

영경귀 뿌리 및 꽃 추출물의 간 성상세포 활성화 억제 효과

김상준¹ · 김선영¹ · 김지애¹ · 박인선¹ · 유강열¹ · 정창호¹ · 심재석² · 장선일³ · 정승일^{1*}
¹전주생물소재연구소, ²임실생약조합, ³전주대학교 대체의학대학

Inhibitory Effect of *Cirsium japonicum* Root or Flower Extract on Hepatic Stellate Cells Activation

Sang-Jun Kim¹, Seon-Young Kim¹, Ji-Ae Kim¹, In Sun Park¹, Kang-Yeol Yu¹, Chang-Ho Chung¹,
Jae-Suk Shim², Seon-II Jang³ and Seung-II Jeong^{1*}

¹Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju 561-360, Korea

²Imsil Herbal Medicine Association, Imsil 566-895, Korea

³College of Alternative Medicine, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

Abstract – This study was designed to elucidate the effects of *Cirsium japonicum* (CJ) extracts on hepatic stellate cells (HSCs, LX-2 cells) proliferation, which is induced by platelet-derived growth factor (PDGF) or transforming growth factor- β (TGF- β). The content of total phenol, flavonoid, and silymarin derivatives was more higher in CJ-flower than in CJ-root. Consistent with these results, the LX-2 cells growth inhibition was more effective in CJ-flower extract than in CJ-root extract, the complete growth inhibition concentration was 1 μ g/mL and 50 μ g/mL, respectively. These results suggest that extracts from CJ-flower can be potentially used as therapeutic substances for the regulation of HSCs activation.

Key words – *Cirsium japonicum*, Hepatic stellate cells, LX-2 cells, Liver fibrosis, Silymarin

영경귀(*Cirsium japonicum*)는 국화과의 다년초로 지혈작용, 항균작용 및 항염작용이 있는 것으로 알려져 있어 민간 및 한약처방에 널리 이용되고 있으며, 어린 전초는 나물 등으로 식용한다. 한국에는 13종 6변종 1품종이 산야에 자생하고 있다. 한방에서는 지상부 또는 지하부를 대개라 하여 약용으로 이용해 왔다. 즉 지상부는 개화기에 베고, 뿌리는 가을철에 채취하여 말려서 거어(祛瘀), 지혈(止血), 소종(消腫)의 효능으로 토혈(吐血), 뇨혈(尿血), 대하(帶下), 간염, 고혈압 등의 치료에 사용한다.^{1,2)}

영경귀속 식물에서 다양한 이차대사산물이 보고되어 있는데, 그 가운데 생리활성이 뛰어난 apigenin, luteolin, myricetin, kaempferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-neoheperioside를 포함한 약 78종의 flavonoids가 확인되었다.³⁾ 또한 영경귀는 지질과산화물을 억제하고 glutathione reductase의 활성을 증가시켜 알코올 해독을 촉진시키므로 간 보호 작용이 있다.^{4,5)} 흰무늬영

경귀(*Silybum marianum*)에 함유된 silymarin은 flavolignan으로 간장 보호작용과 알코올 유도지질 산화의 예방 및 알코올성 간경화 등에 보호효과가 있다고 보고되었다.^{6,7)}

간경변이나 간암과 같은 만성 간질환은 중요한 성인병의 원인 중 하나이다. 대개 정맥류 출혈이나 간기능 부전과 같은 간경변증의 합병증으로 사망하게 되므로, 만성 간염에서 비가역적인 간경변으로 진행되는 것을 막는 것이 만성 간질환을 치료하는 데 가장 중요하다.

