

## RAW 264.7 에서 MAPKs 경로를 통한 *Rumex acetosa* L.의 항염증, 항산화 효과

성진영<sup>\*,†</sup> · 김용민<sup>\*\*,††</sup>

\*세명대학교 화장품과학과, 석사 대학원생

\*\*세명대학교 화장품과학과, 교수

(2022년 7월 1일 접수, 2022년 9월 2일 수정, 2022년 9월 17일 채택)

### Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effects of *Rumex acetosa* L. in RAW 264.7

Jin Young Sung<sup>†</sup> and Yong Min Kim<sup>††</sup>

Department of Cosmetic Science, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Korea

(Received July 1, 2022; Revised September 2, 2022; Accepted September 17, 2022)

**요약:** 본 연구에서는 과도한 산화 스트레스에 따른 각종 염증 질환과 피부 노화를 예방하기 위해 수영 지상부 (aerial parts of *Rumex acetosa* L.) 추출물의 항염증, 항산화 효과를 확인하였다. ABTS assay를 시행한 결과 농도 의존적으로 radical 소거능이 증가함을 확인하였다. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 억제능은 DCF-DA assay를 통하여 확인하였고, 농도 의존적인 ROS 생성억제를 확인하였다. ROS에 따른 세포 핵 손상 억제 효과는 DAPI staining을 통하여 확인하였다. 또한 iNOS, COX-2의 mRNA 발현 수준은 qPCR을 통하여 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다. iNOS, COX-2의 단백질 수준을 western blotting을 통해 확인한 결과, iNOS는 모든 농도에서 유의하게 감소하였으며, COX-2는 800 µg/mL에서 유의하게 감소하였다. iNOS에 의해 생성된 NO의 생성 억제 효과는 NO assay로 확인하였으며 농도 의존적으로 NO가 감소하였다. 또한, MAPKs 신호전달 경로 중 ERK와 JNK의 인산화를 억제하였다. 따라서 *Rumex acetosa* L.은 MAPKs 경로를 통한 항염증 효과와 항산화 효과를 보여 항염증 및 항산화 화장품 원료로 사용될 수 있는 가능성이 있다.

**Abstract:** In this study, the anti-inflammatory and antioxidant effects of aerial parts of *Rumex acetosa* L. extract were confirmed to prevent various inflammatory diseases and skin aging caused by excessive oxidative stress. As a result of ABTS assay, it was confirmed that the radical scavenging ability increased in a concentration-dependent manner. ROS inhibitory ability was confirmed through DCF-DA assay, and concentration-dependent inhibition of ROS production was confirmed. The effect of inhibiting cell nuclear damage according to ROS was confirmed through DAPI staining. In addition, it was confirmed that the mRNA expression levels of iNOS and COX-2 were inhibited in a concentration-dependent manner through qPCR. As a result of confirming the protein levels of iNOS and COX-2 by western blotting, iNOS was significantly decreased at all concentrations, and COX-2 was significantly decreased at 800 µg/mL. The inhibitory effect on the production of NO generated by iNOS was confirmed by NO assay, and NO was decreased in a concentration-dependent manner. In addition, phosphorylation of ERK and JNK in the MAPKs signaling pathway were inhibited. Therefore, *Rumex acetosa* L. has the potential to be used as an anti-inflammatory and antioxidant cosmetic raw material by showing anti-inflammatory and antioxidant effects through the MAPKs pathway.

**Keywords:** *Rumex acetosa* L., inflammation, anti-oxidative, MAPKs, Raw 264.7

† 주 저자 (e-mail: whole4121@naver.com)

call: 049-649-1616

†† 교신저자 (e-mail: dragonroom@semyung.ac.kr)

call: 049-649-1616

## 1. 서 론

염증반응은 생체 내에 외부 유해 물질이 유입되었을 때 발생하는 조직 손상을 국소화하여 몸을 보호하려는 방어 기전이다. 관련 세포로는 대식세포가 있으며, 대식세포는 항상성, 면역 조절, 염증성 질환과 관련된 주요 면역 세포이다. 대식세포막에 존재하는 toll-like receptor4 (TLR4)는 그람 음성 세균의 외막의 내독소 성분인 LPS를 인식하여 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38를 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호 전달 경로를 유발한다[1]. MAPKs는 세포의 증식, 분화, 염증, 세포 사멸 등 다양한 세포 내 생물학적 반응을 조절한다[2]. MEK/ERK 신호 전달 경로 중 ERK kinase (MEK; MAP kinase kinase)는 MAPKs를 활성화하고, ERK는 핵으로 전위되어 전사 인자를 인산화하여 활성을 조절한다[3]. 활성화된 대식세포는 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible NOS (iNOS) 과 같은 염증 매개 물질을 생성하여 염증반응을 촉진시킨다[4].

염증반응은 생체를 보호하는 데에 중요한 반응이지만, 이러한 염증반응이 계속되면 대식세포는 ROS를 생성하여 인체 조직을 손상시키며 기관지염, 부종, 암과 같은 다양한 질병을 야기할 수 있다[5,6]. 따라서 ROS와 염증 관련 질병을 개선하기 위해서는 MAPKs의 활성 조절이 중요하다[2]. 최근에는 이러한 산화 스트레스의 생성을 경감시킬 수 있는 항염증제에 대한 관심이 높아지면서 보다 친환경적인 식물의 생리 활성 및 약리작용의 연구가 활발히 이루어지고 있다[7,8].

한편, ROS는 DNA 구조를 붕괴시켜 DNA를 손상시키고 세포 소기관에 영향을 미쳐 세포 사멸(apoptosis)을 유도한다[9]. 세포 사멸은 조직의 항상성 유지와 비정상 세포의 제거 등에 필수적인 과정이나 뇌졸중, 알츠하이머병 및 심혈관계 질환(cardiovascular disease)에서 조직 손상을 초래한다[10]. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining은 세포사멸의 특징적인 형상인 DNA 절편화와 핵의 응집을 관찰할 수 있는 시험법이다. Apoptosis된 세포의 세포막은 투과성이 증가되어 살아있는 세포에 비하여 더 많은 양의 DAPI가 투과된다. 이후 DAPI는 핵을 투과하고 DNA의 A-T 염기서열이 많은 부분과 결합하여 푸른색의 형광을 띠기 때문에 빛의 세기로 세포의 세포 사멸을 확인할 수 있다[11].

