

# 구절초(*Chrysanthemi Zawadskii Herba*)의 항염증 인자 생성 및 혈관부착인자 발현 억제 효과

## Regulatory Effects of *Chrysanthemi Zawadskii Herba* on NO Production and Vascular Adhesion Molecule Expression

손은수<sup>1</sup>

E. S. Sohn  
한국과학기술정보연구원<sup>1</sup>

김성혁<sup>2</sup>

S. H. Kim  
강원대학교  
바이오헬스융합학과<sup>2</sup>

하창우<sup>2</sup>

C. W. Ha  
강원대학교  
바이오헬스융합학과<sup>2</sup>

장소희<sup>2</sup>

S. Jang  
강원대학교  
바이오헬스융합학과<sup>2</sup>

손은화<sup>2,3</sup>

E. H. Sohn  
강원대학교  
바이오헬스융합학과<sup>2</sup>  
유한책임회사 트루비연구소<sup>3</sup>

채철주<sup>4\*</sup>

C. J. Chae  
국립한국농수산물대학교  
교양학부<sup>4</sup>

구현정<sup>5\*</sup>

H. J. Koo  
국립한국농수산물대학교  
작물산림학부<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Center for Global R&D Data Analysis, Korea Institute of Science and Technology Information, Seoul 02456, Korea

<sup>2</sup> Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

<sup>3</sup> Truebelab Co., Ltd., Samcheok 25913, Korea

<sup>4</sup> Department of Liberal Arts, Korea National University of Agriculture and Fisheries, Jeonju 54874, Korea

<sup>5</sup> Department of Crops and Forestry, Korea National College of Agriculture & Fisheries, Jeonju 54874, Korea

### ABSTRACT

The purpose of this study is to provide evidence for discovering functional materials through the anti-inflammatory efficacy screening of randomly selected medicinal herbs. We prepared 70% ethanol extracts from 10 herbs and evaluated for the inhibitory effect of NO production on LPS-stimulated mouse macrophage cell line Raw 264.7. As a result, it was confirmed that the *Chrysanthemi Zawadskii Herba* (CZ) extract had the highest effect of inhibiting NO production induced by LPS. We therefore measured and compared NO inhibitory effects at different concentrations (10, 50, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of 70% ethanol and water extract of CZ. It was observed that both ethanol and water treatment groups inhibited NO production in a concentration-dependent manner in both ethanol and water treatment groups. In particular, it was confirmed that the CZ 70% ethanol extract (99.97%) had a higher NO inhibitory effect than the water extract (93.32%) in the high concentration (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) treatment group. There was no effect of CZ extract on cell viability at all concentrations used in the experiment. Moreover, it was shown that CZ ethanol extract remarkably inhibited the expression of VCAM-1 induced by  $\text{TNF-}\alpha$ , and it was slightly decreased even by treatment with water extract. This study suggests that *Chrysanthemi Zawadskii Herba* has potential as a functional substance that regulates vascular inflammation.

**Key words :** Medicinal herb, *Chrysanthemi Zawadskii Herba*, Anti-inflammation, Vascular adhesion molecule

Received March 19, 2022

Revised March 24, 2022

Accept April 05, 2022

**\*Correspondence**

Cheol Joo Chae,  
cjchae@korea.kr,  
Hyun Jung Koo  
hjungkoo@korea.kr



## 서론

염증 (inflammation)은 병원체, 물리적 손상 및 화학 물질과 같은 외부 자극에 대한 보호 반응으로 세포막에서 arachidonic acid가 방출되고, lipoxygenase 또는 cyclooxygenase (COX) 작용을 통해 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) 및 염증성 사이토카인과 같은 염증 반응의 다양한 매개체가 생성된다. 대식세포는 이러한 전염증 매개체를 분비하여 염증 반응을 매개한다. 적당한 양의 NO는 박테리아나 종양을 사멸하는 등 정상적인 염증 반응을 통해 신체를 보호하는 역할을 하지만, 과도한 NO 생성은 염증 반응을 악화시켜 조직 손상, 유전적 돌연변이 및 신경 손상을 유발할 수 있다 (Boscá et al., 2005). 따라서 염증을 조절하기 위한 효과적인 방법이 필요하며, 전염증 매개 인자를 조절함으로써 항염증 효능이 있는 천연물 소재 개발 연구가 활발히 진행 중이다 (Kim et al., 2020).

수 세기 동안 전 세계적으로 인간은 경험을 바탕으로 한 전통의학을 광범위하게 사용해 왔으며, 다양한 약용식물의 약리작용에 의존하여 질병을 치료하고자 하였다. 현대의 의학적, 기술적 발전에도 불구하고 천연물 유래 식물에 대한 세계적인 수요는 증가하고 있다. 또한, 경험 중심의 의학에서 증거 중심의 의학으로 생약의 효능을 과학적으로 입증하기 위한 노력들이 증가함에 따라 생약의 산업적 소재로서의 가치가 높게 인정되고 있다 (Ghasemian et al., 2016). 식물이 생산하는 2차 대사 산물은 고대부터 약물의 중요한 가치를 제공하는 공급원이며, 현재 사용되는 실제 약물의 많은 수가 천연물로부터 파생된다. 이러한 식물의 유효성분 중 대부분은 염증성 질환의 치료를 위해 널리 이용되고 있다 (Mohammed et al., 2014).