간섬유화 과정에서 핵심적인 역할을 하는 세포는 간성상세포(hepatic stellate cells)이다.^{8,9)} 바이러스나 알콜 등과 같은 독성 물질에 의해 간세포가 손상을 받게 되면 쿠퍼세포가 손상된 간세포를 대식하고, 이 과정에서 쿠퍼세포는 여러 가지 종류의 사이토카인을 분비하여 휴지기의 간성상세포를 활성화시킨다. 활성화된 간성상세포는 세포 변형이 일어나 콜라겐과 같은 세포외 기질(extracellular matrix)을 생성하는데, 지속적인 간 손상이 유발되는 만성 간질환에서는 결국 세포외 기질이 지속적으로 생성되어 간의 많은 부분을 차지함으로써 비가역적인 간경변으로 진행하게 된다.^{10,11)} 간 성상세포의 활성화를 유도하는 인자는 platelet-derived

*교신저자(E-mail): seungil@paran.com
(Tel): +82-63-711-1050

growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β) 등이 있다. 간 손상시 이러한 인자들에 의해 간 정상세포의 수는 급격하게 증가하게 된다.¹²⁾

본 연구의 목적은 영경귀 지상부인 꽃과 지하부인 뿌리의 MeOH 추출물이 간 정상세포의 PDGF-BB 및 TGF- β 1에 의한 활성화에 미치는 영향을 비교하고자 하였고, 이러한 결과가 각 부위별 silymarin계 화합물과 페놀 및 플라보노이드 함량과의 상관관계를 비교하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기 - 추출을 위하여 사용한 용매인 MeOH는 1급 시약을 사용하였으며, Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 기타 시약은 Sigma-Aldrich사(MO, USA)로부터 구입하였다. Silymarin을 정량을 위해 사용한 HPLC는 Agilent 1200 Series를, 컬럼은 Synergi Hydro-RP C18 (4.6 \times 150 mm 4 μ m, Phenomenex)를 사용하였다.

시료의 추출 - 실험에 사용한 영경귀(*C. japonicum* var *ussuriense*)는 전라북도 임실군 오수면 소재 임실생약영농조합법인에서 재배한 것으로 줄기와 꽃은 2011년 5월 30일에 채취하였으며, 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실의 김홍준 교수에게 의뢰하여 동정하였고, 표본(JBMI-011)은 전주생물소재연구소 식의약품안전관리실에 보관하고 있다. 추출을 위해 꽃과, 뿌리를 음건한 후 적당한 크기로 분쇄하여 시료 100 g에 대해 10배의 MeOH를 넣어 60°C에서 4시간 동안 2회 온침 추출하였다. 추출된 시료는 여과 후 수욕상에서 감압농축하여 완전 건조시킨 다음 건조물의 무게를 측정 한 뒤 100 mg/mL의 농도가 되도록 DMSO (dimethyl sulfoxide) 용매에 녹인 뒤 -20°C에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

총 Polyphenol 함량 측정 - Folin-Denis법¹³⁾을 이용하여 영경귀 꽃과 뿌리의 추출물의 페놀성 화합물 함량을 측정하였다. MeOH에 1 mg/mL 농도로 용해시킨 시료액 300 μ L와 Folin-Denis reagent 300 μ L를 혼합하여 1분간 반응시킨 뒤 7% Na₂CO₃ 용액 300 μ L를 혼합하여 1시간 동안 암실에서 반응시킨 후, 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 0~500 μ g/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 표준 검량선을 작성하고 페놀성 화합물이 함량을 mg/g gallic acid로 나타내었다.

총 Flavonoid 함량 측정 - Moreno 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다.¹⁴⁾ 시료는 페놀성 화합물과 같은 농도로 MeOH에 녹인 후 시료액 100 μ L와 10% aluminium nitrate 20 μ L, 1M potassium acetate 20 μ L, MeOH 860 μ L를 차례로 가한 뒤 40분간 상온에서 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin 0~500 μ g/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 표준 검량