수영(*Rumex acetosa* L., *R. acetosa* L.)은 대한민국, 일본

및 북반구의 온대지방에 분포한 마디풀과 여러해살이풀이다. *R. acetosa* L.의 지상부는 전통 유럽 의학에서 구강 상피 조직의 염증성 질환 치료제로 사용되어 왔으며, DNA 염기서열의 돌연변이를 효과적으로 억제하기로 알려져 왔다[12,13]. 또한 hyperin, proanthocyanidin 및 phloroglucinol 유도체를 포함하고 있어 이노작용, 항고혈압, 항염증 작용, 항산화 작용, 항균작용 등 다양한 약리작용을 보유하고 있지만, 대식세포에서 항염증 기전 연구와 항산화 연구는 아직 보고되지 않았다[14]. 따라서 본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 *R. acetosa* L. 지상부의 항염증 및 항산화 효과의 기전을 연구하고 핵 보호 효과를 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

수영(*R. acetosa* L.)의 뿌리를 제외한 잎과 가지(전초)는 제천한방약초(Korea)에서 구매하였다. 70% 에탄올을 사용하여 50 °C에서 48 h 동안 추출한 뒤, 추출액은 1 µm 필터로 여과하였다. 그 후 evaporator를 사용하여 감압 농축하고 -20 °C에서 동결 건조하였다. 수율은 20%이며, serum free DMEM에 용해하여 실험에 사용하였다.

### 2.2. 세포 배양

본 연구에 사용한 RAW 264.7은 american type culture collection (ATCC; Manassas, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (GenDEPOT, USA)과 penicillin/streptomycin (GenDEPOT, USA)가 첨가된 dulbecco's modified eagle's medium (GenDEPOT, USA) 배지에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### 2.3. ABTS Radical 소거능 측정

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; Sigma, USA)는 radical을 보유하고 있지 않기 때문에, radical 형성을 위하여 2.45 mM potassium persulfate와 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt를 혼합하고 암실에서 24 h 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer (Synergy HT, bio-TEK, USA)를 이용하여 용액의 흡광도 값이 0.75 부근이 되도록 측정한다. 이후 *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 및 800 µg/mL)로 제조하고 농도별 *R. acetosa* L. 20 µL와 ABTS 100 µL를 30 min

동안 96 well plate에서 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4. MTT Assay

RAW 264.7을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24 h 동안 배양하였다. 상층액 제거 후 *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 및 800 µg/mL)로 처리한 뒤 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24 h 동안 배양하였다. 이후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (Bio basic, Canada)를 처리하고 3 h 동안 반응한 후 dimethyl sulfoxide (Bio basic, Canada)로 세포를 용해시켜 spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.5. DCF-DA Assay

RAW 264.7을 6 well plate에  $4 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 24 h 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 이후 LPS (1 µg/mL)와 *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 및 800 µg/mL)로 처리하고 24 h 동안 배양한 후, 상층액을 제거하고 PBS로 1 ~ 2회 세척하였다. 세척 후 10 µM의 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma, USA)를 well 당 2 mL 씩 처리하고 30 min 동안 incubator에서 반응시켰다. 측정 직전에 PBS 2 mL를 넣고 형광 현미경으로 관찰하였다.

#### 2.6. DAPI Staining

RAW 264.7을 6 well plate에  $4 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24 h 배양하였다. 이후 LPS (1 µg/mL)와 *R. acetosa* L.을 농도별로 (100, 200, 400 및 800 µg/mL) 처리하고 24 h 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 methanol로 1 ~ 2회 세척 후 methanol에 용해한 1 µM의 DAPI (Sigma, USA)를 well 당 2 mL 씩 처리하고 15 min 동안 incubator에서 반응시켰다. 관찰 직전에 PBS 2 mL를 넣고 형광 현미경으로 관찰하였다.

#### 2.7. Quantitative Real Time PCR (qPCR)

RAW 264.7을 6 well plate에  $7 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 24 h 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 24 h 후 LPS (1 µg/mL)와 *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 및 800 µg/mL)로 처리하고 24 h 동안 배양한 후, trizol reagent (Ambion, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 그

**Table 1.** Gene Name and Assay ID Number in qPCR Analysis

| Symbol | Gene name                                | Assay ID      |
|--------|--|---------------|
| GAPDH  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Mm99999915_g1 |
| iNOS   | Inducible nitric oxide synthase          | Mm00440502_m1 |
| COX-2  | Cyclooxygenase 2                         | Mm00478374_m1 |

후 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma, USA) 20 µL로 용해하였다. 용해된 RNA를 정량한 뒤 cDNA 합성 kit (reverta ACE-A-, Toyobo, Japan)를 사용하여 RNA를 cDNA로 합성하였다. iNOS, COX-2의 유전자 발현 수준을 확인하기 위하여 taqman master mix (Thermo fisher, USA) 10 µL, primer 1 µL, DEPC 4 µL, cDNA 5 µL를 혼합하여 qPCR을 진행하였다. qPCR은 thermo fisher 사의 quantstudio 1을 이용하였으며, 실험에 사용된 probe들은 Table 1에 나타내었다.

#### 2.8. NO Assay

Nitric oxide (NO)의 함량을 측정하기 위해 RAW 264.7을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24 h 동안 배양하였다. 이후 LPS (1 µg/mL)와 *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 및 800 µg/mL)로 처리하고 24 h 동안 배양한 후 상층액과 griess reagent (Sigma, USA)를 동일한 비율로 반응시켜 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.9. Western Blotting

RAW 264.7을 6 well plate에  $7 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주한 뒤 24 h 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 이후 LPS (1 µg/mL)와 *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 및 800 µg/mL)로 처리하고 24 h 동안 incubator에서 배양하였다. 상층액을 제거하고 ripa lysis and extraction buffer (Thermo fisher, USA)를 이용하여 세포 용해 후 얻은 단백질을 BCA assay (Thermo fisher, USA)를 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질에 5X SDS-PAGE loading buffer (Biosesang, Korea)을 사용하여 염색해 준 뒤 전기 영동 한 후 gel을 membrane에 transfer 하였다. transfer가 완료되면 5% skim milk (BD bio, USA)로 1 h 동안 blocking 한 후 각각의 항체들과 함께 membrane을 shaker 위에서 over night 하였다. tris buffered saline with tween 20 (TBST)를 사용하여 5 min 단위로 3 ~ 4회 반복 washing 후 2차 항체를 첨