금전초 (*Lysimachiae Herba*)는 과로황 (*Lysimachia christinae* Hance)의 전초로서 한방에서 담낭염 및 담석증의 치료 목적으로 사용된다고 알려져 있다 (Deng et al., 2015). 또한, 금전초 추출물의 간독성 보호, 이뇨, 항산화, 진통 효과 등이 보고된 바 있다 (Kim et al., 1996; Choi et al., 1997; Gan et al., 2010). 목천료자 (*Actinidiae Polygamiae Fructus*)는 개다래나무 (*Actinidia polygama* Miquel)의 열매로 복통, 류마티스 관절염 및 뇌졸중에 사용되었다 (Park, 2016). 냉초 (*Radix Veronicae*)는 현삼과 (*Scrophulariaceae*) 냉초 (*Veronica sibirica* L.)의 뿌리로서 류머티즘, 이질, 관절염 치료에 사용되어 왔다 (Gao et al., 2004).

현초 (*Geranii Herba*)는 쥐손이풀과 (*Geraniaceae*)

이질풀 (*Geranium thunbergii* Siebold et Zuccarini) 또는 기타 동속근연식물의 지상부로서 꽃이 피기 전 또는 꽃이 필 때 채취하며, 항돌연변이, 항염증 및 항산화 효과가 있다고 보고되었다 (Choi et al., 2012). 계심 (*Cassiae Cortex Interior*)는 녹나무과 (*Lauraceae*) 육계 (*Cinnamomum cassia* Blume)의 줄기껍질에서 주피와 겉껍질층을 없앤 것을 약용으로 하며, 전 세계적으로 가장 널리 이용하는 향신료 중 하나로 식품, 향료, 화장품 및 의약품에 사용된다 (Mishra et al. 2009). 계심은 전통의학에서 설사, 관절염, 고요산혈증의 치료제로 활용되었다 (Yang et al., 2010). 진피 (*Fraxini Cortex*)는 물푸레나무 (*Fraxinus rhynchophylla* Hance)의 줄기 껍질로서 설사, 관절염, 고요산혈증 등의 치료제로 사용되어 왔다. 울초 (*Humuli Herba*)는 뽕나무과 (*Moraceae*) 한삼덩굴 (*Humulus japonicus* Siebold et Zuccarini)의 지상부로 청열해독약으로서 혈압강하 및 이노작용이 있는 것으로 알려져 있다 (Park et al., 1995). 구절초 (*Chrysanthemi Zawadskii Herba*)는 국화과 (*Compositae*) 구절초 (*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura) 또는 산구절초 (*Chrysanthemum zawadskii* var. *coreanum* (Nakai))의 전초로서 항산화, 항진균 및 항염 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Kim, 2017). 총백 (*Allii Fistulosi Bulbus*)은 파 (*Allium fistulosum* Linné)의 신선한 비늘줄기로서 항산화, 항진균 및 항균효과가 알려져 있다 (Kyung, 2011). 고량강 (*Alpiniae Officinari Rhizoma*)은 생강과 (*Zingiberaceae*) 고량강 (*Alpinia officinarum* Hance)의 뿌리줄기로서 한의학에서 오래전부터 관절염, 해열제, 진통제, 항구토제, 위장약, 구풍제 및 진경제로 사용되어 왔다 (Lee et al., 2009).

본 연구에서는 시중에 판매되는 생약 10종을 무작위로 선정하여 항염증 약리 활성을 확인하고 우수한 소재를 발굴하여 향후 건강기능식품 및 의약 소재로 활용하기 위한 기초 자료를 제시하고자 하였다.

## 연구방법

### 실험재료

본 연구에 사용한 생약은 서울 약령시장 및 온라인에서 구입하여 감정 후 사용하였고, 샘플에 일련번호를 지정하여 보관하였다 (Voucher specimen. No. KM-1~10).

