. *Kragujevac J. Sci.* 2011;33:63-72.
16. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239:70-76.
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231-1237.
18. Cho BO, Che DN, Kim J, Kim JH, Shin JY, Kang HJ, et al. In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative stress activities of Kushenol C isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Molecules* 2020;25:1768. <https://doi.org/10.3390/molecules25081768>

19. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25:402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
20. Saxena RK, Vallyathan V, Lewis DM. Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells. *J Biosci*. 2003; 28:129-134.
21. Zin ZM, Abdul-Hamid A, Osman A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chem*. 2002;78:227-231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00402-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00402-2)
22. Jubany-Mari Tana, Munné-Bosch Sergi, Lópex-Carbonell Marta, Leonor A. Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. *J Exp Bot*. 2009;60:107. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern274>
23. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995;49:345-361.
24. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci. Technol*. 2012;44:337-342. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.3.337>
25. Yen G, Duh P, Tsai H. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem*. 2002;79:307-313. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00145-0)
26. Kim MJ, Bae GS, Choi JW, Jo IJ, Kim DG, Shin JY, et al. The anti-inflammatory effect of *Taraxacum coreanum* on lipopolysaccharide induced inflammatory response on RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology*. 2014;29:21-26. <https://doi.org/10.6116/kjh.2014.29.6.21>
27. Bae NY, Kim MJ, Kim BYWR, Park JH, Park SH, Sung NK, et al. Anti-inflammatory effect of *Chondrus ocellatus holmes* ethanol extract on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *J Microbial Biotechnol*. 2016;44:268-277. <https://doi.org/10.4014/mbl.1603.03004>
28. Jew SS, Bae ON, Chung JH. Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 cell line. *Toxicol Res*. 2003;19:33-37.
29. Lee KH, Kim HY, Jung HJ, Lee HK. Effect of Chungsangboha-tang on LPS induced anti-inflammatory in THP-1 cells. *Korean J. Orient Int. Med*. 2008;29:12-24.