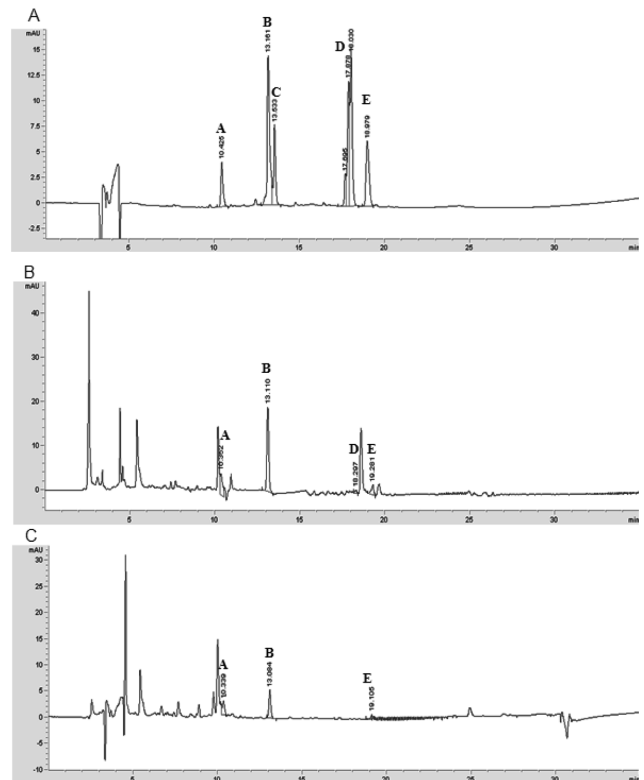


Fig. 1. Comparative chromatogram of silymarin derivatives in each sample. A: chromatogram of silymarin (standard, STD), B: chromatogram of CJ-flower extract, C: chromatogram of CJ-root extract.

선을 작성하고 총 flavonoid 함량을 mg/g으로 나타내었다.

Silymarin 함량 분석 - 영경귀 부위별 추출물을 MeOH (꽃, 90.3 mg/mL; 뿌리, 103.5 mg/mL)에 녹인 후 원심분리 (13,475 \times g, 5 min)하여 상등액을 취하여 50% MeOH (aq. v/v)로 희석하였다. 분석은 Liu 등의 방법¹⁵⁾으로 실시하였다. 분석을 위해 Synergi Hydro-RP C18, 4.6 \times 150 mm 4 μ m 컬럼(Phenomenex)과 MWD (Multi-wavelength detector)를 장착한 HPLC (Agilent 1200 series)를 사용하였다. 분석용매는 acetonitrile (A)과 0.1% formic acid (aq, B)를 사용하여 gradient 조건(0 min-20% A, 15 min-30% A, 20 min-40% A, 25 min-45% A, 25 min-45% A, 30 min-45% A, 35 min-20% A)으로 유속 0.8 mL/min으로 사용하였다. 시료 주입량은 15 μ L이며, 288 nm 흡광도에서 정량 분석하였다.

세포 배양 - Fridemann (Mount Sinai School of Medicine, New York) 교수로부터 얻은 인간 간 정상세포(LX-2 cells)와 HEK-293T cells (Human embryonic kidney cell, ATCC, Rockville, MD, USA)의 배양은 37°C에서 대기와 5% CO₂ 조건에서 시행하였다. 간 정상세포와 HEK-293T를 100 mm 배양접시(Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 배양하였으며, 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA)와 항생제가 포함된 배지를

이용하였다. 세포배양시 배지는 LX-2 cells은 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's, Invitrogen), HEK-293T cells RPMI 1640 (Invitrogen)을 사용하였다.

세포성장 측정 - LX-2 cells 및 HEK-293T cells을 96-well plate (20,000/well, Falcon)에서 24시간동안 10% FBS 가 포함된 DMEM으로 배양한 후 LX-2 cells은 serum-free DMEM으로 교환하여 24시간 후에 엉겅퀴 꽃과 뿌리 추출 물을 녹인 DMSO용액을 1~100 µg/mL의 농도로 전 처리한 뒤 TGF-β1 (10 ng/mL)과 PDGF-BB (25 ng/mL)을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 정상세포에서의 독성을 확인하기 위해 HEK-293T cells에 엉겅퀴 꽃과 뿌리 추출물을 녹인 DMSO 용액을 1~100 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포의 성장은 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetrazolium salt (MTS, Promega, Heidelberg, Germany) assay법에 따라 측정하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정 한 것이다. MTS시약을 well당 20 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 2시간 이상 반응시킨 뒤에 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에 대한 세포의 성장도를 백분율로 표시하였다.