**Table 1.** List of medicinal herbs for this study

생약명	식물명	학명	이용부위
금전초 (LH)	과로황	<i>Lysimachia christinae</i> Hance (Primulaceae)	전초
목천료 (AP)	개다래나무	<i>Actinidia polygama</i> Miquel	잎, 가지
냉초 (RV)	냉초	<i>Veronicastrum sibiricum</i> (L.) Pennell	뿌리줄기, 뿌리
현초 (GT)	이질풀	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold et Zuccarini	잎, 줄기
계심 (CC)	육계	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	줄기껍질
진피 (FC)	물푸레나무	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance	줄기껍질
울초 (HH)	한삼덩굴	<i>Humulus japonicus</i> Siebold et Zuccarini	지상부
구절초 (CZ)	구절초	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> Herbich var. <i>latilobum</i> (Maxim.) Kitamura	전초
총백 (AF)	파	<i>Allium fistulosum</i> Linné	비늘줄기
고량강 (AO)	고량강	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	뿌리줄기

### 생약 및 구절초 추출물의 제조

생약 각 100 g에 물을 가하여 1 L로 한 다음 환류 냉각 추출기에서 100~120℃로 가열하여 3시간 동안 추출하여 여과한 후, 45℃ 이하의 수욕상에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 동결 건조기에서 건조시켜 얻은 분말을 실험 전까지 냉동고 (-20℃)에 보관하였다.

산구절초 분말 100 g에 물 또는 70% 에탄올 용액을 가하여 1 L로 한 다음 환류 냉각 추출기에서 100~120℃로 가열하여 3시간 동안 추출하여 여과한 후, 45℃ 이하의 수욕상에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 동결 건조기에서 건

조시켜 얻은 분말을 실험 전까지 냉동고 (-20℃)에 보관하였으며, 10 mg/mL의 농도로 DMSO에 용해시킨 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

### 세포주 및 세포배양 조건

마우스 대식세포주인 Raw 264.7는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco,

Grand Island, NY, USA) 배지를 사용해서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3일 주기로 계대 배양하여 사용하였다.

인간 대동맥 평활근 세포 (Human aortic smooth muscle cells, HASMCs)는 ScienCell Research Laboratory (San Diego, CA, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 유기 및 무기 화합물, 호르몬, 성장 인자, 미량 무기질 및 2% FBS를 포함하는 평활근 세포 배지 (ScienCell) 하에서 단층으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 계대 배양을 위해 0.01 M EDTA를 함유하는 0.125% trypsin을 사용하여 세포를 분리하였다.

## 마우스 대식세포주에서 생약 추출물의 NO 생성 억제 효능 측정

생약 추출물의 마우스 대식세포에 대한 NO 생성 조절 효능을 확인하였다. Raw 264.7 세포주 ( $1 \times 10^6$ /mL)에 생약 추출물을 250 µg/mL의 농도로 처리하여 2h 배양한 후, LPS (1 µg/mL)를 가하여 24h 배양하고, 상층액을 96 well plate에 넣고 griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 1% α-naphthylamide in H<sub>2</sub>O)와 혼합하여 실온에서 방치한 후 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

## 생약 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향

세포  $2 \times 10^4$  cells/well를 96-well plate에 접종하고 해당 농도의 생약 추출물을 처리하여 24h 배양 후 세포 생존율을 측정하였다. Cell counting Kit-8 (CCK-8) 시약 (Dojindo, Japan)을 각 well에 첨가하고 1시간 동안 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 실험은 4 반복으로 실시하여 대조군과 비교하여 계산하였다.

## Western blot analysis

구절초 추출물에 의한 혈관 세포부착 단백질 VCAM-1의 발현을 확인하기 위해 Western blot을 실시하였다. HASMC 세포주에 구절초 EtOH 또는 물 추출물을 본 연구에 적용한 농도 중 고농도 (250 µg/mL)로 2시간 동안 전처리하였다. 세포를 배지로 세척하고 TNF-α (10 ng/mL)를 포함하는 배지를 가하여 8시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% [v/v] NP-40, 0.1% [w/v] SDS)를 첨가하여 1시간 동안 용

해시킨 후 1500×g에서 10분 동안 원심분리하여 lysate을 수확하였다. 다음으로 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 단백질 농도를 정량한 후 단백질 용해물 (20 µg)을 10% SDS-PAGE로 분리하고, 분리한 단백질을 immobilon-P transfer membrane (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)에 전사 (transfer)하였다. 단백질이 전사 (transfer)된 membrane을 5% skim milk로 2시간 blocking하고, VCAM-1 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 antibody (Anti-mouse IgG)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, chemoluminescence kit (Amersham)를 사용하여 발광 정도를 측정하였다. 같은 방법으로 β-actin을 측정하여 대조군으로 사용하였다.

## 통계분석

모든 실험결과와 측정치는 mean±S.E.로 나타내었고, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 GraphPad Prism (version 2.0, USA)를 이용하여 Student's t-test와 one way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였다. 사후 검정으로 Tukey test를 5% 유의수준으로 시행하였다.

## 결과 및 고찰

### 생약 추출물의 nitric oxide (NO) 억제 효능 스크리닝

생약의 약리 효능 중 항염증은 가장 넓은 범위의 질병 치료에 적용할 수 있는 대체 의약품으로 알려져 왔다. 본 연구에서는 시중에 유통되는 생약을 무작위로 선별하여 항염증 효능이 높은 소재를 선별하기 위해 LPS에 의해 자극한 대식세포에 대한 nitric oxide 생성 억제 스크리닝을 실시하였다.