**Table 2.** Antibody Name and Assay ID Number in Western Blotting Analysis

| Symbol         | Antibody name   | Assay ID |
|----------------|---|----------|
| $\beta$ -actin | $\beta$ -actin (13E5) Rabbit mAb  | 4970S    |
| iNOS           | iNOS (D6B6S) Rabbit mAb   | 13120S   |
| COX-2          | Cox2 (D5H5) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb  | 12282S   |
| p-MEK          | Phospho-MEK1/2 (Ser221) (166F8) Rabbit mAb  | 2338     |
| MEK            | MEK1/2 (47E6) Rabbit mAb  | 9126S    |
| p-ERK          | Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb | 4370S    |
| ERK            | p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb   | 4695S    |
| p-JNK          | Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit mAb                                 | 4668S    |
| JNK            | SAPK/JNK Antibody   | 9252S    |
| p-p38          | Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb                  | 4511S    |
| p38            | p38 MAPK (D13E1) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb   | 8690S    |

가하고 2 h 동안 shaking 해주고 TBST로 washing 후 단백질 발현을 확인하였다. 실험에 사용된 항체들은 Table 2에 나타내었다.

### 2.10. 통계 분석

본 연구 데이터는 3회 반복 실험하였으며 SPSS 12.0 version (SPSS Inc, USA) 프로그램을 사용하였다. 데이터는 student *t*-test를 통하여 비교 분석하였고, 모든 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였다. 통계적 유의수준은 5%로 검증하였다.

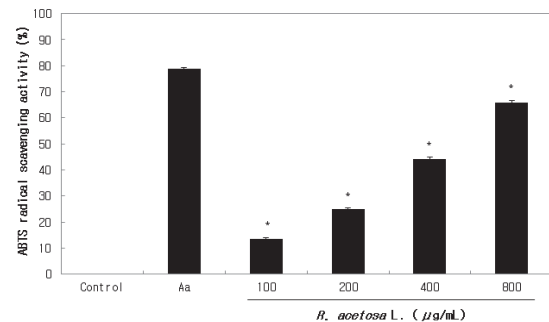
## 3. 실험 결과

### 3.1. ABTS Radical 소거능 측정 결과

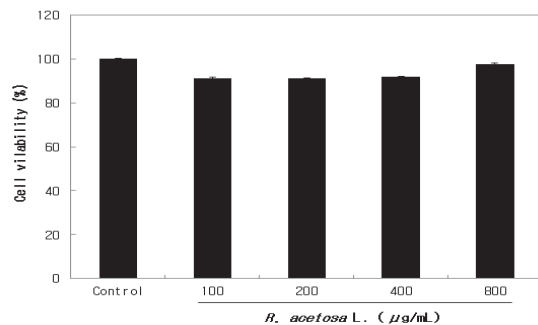
*R. acetosa* L.의 항산화 효과를 ABTS radical 소거능으로 측정하였다. 대조군은 200  $\mu$ M의 ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였으며, 농도별(100, 200, 400 및 800  $\mu$ g/mL) *R. acetosa* L.을 처리하였을 때 각각 13.6, 25, 44.2, 65.8%의 radical 소거능을 나타내었다. IC<sub>50</sub> 값은 500  $\mu$ g/mL로 나타났다(Figure 1).

### 3.2. MTT Assay를 통한 세포 생존율 측정 결과

*R. acetosa* L.에 대한 RAW 264.7의 세포 생존율을 확인한 결과 control 군에 비하여 91.3  $\pm$  1.31, 91.0  $\pm$  0.78, 91.7  $\pm$  1.87, 97.5  $\pm$  0.68%로 나타났다. RAW 264.7 대식세포에서 *R. acetosa* L.은 100, 200, 400 및 800  $\mu$ g/mL 농도범위에서 독성이 없음을 확인하였다(Figure 2).



**Figure 1.** The effect of *R. acetosa* L. on ABTS radical scavenging test. Control; untreated group. Positive control; Ascorbic acid (Aa) 200  $\mu$ M. 100, 200, 400 and 800  $\mu$ g/mL; treated with various concentrations of *R. acetosa* L. The IC<sub>50</sub> value is 500  $\mu$ g/mL. Indicates a significant difference from the control ( $p < 0.05$ ).