통계처리 - 각 실험 결과를 종합하여 평균권±표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 Student's t-test를 사용하였으며 P < 0.05일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

총 Polyphenol 및 Flavonoid 함량 - 엉겅퀴 꽃 및 뿌리의 MeOH 추출물의 총 polyphenol과 flavonoid 함량 측정 결과를 Table I에 나타내었다. 꽃의 경우 polyphenol과 flavonoid 함량이 93.65 mg/g과 37.95 mg/g으로 측정되었으며, 뿌리 중에는 polypehnol과 flavonoid 함량이 27.31 mg/g과 3.34 mg/g으로 나타났다. 꽃 추출물이 뿌리 추출물에 비해 polyphenol의 경우 약 3배 이상, flavonoid는 10배 이상 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 식물에 분포되어 있는 페놀성 물질은 페놀성 수산기에 의해 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합을 형성하며, 항산화, 항염, 항균 등 다양

Table I. Total polyphenol and flavonoid content in the extract of *Cirsium japonicum* (CJ) flower or root

	CJ-F	CJ-R
Polyphenol (mg/g GAE ¹⁾)	93.65 ± 1.51 ³⁾	27.31 ± 0.21
Flavonoid (mg/g QE ²⁾)	37.95 ± 1.20	3.45 ± 0.21

¹⁾GAE: gallic acid equivalent.

²⁾QE: Quercetin equivalent.

³⁾Values are mean ± SEM (n=6)

한 생리활성을 나타낸다. 폴리페놀이 간질환에 미치는 영향에 대한 연구는 현재까지 많이 보고되었다. 엉겅퀴의 경우 silymarin계 폴리페놀 화합물이 간염 및 간경화 등 다양한 간질환에서 효과가 있다고 밝혀졌으며 이러한 효능은 silymarin의 항산화, 항염증, 면역조절 등의 기전과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁶⁾

엉겅퀴 추출물에서 Silymarin계 화합물 함량 - 엉겅퀴 꽃 및 뿌리에서 silymarin계 화합물의 함량을 비교하기 위해 HPLC를 이용하여 분석하였으며, silymarin 표준물질의 chromatogram은 Fig. 2A에 나타낸바와 같이 대표적으로 5개의 peak로 나타났고, 그중 peak A의 retention time은 10.43 min, peak B는 13.16 min, peak C는 13.53 min, peak D는 18.03 min, peak E는 18.98 min으로 나타났다. Table II에서 나타낸 바와 같이 해당 peak 중 엉겅퀴 꽃 추출물(CJ-F)에서 peak B가 엉겅퀴 뿌리 추출물(CJ-R)과 비