Nitric oxide (NO)는 면역계의 다양한 기능을 수행하는 세포성 매개체로서, 대식세포가 패턴 인식 수용체를 통해 병원성 물질을 감지하면 NO와 같은 전염증 매개체를 생성하여 염증 반응을 일으킨다. 여러 연구 보고에 따르면 과도한 염증반응이 지속되면 다양한 질병 발병에 밀접하게 영향을 준다고 알려져 있다. 따라서, NO의 생성을 억제하는 것은 항염증 소재를 탐색하는데 있어서 중요한 표적으로 사용되고 있다. Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 박테리아의 세포벽의 성분으로서 대식세포의 가장 강력한 활성제 중 하나이며, LPS에 의해 활성화된 대식세포 및 단핵구는 수많은 cytokine 외에도 NO 및 기타 자유 라디칼과 같은 염증 매개체를 생성하는 것으로 알려져 있다.

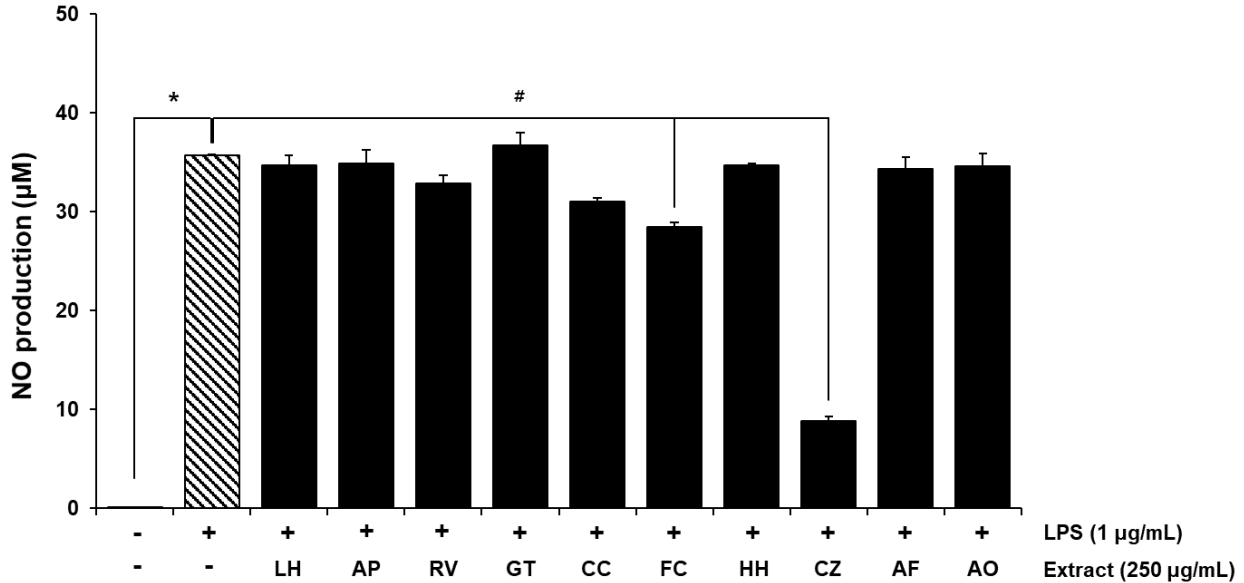


Fig. 1. Inhibitory effects of NO production in LPS-induced Raw 264.7 cells by the 70% ethanol extract of medicinal herbs. Each bar represents the means  $\pm$  SEM (n=4). Significant values are represented (\*p<0.05 compared to control, #p<0.05 compared to LPS alone). LH, Lysimachiae Herba, AP, Actinidiae Polygammae Fructus, RV, Radix Veroniceae, GT, Geranii Herba, CC, Cassiae Cortex Interior, FC, Fraxini Cortex, HH, Humuli Herba, CZ, Chrysanthemi Zawadskii Herba, AF, Allii Fistulosi Bulbus, AO, Alpiniae Officinari Rhizoma

본 연구 대상인 금전초 (LH), 목천료 (AP), 냉초 (RV), 현초 (GT), 계심 (CC), 진피 (FC), 울초 (HH), 구절초 (CZ), 총백 (AF), 고량강 (AO)의 70% 에탄올 추출물에 대한 NO 생성 억제 효능을 확인하기 위하여 추출물을 250 µg/mL의 농도로 Raw 264.7 세포에 처리하고 LPS로 자극하여 배양한 후, 배양액에 존재하는 NO 생성량을 비교하였다. 그 결과, LPS를 처리하지 않은 음성대조군과 비교했을 때, LPS 단독 처리군에서 NO 생성량이 유의하게 증가하였다. 생약 추출물 중 구절초 추출물 (CZ) 처리군에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성량이 74% 감소되어 10종의 대상 생약 중 NO 생성을 억제하는 효능이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1). 다음으로 진피 추출물 (FC)은 LPS에 의한 NO 생성을 18% 억제하였으며, 나머지 8종의 생약 추출물은 유의한 결과가 확인되지 않았다 (Fig. 1).