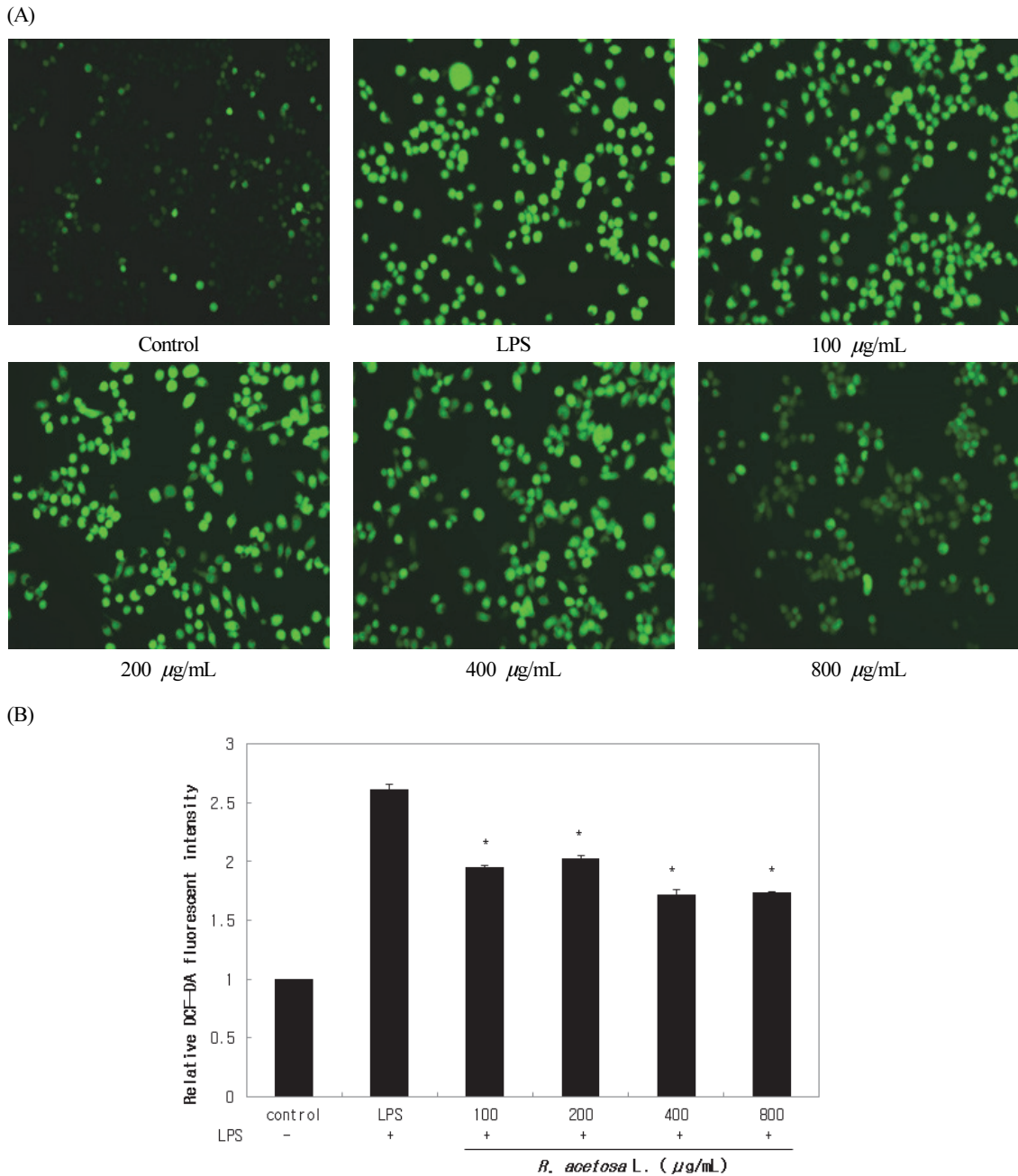


**Figure 2.** The effect of *R. acetosa* L. on cell viability in RAW 264.7 macrophage cells. Control; untreated group. 100, 200, 400, and 800  $\mu$ g/mL; treated with various concentrations of *R. acetosa* L.

3.3. DCF-DA Assay를 통한 ROS 억제능 측정 결과

LPS로 유도된 RAW 264.7에서 *R. acetosa* L.의 ROS 생성 억제 효과를 확인한 결과 control 군에 비하여 LPS 단독

처리 군에서 많은 ROS 생성을 보였으며, LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ 와 농도별(100, 200, 400 및 800  $\mu\text{g/mL}$ ) *R. acetosa* L.을 처리하였을 때, 각각 40.95, 36.21, 55.23, 54.48%의 ROS 소거능을

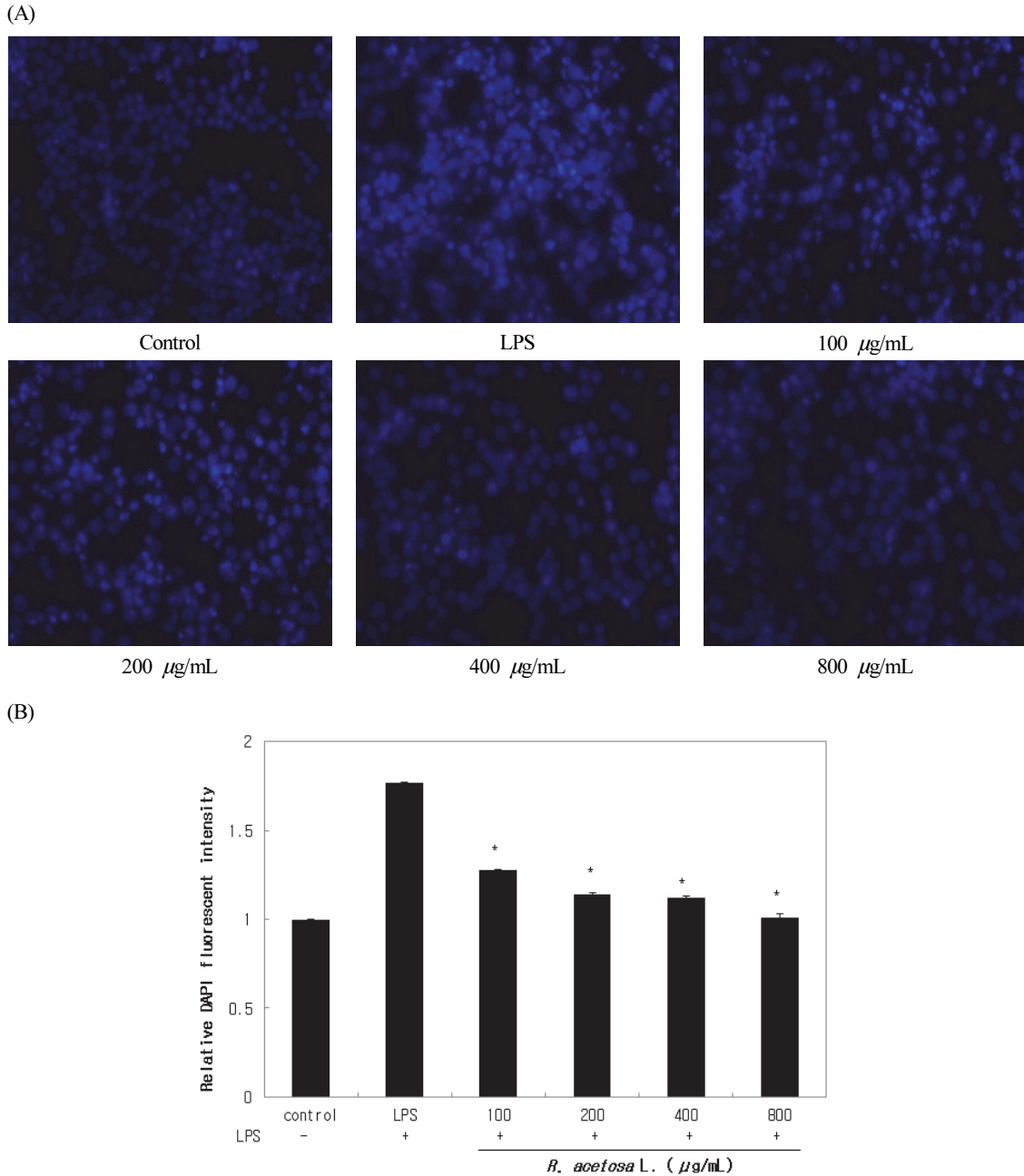


**Figure 3.** The effects of *R. acetosa* L. on DCF-DA in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. (A) Control; untreated group. LPS; treated with LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ . 100, 200, 400 and 800  $\mu\text{g/mL}$ : treated with various concentrations of *R. acetosa* L. with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ). (B) Analysis data using image J. The  $\text{IC}_{50}$  value is 345  $\mu\text{g/mL}$ . Indicates a significant difference from the LPS ( $p < 0.05$ ).