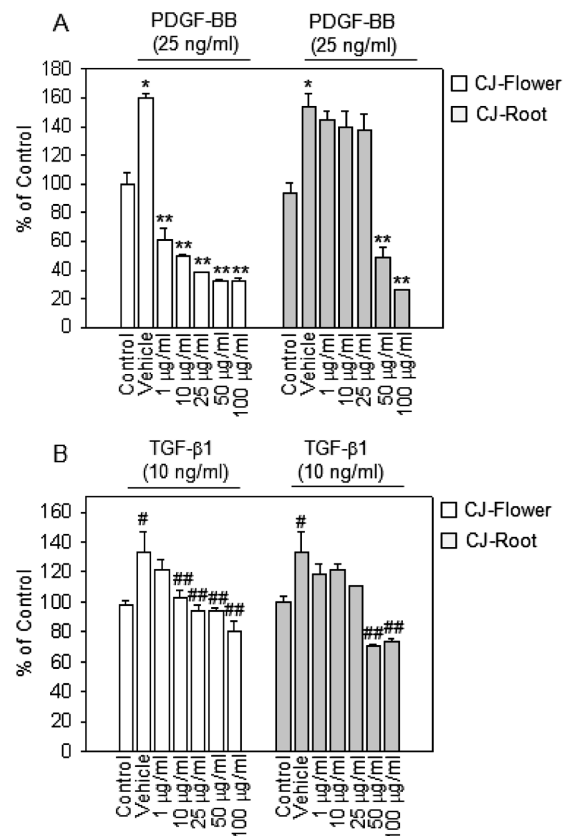


Fig. 2. Inhibitory effect of *Cirsium japonicum* (CJ) flower or root extract on PDGF-BB or TGF-β1 induced LX-2 cells growth. A: PDGF-BB (25 ng/mL) was treated after 30 min of CJ-flower or root MeOH extract treatment with dose-dependently (1 ~ 100 µg/mL). B: TGF-β1 induced LX-2 cells proliferation was blocked by CJ-flower or root pretreatment. *P < 0.05 vs control and **P < 0.01 vs vehicle. #P < 0.05 vs control and ##P < 0.01 vs vehicle. Values are means ± SE of three independent experiments.

Table II. Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mg}$) of silymarin in samples

Sample ID	Analyte	Dilution factor	Evaluated results ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Acquired results ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
CJ-F	A	100	3401.76	37.67
	B		2152.77	23.84
	C		N.C.	N.D.
	D		105.03	1.16
	E		244.47	2.71
CJ-R	A		1081.05	10.44
	B		199.19	1.92
	C		N.C.	N.D.
	D		N.C.	N.D.
	E		99.98	0.97

CJ-F: *Cirsium japonicum*-flowerCJ-R: *Cirsium japonicum*-root

N.C.: Non-calculated.

N.D.: Non-detected.

교하여 상대적으로 많은 함량을 나타냈다. 엉겅퀴 꽃 추출물에서 peak B의 함량은 $2152.77 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었으며, 엉겅퀴 뿌리 추출물에서는 $1081.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었다. 결과 약 2배 가량 높게 존재하는 결과를 보였다. 이외에도 엉겅퀴 꽃 추출물이 뿌리 추출물에 비해 peak A, D, E등에서도 비교적 높은 함량 분포를 보임을 알 수 있었다. Liu¹⁵⁾ 등에 의해 보고된 결과를 참고하였을 때 해당 peak에 대한 정보는 Table III에 나타낸 바와 같이 예상할 수 있다. Silymarin의 함량 분석결과에서도 polyphenol과 flavonoid와 같이 엉

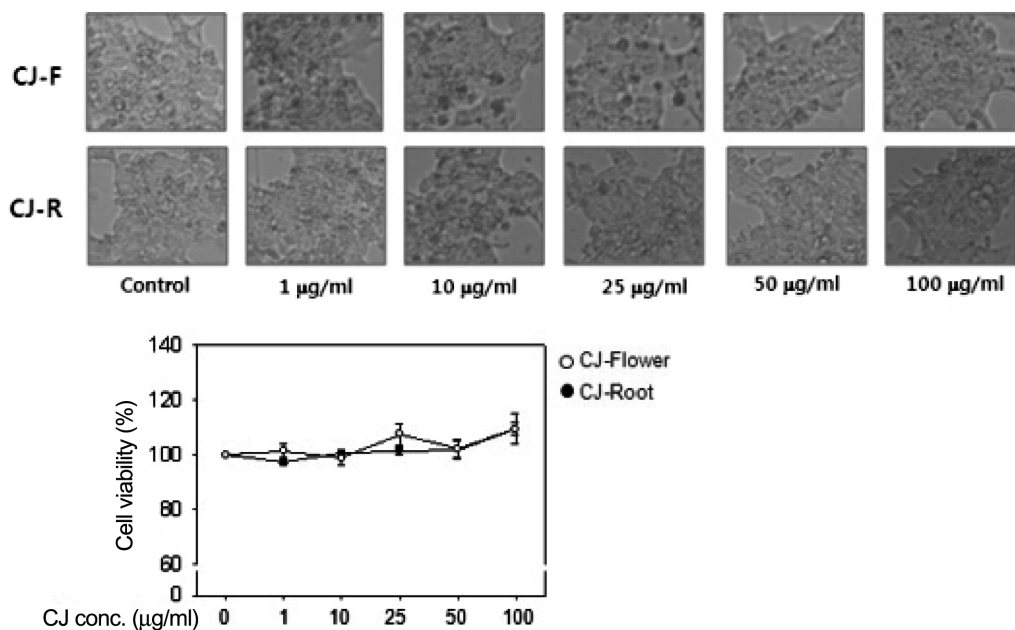
Table III. Detection of main active compounds of silymarin of retention time by HPLC