## 생약 추출물의 마우스 대식세포에 대한 세포독성

생약 추출물의 Raw 264.7 세포에 대한 세포 생존율을 확인하기 위해, 세포를 각 생약 추출물 250 µg/mL를 포함하는 배지에 24시간 동안 배양한 후 cell counting Kit-8 (CCK-8) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 음성대조군 (control)의 흡광도 평균을 100으로 정하고 시료 처리군의 흡광도 값을 환산하여 계산하였다. 그 결과, 대상 생약 추출물의 모든 처리군에서 상대적 흡광도는 98% 이상으로 대조군과의 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 따라서, 본 연구에 사용한 금전초, 목천료, 냉초, 현초, 계심, 진피, 울초, 구절초, 총백, 고량강의 70% 에탄올은 250 µg/mL 농도에서 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성이 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 2).



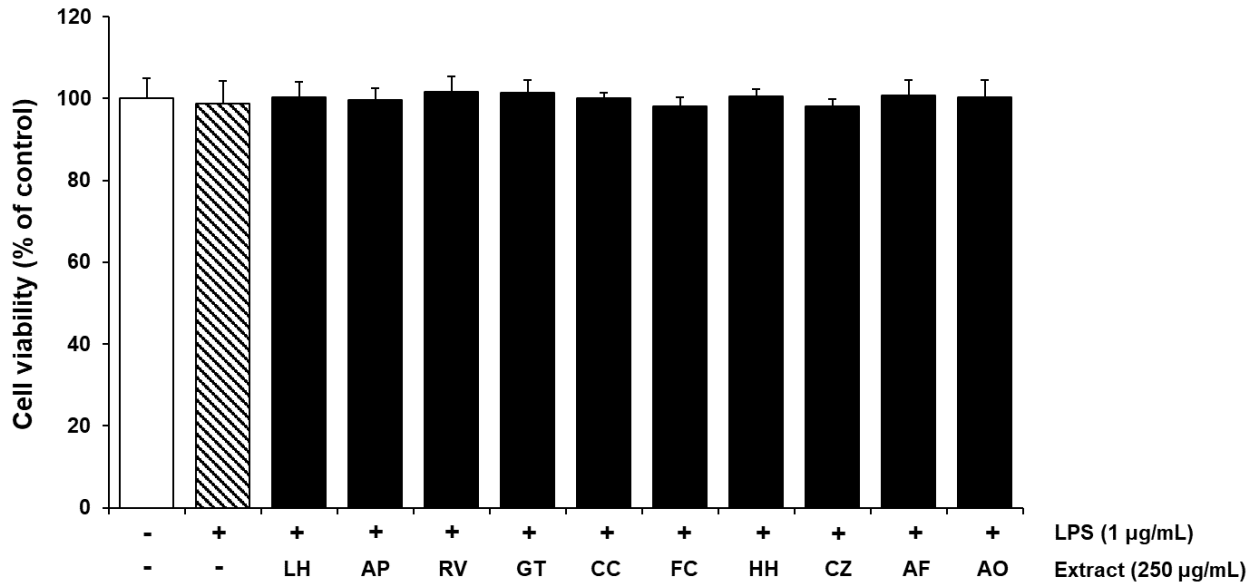


Fig. 2. Cell viability of medicinal herbs and LPS on Raw 264.7 macrophages. Each bar represents the means  $\pm$  SEM (n=4). LH, *Lysimachiae Herba*, AP, *Actinidiae Polygammae Fructus*, RV, *Radix Veroniceae*, GT, *Geranii Herba*, CC, *Cassiae Cortex Interior*, FC, *Fraxini Cortex*, HH, *Humuli Herba*, CZ, *Chrysanthemi Zawadskii Herba*, AF, *Allii Fistulosi Bulbus*, AO, *Alpiniae Officinari Rhizoma*

### 구절초의 용매 추출 조건에 따른 마우스 대식세포의 NO 생성 억제 효과

본 연구 대상인 10종의 생약 추출물에 대한 NO 생성 억제 스크리닝에서 가장 우수한 효능을 나타낸 산구절초를 70% ethanol (CZ-EtOH)과 물 (CZ-Water)로 각각 추출하여 추출 용매별 마우스 대식세포의 NO 생성 억제 효과를 비교하였다. CZ-EtOH 또는 CZ-Water를 각각 10, 50, 250 µg/mL의 농도로 Raw 264.7 세포에 처리하고 LPS로 자극하였을 때 NO 생성량을 비교하였다. Raw 264.7 세포는 LPS 자극에 의해 NO 생성량이 유의하게 증가하였으며, CZ-EtOH 및 CZ-Water 처리군 모두에서 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되는 것이 관찰되었다. 특히, 저농도 (10 µg/mL) 처리군에서 두 용매 추출군 모두 LPS로 유도된 NO 생성을 32% 동일한 수준으로 억제하였으나, 고농도 (250 µg/mL) 처리군에서 CZ-EtOH는 99.97%, CZ-Water 93.32%로 구절초 70% ethanol 추출물이 물 추출물보다 NO 생성 억제 효과가 높은 것이 확인되었다 (Fig.