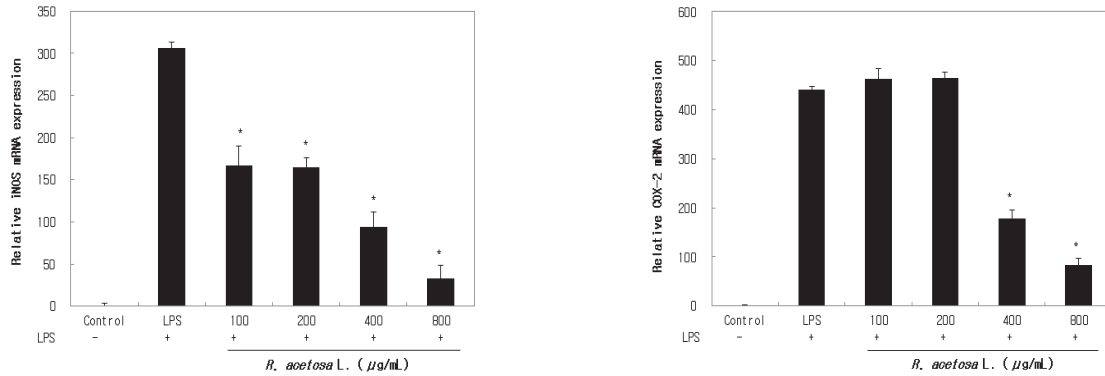
나타내었다. IC<sub>50</sub> 값은 345  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. Fluorescent intensity는 image J (Wayne rasband national institutes of health, USA)를 이용하여 분석하였다(Figure 3).

#### 3.4. DAPI Staining을 통한 핵 손상 억제능 측정 결과

LPS로 유도된 RAW 264.7에서 *R. acetosa* L.의 세포 핵 손상 억제 효과를 확인한 결과 control 군에 비하여 LPS 단독 처



**Figure 4.** The effects of *R. acetosa* L. on DAPI in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. (A) Control; untreated group. LPS; treated with LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ . 100, 200, 400 and 800  $\mu\text{g/mL}$ : treated with various concentrations of *R. acetosa* L. with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ). (B) Analysis data using image J. The IC<sub>50</sub> value is 78  $\mu\text{g/mL}$ . Indicates a significant difference from the LPS ( $p < 0.05$ ).

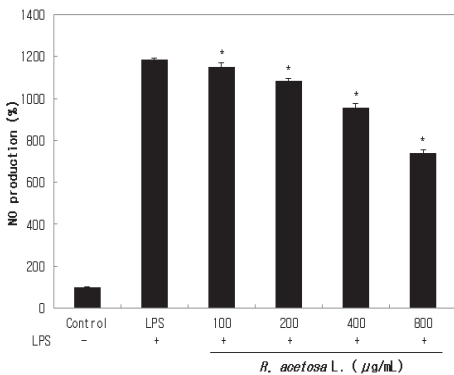


**Figure 5.** The effects of *R. acetosa* L. on LPS-induced iNOS, COX-2 mRNA expressions in RAW 264.7 macrophage cells. Control; untreated group. LPS; treated with LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ . 100, 200, 400 and 800  $\mu\text{g/mL}$ ; treated with various concentrations of *R. acetosa* L. with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ). The  $\text{IC}_{50}$  value of iNOS was 230  $\mu\text{g/mL}$ , and the  $\text{IC}_{50}$  value of COX-2 was 369  $\mu\text{g/mL}$ . Indicates a significant difference from the LPS ( $p < 0.05$ ).

리 군에서 많은 핵 발광을 보였으며, LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ 와 농도별 (100, 200, 400 및 800  $\mu\text{g/mL}$ ) *R. acetosa* L.을 처리하였을 때, 각각 64.16, 81.9, 84.01, 98.97% 핵 손상 억제 효과가 증가하는 것을 확인하였다.  $\text{IC}_{50}$  값은 78  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. Fluorescent intensity는 image J를 이용하여 분석하였다(Figure 4).

3.5. qPCR을 통한 염증 매개 물질들의 mRNA 발현량 측정 결과

LPS로 유도된 RAW 264.7에서 *R. acetosa* L.의 염증 매개 물질인 iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 확인하였다. LPS



**Figure 6.** The effects of *R. acetosa* L. on NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. Control; untreated group. LPS; treated with LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ . 100, 200, 400 and 800  $\mu\text{g/mL}$ ; treated with various concentrations of *R. acetosa* L. with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ). The  $\text{IC}_{50}$  value is 1 mg/mL. Indicates a significant difference from the LPS ( $p < 0.05$ ).