Analyte	T_R ¹⁾	Predicted analyte
A	10.43	Taxifolin
B	13.16	Silychristin
C	13.53 (18.79)	Silydianin (isosilychristin) (Silybin A)
D	18.03	Silybin B
E	18.98	Isosilybin A (isosilybin B)

¹⁾ T_R : retention time

겅퀴 꽃 추출물에서 높은 양으로 존재하는 것을 확인 할 수 있었다.

간 정상세포 성장 억제 효과 – 엉겅퀴 지상부인 꽃과 지하부인 뿌리의 MeOH 추출물의 간 정상세포 활성화에 대한 효과를 Fig. 2에 나타내었다. 정상세포는 활성화되면서 성장인자인 PDGF의 분비증가, 섬유화 유발 사이토카인인 TGF- β 를 활성화 시켜 간 정상세포의 증식을 증가시키는데, 활성화된 정상세포의 증식을 억제해 섬유화 과정을 막을 수 있다.¹²⁾ 인간 간 정상세포인 LX-2 cells에 PDGF-BB와 TGF- β 1을 처리하면 대조군에 비해 각각 약 1.5배 이상 성장이 촉진되었고, 엉겅퀴 꽃과 뿌리 추출물을 전처리하였을 때 PDGF-BB 및 TGF- β 1로 유도된 성장을 유의하게 억제하였다. PDGF-BB에 의한 활성 억제는 뿌리 추출물에 비해 꽃 추출물이 50배 정도 낮은 농도에서 보다 더 효과적이었다 (Fig. 2A). 꽃 추출물은 농도 의존적으로 PDGF-BB 및 TGF- β 1으로 유도된 LX-2 cells의 세포성장을 억제하였고, 뿌리

**Fig. 3.** HEK-293T viability of the MeOH extracts from CJ-flower or -root. CJ-F: CJ-flower, CJ-R: CJ-root.

추출물의 경우 50 μg 이상의 고농도에서 PDGF-BB 및 TGF- β 1으로 유도된 세포성장을 모두 억제하는 결과를 나타내었다(Fig. 2).

HEK-293T 세포 성장에 엉겅퀴 추출물의 효능 - 엉겅퀴 꽃 및 뿌리 추출물의 HEK-293T 세포 성장에 대한 엉겅퀴 추출물의 효능을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 LX-2 cells에서와 같은 효과를 나타내지 않았다. 이는 엉겅퀴 꽃이나 뿌리가 간 정상세포에서 PDGF-BB나 TGF- β 1으로 인한 세포 증식만을 선택적으로 억제시킴을 보여주는 결과이다.