3A). 생약의 추출 용매로서 70% ethanol은 물에 비해 넓은 범위의 유효성분 추출효율이 있는 우수한 추출 용매로 알려져 있다 (Sun et al., 2015).

또한, Raw 264.7 세포에서 대한 CZ-EtOH 및 CZ-Water의 세포독성 효과를 CCK-8 cell viability assay 방법을 사용하여 평가하였다. 결과는 CZ-EtOH 및 CZ-Water의 실험에 사용한 전 농도 (10, 50, 250 µg/mL)에서 세포 생존에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3B).

구절초는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 전초를 채취하여 폐렴, 기관지염, 기침, 인두염, 방광질환, 부인병, 냉증, 위장병 및 고혈압 등 전통적인 약물로 사용해 왔다. 구절초의 유효성분으로 linarin, chlorogenic acid, 3,5-o-dicaffeoylquinic acid, 4,5-o-dicaffeoylquinic acid, 정유성분 등이 알려져 있으며, 항산화, 항균, 항염증 효능이 보고되어 있다 (Shin and Choi, 1982; Kim et al., 1991; Cho et al., 2021). 본 연구 결과는 구절초의 70% ethanol과 물 추출물이 대식세포의 NO 생성을 조절함으로써 항염증 효능 소재로서 가능성을 제시한다.

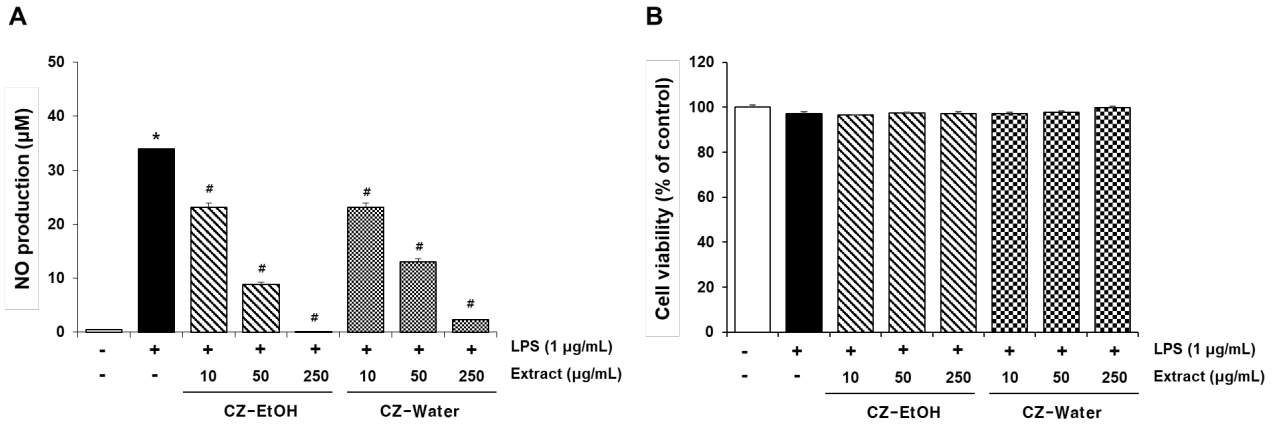


Fig. 3. A, NO production and B, cell viability of Raw 264.7 cells treated with 70% ethanol extract (CZ-EtOH) or water extract (CZ-Water) of *Chrysanthemi Zawadskii Herba*. Each bar represents the means  $\pm$  SEM (n=4). Significant values are represented (\*p<0.05 compared to control, #p<0.05 compared to LPS alone).

### 구절초 추출물의 혈관 세포부착인자 발현 억제 효과

대동맥 평활근세포 (aortic smooth muscle cells)가 염증 상태가 되면 전염증 매개체의 발현을 유도하고, 혈관의 세포 부착 분자 (cell adhesion molecules)의 발현을 상향 조절함으로써 혈관세포와 단핵구 사이의 상호 작용을 통해 혈관벽의 염증과 죽상 동맥경화증의 진행에 기여한다 (Cook-Mills et al., 2011).