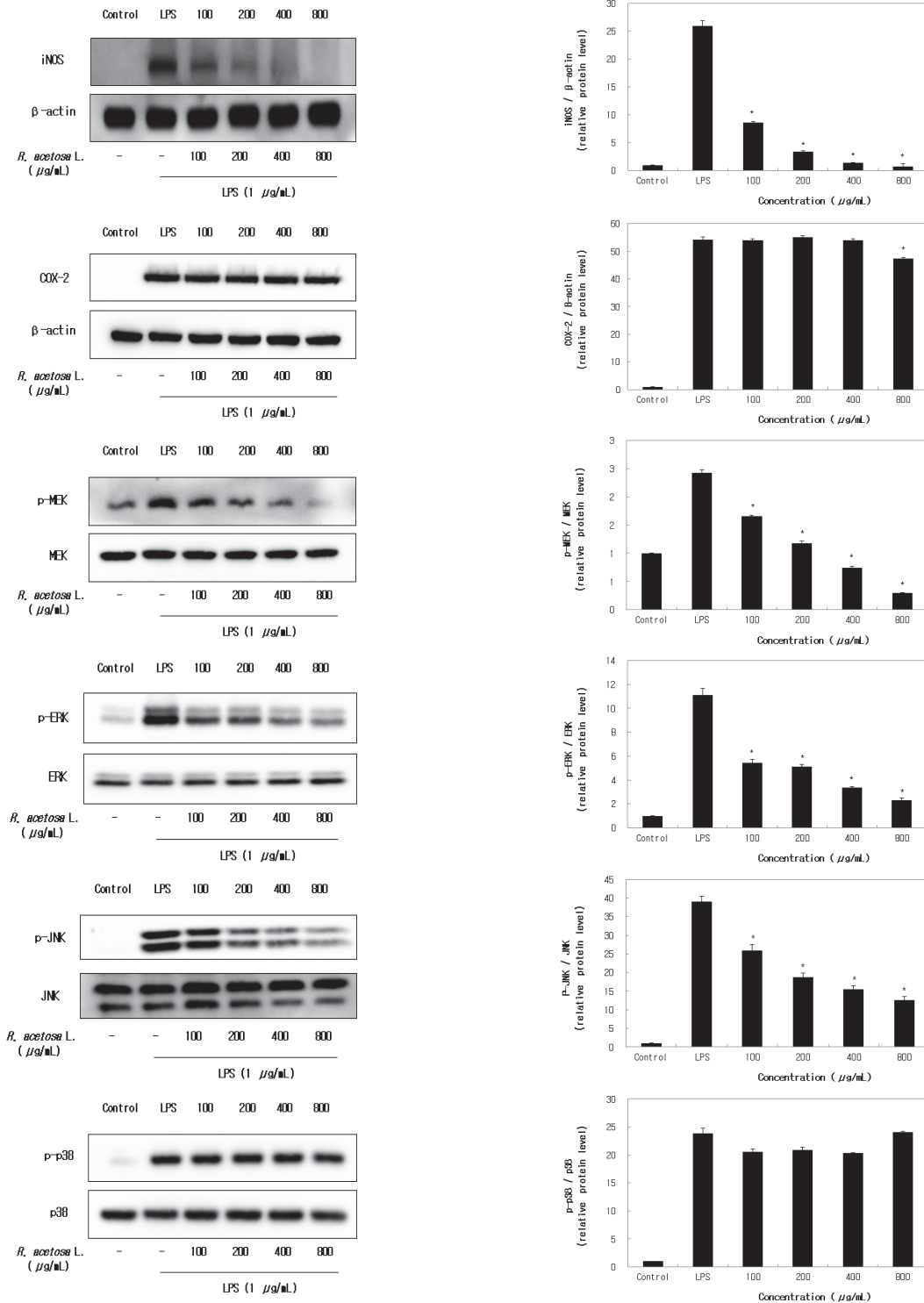
단독 처리 군은 control 군과 비교하여 염증 인자들의 높은 mRNA 발현량을 보였으며, LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ 와 *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 및 800  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리하였을 때 LPS 단독 처리 군과 비교하여 유의한 발현 감소를 보였다. iNOS의  $\text{IC}_{50}$  값은 230  $\mu\text{g/mL}$ , COX-2의  $\text{IC}_{50}$  값은 369  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Figure 5).

3.6. NO Assay를 통한 NO 억제능 측정 결과

LPS로 유도된 RAW 264.7에서 NO 생성에 대한 *R. acetosa* L.의 저해효과를 측정하였다. Control 군의 NO 생성량은  $100 \pm 2.17\%$ , LPS 단독 처리 군은  $1186.93 \pm 7.22\%$ 로 나타났으며 LPS와 *R. acetosa* L.을 100, 200, 400 및 800  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 군에서는 각각  $1149.11 \pm 22.4$ ,  $1083.24 \pm 11.35$ ,  $957.21 \pm 17.75$ ,  $739.41 \pm 15.26\%$ 로 나타나 LPS 단독 처리 군에 비하여 NO 생성량이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.  $\text{IC}_{50}$  값은 1 mg/mL로 나타났다(Figure 6).

3.7. Western Blotting을 통한 염증 매개 물질 및 MAPKs의 단백질 발현 양상 측정 결과

LPS로 유도된 RAW 264.7에서 *R. acetosa* L.의 농도에 따른 iNOS, COX-2, MEK, ERK, JNK, p38의 단백질 발현 수준을 확인하였다. iNOS, ERK, JNK, MEK에서 LPS 단독 처리 군은 control 군에 비교하여 높은 발현량을 보였으며, *R. acetosa* L.을 농도별(100, 200, 400 and 800  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 군에서는 농도가 증가함에 따라 유의한 감소를 보였다. 또한 COX-2는 800  $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의한 감소가 나타났



**Figure 7.** The effects of *R. acetosa* L. on iNOS, COX-2, MEK, ERK, JNK, p38 protein expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells by western blotting. Control; untreated group. LPS; treated with LPS 1 μg/mL. 100, 200, 400 and 800 μg/mL; treated with various concentrations of *R. acetosa* L. with LPS (1 μg/mL). The IC<sub>50</sub> values of iNOS, COX-2, MEK, ERK, and JNK were 71 μg/mL, 2 mg/mL, 91 μg/mL, 88 μg/mL, 183 μg/mL, respectively. Indicates a significant difference from the LPS ( $p < 0.05$ ).



으나, p38은 변화를 보이지 않았다. iNOS, COX-2, MEK, ERK, JNK의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 71  $\mu$ g/mL, 2 mg/mL, 91  $\mu$ g/mL, 88  $\mu$ g/mL, 183  $\mu$ g/mL로 나타났다. 단백질의 발현은 image J를 이용하여 분석하였다(Figure 7).

#### 4. 고찰

본 연구는 다양한 약용식물자원 추출물의 항염증 활성 연구로부터 영감을 얻었다[15]. *R. acetosa* L.은 온대 기후 지역에 전 세계적으로 분포하는 다년생 마디풀과 식물이다. *R. acetosa* L.의 지상부는 식품 공학 및 식물 치료 용도로 사용되어 왔으며, 풍부한 flavonoids (rutin, hyperoside, quercitrin, quercetin-3-O-glucuronide, avicularin, vitexin, orientin, isoorientin)를 함유하고 있다[16]. Flavonoids는 *in vivo*, *in vitro*에서 항염증, 항산화, 면역조절 활성을 가지고 있으며 COX-2와 lipoygenases를 억제한다고 알려져 있다[17]. 이러한 사실에 입각하여 *R. acetosa* L.의 지상부는 항염증, 항산화 효과 등을 가질 것으로 판단하였다. 5  $\mu$ g/mL의 낮은 농도로 진행되었던 기전 연구[15]를 참조하여 본 연구에서는 최대 800  $\mu$ g/mL의 농도로 실험을 진행하였고, 밝혀지지 않은 항염증 효과와 기전, 항산화 효과, 세포 핵 손상 억제 효과를 확인하였다.