결 론

본 연구에서는 엉겅퀴 지상부인 꽃과 지하부인 뿌리의 MeOH 추출물에서 polyphenol과 flavonoid 함량을 비교하고, silymarin 계 polyphenol 화합물의 함량을 각 추출물에서 정량하였다. 그 결과 꽃 추출물에서 각 성분의 함량이 2배에서 10배 이상 더 높게 측정되었다. 또한 인간 간 정상세포에서 PDGF-BB 및 TGF- β 1으로 유도된 세포 증식의 억제 효과, 정상세포인 HEK-293T 세포에서의 증식억제 효과 등을 확인하였다. PDGF-BB로 활성화된 간 정상세포의 성장 억제는 꽃 추출물이 뿌리 추출물에 비해 50배 이상 낮은 농도에서 효과적으로 억제되는 결과를 보였고, TGF- β 1으로 유도된 세포증식 억제효과에서도 PDGF-BB 보다는 효능차이가 적었지만 PDGF-BB에 의한 성장 억제 효과와 마찬가지로 농도 의존적으로 억제되는 경향을 확인하였다. 뿌리 추출물의 경우 50 μM 이상의 고농도에서 TGF- β 1과 PDGF-BB에 의한 간 정상세포 증식을 억제하였다. 이는 polyphenol, flavonoid, silymarin계 화합물의 함량과 유사한 경향성을 나타낸다.

이러한 결과는 엉겅퀴 꽃 추출물이 간 섬유화를 효과적으로 억제하기 위한 물질 개발에 도움이 될 것으로 기대한다.

사 사

이 논문은 2011년도 지역산업기술개발사업(#A000200136)으로 한국산업기술진흥원의 지원을 받아 연구되었다.

인용문헌

- Lee, S. J. (1996) Korean Folk Medicine, 99, 145-146, Seoul National University Press Seoul.
- Ishida, H., Umino, T., Tsuji, K. and Kosuge, T. (1987) Studies on antihemorrhagic substances in Herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 861-864.
- Chung, M. S., Um, H. J., Kim, C. K. and Kim, G. H. (2007) Development of functional tea product using *Cirsium japonicum*. *Korean J. Food Culture* **22**: 261-265.
- Park, J. C., Hur, J. M., Park J. G., Kim S. C., Park, I. R., Choi, S. H. and Choi, J. W. (2004) Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussurensis* and its principle, hipidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* **18**: 19-24.
- Lim, S. S. and Lee, J. H. (1997) Effect of *Artemisia princeps* var. *orientalis* and *Cirsium japonicum* var. *ussurensis* on serum lipid of hyperlipidemic rat. *Korean Nutr. Soc.* **30**: 12-18.
- Tsukada, S., Parosns, C. J. and Ripe, R. A. (2006) Mechanism of liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta.* **364**: 33-60.
- Winau, f., Hegasy, G. and Weiskirchen, R. (2007) Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* **26**: 117-129.
- Friedman, S. L., Roll, J. F., Boyles, J. and Bissell, D. M. (1985) Hepatic lipocytes. the principal collagen producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8681-8685.
- Bedossa, P., Houglum, K., Trautwein, C., Holstege, A. and Chojkier, M. (1994) Stimulation of collagen α 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis. *Hepatology* **19**: 1262-1271.
- Pinzani, M. Hepatic stellate (Ito) cells: expanding roles for a liver specific pericyte. (1995) *J. Hepatol.* **22**: 700-706.
- Moreno, M. I. N., Isla, M. I. N., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 109-114.
- Friedman, S. L. (1996) Hepatic stellate cells. *Prog. Liver Dis.* **14**: 101-130.
- Otto, F. and Denis, W. (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**: 239-243.
- Moreno, M. I. N., Isla, M. I. N., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 109-114.
- Liu, H., Du, Z. and Yuan, Q. (2009) A novel rapid method for simultaneous determination of eight active compounds in silymarin using reversed-phased UPLC-UV detector. *J. Chromatogr. B.* **877**: 4159-4163.
- Vogel, G., Trost, W. and Braatz, R. (1975) Studies on the pharmacodynamics, including site and mode of action of silymarin: The antihepatotoxic principle from *Silybum mar* (L) Gaertn. *Arzeittelforsch* **25**: 2-9.

(2012. 1. 27 접수; 2012. 3. 2 심사; 2012. 3. 6 게재확정)