본 연구에서 10종의 생약 추출물에 대한 NO 억제 스크리닝을 통해 가장 높은 활성을 나타낸 구절초 추출물에 대해 혈관 세포부착인자의 발현 조절 효능을 확인하고자 하였다. 구절초를 70% ethanol (CZ-EtOH) 및 물 (CZ-Water)로 각각 추출하여 인체 대동맥 평활근 세포주 HASMCs에 TNF- $\alpha$ 에 의한 부착인자의 발현에 대한 구절초 추출물의 효과를 Western blot 방법으로 평가하였다. Western blot 분석 결과, HASMC 세포에서 TNF- $\alpha$  자극에 의해 VCAM-1의 발현이 증가하였음을 확인하였다 (Fig. 4A). 한편, 구절초 EtOH (CZ-EtOH) 전처리 는 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 VCAM-1의 발현을 현저하게 억제하였으며, 물 추출물 (CZ-Water) 처리에 의해서도 CZ-EtOH 만큼 현저한 결과는 아니지만 VCAM-1의 발현이 약간 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A).

HASMC에 대한 구절초 추출물의 세포독성 효과는 CCK-8 cell viability assay 방법을 사용하여 평가하였다. 실험 결과 구절초 EtOH (CZ-EtOH) 및 물 추출물 (CZ-Water) 모두 실험에 사용한 전 농도에서 세포 생존력에 영향을 미치지 않았음이 확인되었다 (Fig. 4B). 따라서, 본 연구 결과 구절초 물 추출물 및 70% ethanol 추출물은 향후 혈관의 항염증 효능 및 기전 연구를 통해 기능성 소재로서의 가치가 높을 것으로 사료된다.

### 적요

본 연구에서는 시중에 유통되는 생약 10종 (금전초, 목천료, 냉초, 현초, 계심, 진피, 울초, 구절초, 총백, 고량강)을 무작위로 선정하여 생약의 생리활성 효과를 스크리닝하였다. 각 생약을 70% 에탄올로 추출한 다음 추출물의 마우스 대식세포에 대한 NO 생성 억제 효능을 확인한 결과, 구절초 추출물이 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제하는 효과가 가장 높은 것으로 확인되었다. 따라서, 구절초 70% ethanol 및 물 추출물에 대한 농도별 NO 생성 억제 효능을 측정하였다. 구절초 추출물은 두 용매 추출물 모두에서 대식세포의 NO 조절 효과가 우수한 것으로 나타났으며,

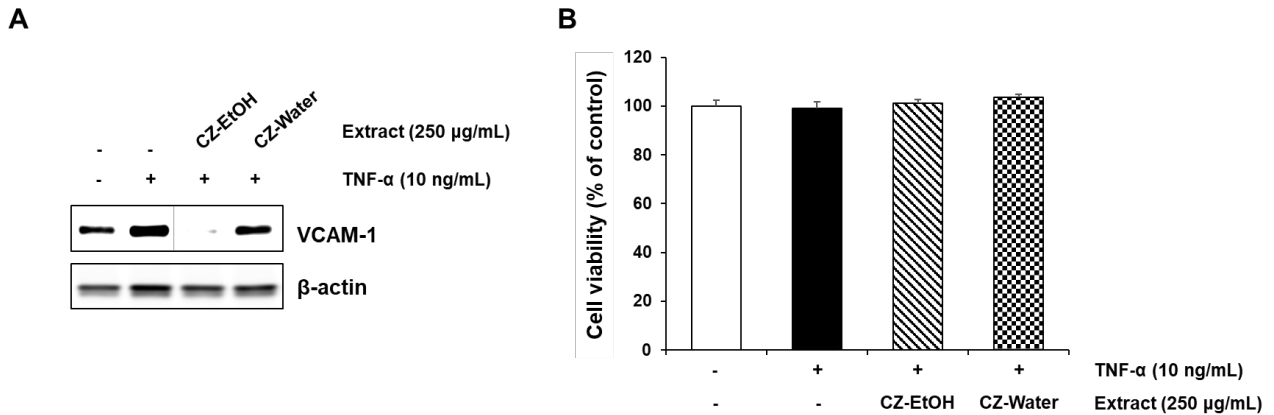


Fig. 4. Effects of *Chrysanthemi Zawadskii Herba* extracts (CZ-EtOH, ethanol extract or CZ-Water, water extract) on TNF- $\alpha$ -induced upregulation of adhesion molecules. A, Expression levels of VCAM-1 were determined by western blot analysis;  $\beta$ -actin was used as an internal control. B, Cell viability of human aortic smooth muscle cells (HASMCs) treated with 70% ethanol extract (CZ-EtOH) or water extract (CZ-Water) of *Chrysanthemi Zawadskii Herba*. Each bar represents the means  $\pm$  SEM (n=4).