호기성 호흡을 하는 생물체는 산소를 사용하여 물질대사를 하는 과정에서 ROS를 생성한다. ROS는 정상상태에서 항상성 유지에 도움을 주지만 과도하게 존재하게 되면 DNA 손상, 단백질 기능 저하, 세포막 과산화로 인한 세포 독성 등을 유발하며, 산화 스트레스를 유도하여 조직의 손상과 각종 질병을 일으킨다[18,19]. 또한 ROS는 각질형성 세포에서 염증성 사이토카인과 iNOS, COX-2와 같은 염증 매개 물질의 발현을 증가시켜 염증 반응을 유도하며, 이는 진피 섬유아세포에서 matrix metalloproteinases (MMPs)를 생성하여 피부 노화를 촉진한다[20,21].

따라서 *R. acetosa* L.의 ROS 생성 억제 효과를 확인하기 위하여 DCF-DA assay를 진행하였다. LPS로 유도된 RAW 264.7에서 *R. acetosa* L.의 농도(100, 200, 400 및 800  $\mu$ g/mL)가 증가함에 따라 ROS 생성이 감소하여 *R. acetosa* L.이 항산화 효과를 가졌음을 확인하였다(Figure 3). 또한, *R. acetosa* L.의 radical 소거능을 측정하기 위해 농도별(100, 200, 400 및 800  $\mu$ g/mL)로 ABTS assay를 진행하였다. 그 결과, 각각 13.6, 25, 44.2, 65.8%로 농도가 증가함에 따라 radical 소거능이 증가함을 보였다(Figure 1).

ROS로 인한 *R. acetosa* L.의 DNA 손상 및 세포 핵 손상 억제 효과는 DAPI assay로 확인하였으며, 농도(100, 200, 400 및 800  $\mu$ g/mL)가 증가함에 따라 핵 손상 억제 효과도 증가함을 확인하였다(Figure 4). 본 연구에서 DAPI 결과로 *R. acetosa* L.의 핵 손상 방지 효과를 간접적으로 확인하였지만, 추후 핵 손상에 대한 보다 직접적인 시험이 필요하다.

NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 citrulline으로 산화 시 생성되는 반응성이 높은 radical이다. 과도하게 생성된 NO는 세포 조직의 손상을 일으켜 염증 유발 인자로 여겨진다[4]. NOS의 종류로는 endothelial NOS (eNOS), neural NOS (nNOS), and inducible NOS (iNOS)가 있다. eNOS와 nNOS에 의해 생성되는 소량의 NO는 신체 항상성 유지에 중요한 역할을 하지만, 활성화된 대식세포에서 iNOS에 의해 생성되는 다량의 NO는 관절염, 만성 염증, 조직 손상 등 다양한 질병을 일으킨다. 따라서 iNOS 발현의 조절은 염증 관련 질환에서 중요하다[22]. COX는 arachidonic acid를 thromboxane, prostaglandin으로 변환시키는 효소이며, 종류로는 COX-1, COX-2가 존재한다. COX-1은 거의 모든 조직에서 항상 발현되어 정상적인 혈소판 기능 매개, 신장 혈류 조절과 같은 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. COX-2는 정상상태에서 매우 제한적으로 발현되며 LPS, cytokine과 같은 다양한 자극에 의하여 대식세포에서 다량 발현된다. COX-2에 의해 발생한 prostaglandin은 종양을 생성하고, 종양의 세포사멸을 억제한다[23,24].

*R. acetosa* L.의 NO 생성 억제능을 농도별(100, 200, 400 및 800  $\mu$ g/mL)로 확인한 결과 각각 1149.11  $\pm$  22.4, 1083.24  $\pm$  11.35, 957.21  $\pm$  17.75, 739.41  $\pm$  15.26%로 NO 생성량이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 6). 또한, iNOS와 COX-2의 mRNA 발현량을 qPCR로 확인한 결과 iNOS는 모든 농도에서 유의한 mRNA 발현 감소를 보인 반면, COX-2는 400 및 800  $\mu$ g/mL 농도에서 유의한 mRNA 발현 감소를 보였다(Figure 5). iNOS와 COX-2의 단백질 발현량은 western blotting으로 확인하였다. iNOS는 control 군에 비하여 LPS 단독 처리 군에서 높은 발현을 보였고, *R. acetosa* L.의 농도(100, 200, 400 및 800  $\mu$ g/mL)가 증가함에 따라 유의한 발현 감소를 보였다. 반면 COX-2는 LPS 단독 처리 군과 비교하여 800  $\mu$ g/mL에서 유의한 발현 감소가 나타났다(Figure 7).

MAPKs는 면역반응에서 중요한 신호 전달 경로이며, iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine을 포함한 염증 매개 유전자 발현에 관여한다. MAPKs 중 ERK와 p38의 활성화는

iNOS, COX-2 및 pro-inflammatory cytokine의 생성과 방출에 관여하며, ERK, p38, JNK의 활성화는 iNOS 발현에 관여한다[3,25,26].

MEK 및 MAPKs의 단백질 발현을 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다. MEK과 ERK 및 JNK는 LPS 단독 처리 군과 비교하여 농도 의존적으로 유의한 발현 감소를 보였지만 p38은 발현 변화를 보이지 않았다(Figure 7).

위의 결과로 *R. acetosa* L. 지상부는 RAW 264.7에서 MEK/ERK, JNK 경로를 통해 iNOS 및 COX-2 생성을 저해하여 항염증 효과를 나타내고, ROS 생성 억제능과 radical 소거능으로 항산화 효과를 가지고 있으며, 더불어 세포 핵 보호 효과도 보유하고 있음을 나타냈다. 따라서 피부 노화를 저해하기 위한 효과적인 항염증, 항산화 화장품의 원료로 사용될 수 있음을 시사한다.