70% ethanol 추출물의 고농도 (250 µg/mL) 처리군에서는 LPS에 의해 유도된 NO를 99% 이상 억제하는 것으로 확인되었다. 또한, 구절초 70% ethanol 및 물 추출물이 인체 대동맥 평활근 세포주 HASMCs에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 부착인자의 발현 억제 효능을 확인하였다. 그 결과, 구절초의 70% ethanol 추출물 및 물 추출물이 TNF- $\alpha$ 로 자극된 인체 대동맥평활근 세포주 HASMC에서 세포 부착 인자의 발현을 억제하였으며, 이 결과는 구절초가 혈관 염증을 조절할 수 있는 가능성을 제시한다. 본 연구 결과는 구절초의 항염증 및 혈관 염증 조절 기능 소재로서 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. 2005. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicol.* 208(2):249-258.
- Cho BO, Shin JY, Kang HJ, Park JH, Hao S, Wang F, Jang SI. 2021. Anti-inflammatory effect of *Chrysanthemum zawadskii*, peppermint, *Glycyrrhiza glabra* herbal mixture in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Mol Med Rep.* 24(1):1791-2997.
- Choi JW, Park JC, Lee CK. 1997. Biologic activities of *Lysimachiae Herba* II-analgesic and antiinflammatory effects of ethyl acetate fraction and a phenyl propanoid component, *Nat Prod Sci.* 3(2):135-140.
- Choi SJ, Kim JK, Jang JM, Lim SS. 2012. Inhibitory effect of the phenolic compounds from *Geranium thunbergii* on rat lens aldose reductase and galactitol formation. *Korean J. Medicinal Crop Sc.i* 20(4):222-230.
- Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. 2011. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signa.l* 15(6):1607-1638.
- Deng J, Ren M, Dai X, Qu D, Yang M, Zhang T, Jiang B. 2015. *Lysimachia christinae* Hance regresses preestablished cholesterol gallstone in



- mice. *J Ethnopharmacol.* 166:102-108.
7. Gan RY, Kuang L, Xu XR, Zhang Y, Xia EQ, Song FL, and Li HB. 2010. Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecules* 15(9): 5988-5997.
  8. Gao W, Zhang R, Jia W, Zhang J, Takaishi Y, Duan H. 2004. Immunosuppressive diterpenes from *Veronicastrum sibiricum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 52(1): 136-137.
  9. Ghasemian M, Owlia S, Owlia MB. 2016. Review of anti-inflammatory herbal medicines. *Adv Pharmacol Sci.* 2016: 9130979.
  10. Kim CW, Chang KJ, Kim YB, Kim DH, Chae CJ, Choi HG, Koo HJ. 2020. Anti-inflammatory and cytotoxic screening evaluation of macroalgae resources. *J Prac Agri Fish Res.* 22(2):69-79.
  11. Kim HS. 2017. Extracts of *Chrysanthemum zawadskii* attenuate oxidative damage to vascular endothelial cells caused by a highly reducing sugar. *Cytotechnology.* 69:915-924.
  12. Kim HY, Kim SS, Lee CK, Choi JW. 1996. Biological activities of *Lysimachiae herba*-(1)-effects of the pretreatment of *Lysimachiae herba* on the enzyme activities in galactosamine-intoxicated rats. *Korean J Pharmacogn.* 27(1):58-64.
  13. Kim TJ, Lee TR, Park HK. 1991. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Linarin in *Chrysanthemum Sibiricum* Fisherby Liquid Chromatography. *J Kor Chem Soc.* 35(6):720-724.
  14. Kyung KH. 2011. Antimicrobial properties of allium species. *Curr Opin Biotechnol.* 23:1-6.
  15. Lee JS, Kim KA, Jeong SH, Lee SG, Park HJ, Kim NJ, Lim S. 2009. Anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-psychiatric effects by the rhizomes of *Alpinia officinarum* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol.* 126(2):258-264.
  16. Mishra A, Bhatti R, Singh A, Singh IMP. 2009. Ameliorative effect of the cinnamon oil from *Cinnamomum zeylanicum* upon early stage diabetic nephropathy. *Planta Med.* 76:412-417.
  17. Mohammed MS, Osman WJA, Garelnabi EAE, Osman Z, Osman B, Khalid HS, Mohamed MA. 2014. Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *J Phytopharmacol.* 3(4):275-285.
  18. Park EJ. 2016. Quality characteristics of muffin added with *Actinidia polygama* powder. *Culi Sci & Hos Res.* 22(2):125-135.
  19. Park SW, Kim SH, Chung SK. 1995. Antimutagenic effects and isolation of flavonoids from *Humulus japonicus* extract. *Korean J Food Sci Technol.* 27(6):897-901.
  20. Sin SH, Choi YY. 1982. Analysis of essential oil from *Chrysanthemum sibiricum* and the comparison with essential oils from some *Chrysanthemum sibiricum* spp. *Kor J Pharmacog.* 13(4):153-156.
  21. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. 2015. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:595393.
  22. Yang EJ, Kim SI, Ku HY, Lee DS, Lee JW, Kim YS, Seong YH, Song KS. 2010. Syringin from stem bark of *Fraxinus rhynchophylla* protects Abeta(25-35)-induced toxicity in neuronal cells. *Arch Pharm Res.* 33(4):531-538.