### Acknowledgement

이 논문은 2022학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

### References

1. M. Gasparini, S. Afrin, T. Forbes-Hernández, D. Cianciosi, P. Reboredo-rodriguez, A. Amici, M. Battino, and F. Giampieri, Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation, *Food Chem. Toxicol.* **120**, 578 (2018).
2. D. W. Kim, H. J. Yun, J. Y. Heo, T. H. Kim, H. J. Cho, and S. D. Park, Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of Do-Ki-Tang methanol extract in mouse macrophage cells, *Kor. J. Herbology*, **25**(4), 103 (2010).
3. C. Peyssonnaud and A. Eychène, The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation, *Biol. Cell*, **93**(1-2), 53 (2001).
4. S. J. Kim, Master's Thesis Dissertation, Semyung Univ., Jecheon, Korea (2020).
5. J. H. Ryu, J. H. An, Y. K. Woo, and H. J. Cho, The anti-inflammation effects of A.C.C. extracts on the LPS-induced RAW 264.7 cell, *JKAIS*, **18**(12), 503 (2017).
6. M. G. Park and Y. W. Kang, Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of various organ extracts from *Trichosanthes kirilowii maxim*, *Korea J. of Pharmacogn.* **47**(4), 327 (2016).
7. D. H. Yoo and J. Y. Lee, Anti-inflammatory activities verification of *Ambrosia trifida* L. extract in RAW 264.7 cells, *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **48**(1), 79 (2020).
8. H. K. Kim, The effects of anti-inflammatory activities and active fractions analysis of ethanol extract from red rose petals, *JCCT*, **6**(2), 543 (2020).
9. S. H. Seo and M. O. Choi, Protective effects of *Lonicerae japonicae flos* against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on human keratinocyte, HaCaT cells, *Kor. J. Herbology*, **28**(4), 57 (2013).
10. H. S. Kim, Y. M. Lee, M. A. Yoo, J. W. Lee, S. H. Ryu, and K. W. Kim, Ofloxacin inhibits hypoxia/hypoglycemia-induced apoptosis in bovine aortic endothelial cells, *JCP*, **6**(3), 155 (2001).
11. H. J. Son, H. K. Park, S. A. Lee, E. Y. Jung, and C. W. Jung, The characteristics of microbial community for biological activated carbon in water treatment plant, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **27**(12), 1311 (2005).
12. J. Schmuck, S. Becker, S. Brandt, G. Lohr, F. Hermann, T. J. Schmidt, T. Beikler, and A. Hensel, Extract from *Rumex acetosa* L. for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial *in vitro* adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by epicatechin-3-O-(4β, 8)-epicatechin-3'-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate), *PLoS ONE*, **10**(3), e0120130 (2015).
13. N. J. Lee, J. H. Choi, B. S. Koo, S. Y. Ryu, Y. H. Han, S. I. Lee, and D. U. Lee, Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*, *J-STAGE*, **28**(11), 2158 (2005).
14. Y. Y. Sun, X. H. Su, J. Y. Jin, Z. Q. Zhou, S. S. Sun, J. F. Wen, D. G. Kang, H. S. Lee, K. W. Cho, and S. N. Jin, *Rumex acetosa* L. induces vasorelaxation in rat aorta via activation of PI3-kinase/Akt- and Ca<sup>2+</sup>-eNOS-NO signaling in endothelial cells, *J. Physiol. Pharmacol.*, **66**(6), 907 (2015).
15. S. E. Lee, J. H. Lee, J. K. Kim, G. S. Kim, Y. O. Kim,

- J. S. Soe, J. H. Choi, E. S. Lee, H. J. Noh, and S. Y. Kim, Anti-inflammatory activity of medicinal plant extracts, *KJMCS*, **19**(4) 217 (2011).
16. J. Bicker, F. Petereit, and A. Hensel, Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L., *Fitoterapia*, **80**(8), 483 (2009).
17. H. K. Kim, B. S. Cheon, Y. H. Kim, S. Y. Kim, and H. P. Kim, Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure - activity relationships, *Biochem. Pharmacol.*, **58**(5), 759 (1999).
18. S. Baek, J. H. Choi, S. H. Ko, Y. J. Lee, D. S. Cha, E. Y. Park, and Y. G. Kang, Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Nardostachys chinensis* in IFN- $\gamma$  /LPS-stimulated peritoneal macrophage, *JPPKM*, **23**(4), 853 (2009).
19. S. H. Jeon, S. L. Oh, S. J. Kim, B. H. Jeon, J. Y. Sung, and Y. M. Kim, Anti-oxidative effect of Chungsimyeonjaum (CSYJE) via Nrf2/HO-1 pathway activity in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **46**(3), 253 (2020).
20. S. H. Hong, H. N. Lee, T. Y. Jeong, Y. H. Kim, H. S. Jeong, and J. S. Lee, Protective effect of *Jujube* water extract against UVB-induced skin photoaging in human skin fibroblasts, *JKSFSN*, **48**(10), 1172 (2019).
21. J. J. Nam and Y. J. Kim, Fractionated *Trapa japonica* extracts inhibit ROS-induced skin inflammation in HaCaT keratinocytes, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **41**(1), 45 (2015).
22. J. S. Seo, T. H. Lee, S. M. Lee, S. E. Lee, N. S. Seung, and J. Y. Kim, Inhibitory effects of methanolic extracts of medicinal plants on nitric oxide production in activated macrophage RAW 264.7 Cells, *KJMCS*, **17**(3), 173 (2009).
23. D. H. Jeong, B. K. Kang, K. B. W. R. Kim, M. J. Kim, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory activity of *Sargassum micracanthum* water extract, *J. Appl. Biol. Chem.*, **57**(3), 227 (2014).
24. Crofford. LJ, COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions, *J. Rheumatol.*, **49**, 15 (1997).
25. D. J. Choi, G. S. Kim, B. R. Choi, Y. S. Lee, K. S. Han, D. S. Lee, and D. Y. Lee, Anti-inflammatory effect of a mixture of *Astragalus membranaceus* and *Lithospermum erythrorhizon* extracts by inhibition of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in RAW264.7 cells, *J. Appl. Biol. Chem.*, **63**(4), 421 (2020).
26. H. K. Kim, Role of ERK/MAPK signalling pathway in anti-inflammatory effects of *Ecklonia cava* in activated human mast cell line-1 cells, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **7**(9), 703 (2014).