

## 위릉채 추출물 및 생물전환 분획물의 만성호흡기 질환 효과 검증

김동희\*<sup>1</sup> · 김보애\*<sup>2</sup> · 강윤환<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>한국한의학진흥원, 선임연구원

<sup>2</sup>목원대학교 화장품공학과, 교수

<sup>3</sup>한국한의학진흥원, 센터장

(2023년 10월 27일 접수: 2023년 12월 29일 수정: 2023년 12월 29일 채택)

### Verification of the effect of *Potentillae Chinensis Chinensis Herba* extract and bioconversion fraction on chronic respiratory diseases

Dong-Hee Kim\*<sup>1</sup> · Bo Ae Kim\*<sup>2</sup> · Yun-Hwan Kang<sup>3,†</sup>

<sup>1,3</sup>Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongbuk 38540, Korea

<sup>2</sup>Department of Cosmetic Engineering, College of Technology Sciences, Mokwon University, Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 35349, Korea

(Received October 27, 2023; Revised December 29, 2023; Accepted December 29, 2023)

**요약** : *Potentillae Chinensis Herba* 추출물의 항산화 효능 평가를 위해 DPPH 자유라디칼 소거 활성과 ABTS 양이온 라디칼 활성 평가를 시행하였다. 세포 실험에서 항염증 평가를 위해 호흡기 점막 상피세포 NCI-H292와 RAW264.7 세포 대상으로 항염증 효능을 평가하였다. 그 결과, DPPH 자유라디칼 소거 활성과 ABTS 양이온 라디칼 활성 모두 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 세포 MTT 분석 결과, 각 농도 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 경우 NCI-H292 세포의 생존율이 70% 미만으로 감소하였고, 이후 실험은 50  $\mu\text{g/ml}$ 로 진행하였다. 항염증 효능 평가에서는 NO생성, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>가 감소하였고, COX-2도 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 감소하였다. *Potentillae Chinensis Herba* 추출물과 생물전환 추출물의 뮤신 단백질 발현은 MUC5AC 발현이 유의하게 감소하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과는 *Potentillae Chinensis Herba*의 호흡기 점액 단백질 발현을 도와 염증을 억제하는 기능성 소재로 활용하는데 가치가 있음을 알 수 있다.

**주제어** : 위릉채, 호흡기 점막 상피 세포주, 항산화, 점액유전자, 항염

**Abstract** : Evaluating the antioxidant efficacy using *Potentillae Chinensis Herba* extract, the anti-inflammatory efficacy was tested in respiratory mucosal epithelium, RAW264.7 cells, and zebrafish. As a result, antioxidant activity increased in a concentration-dependent manner in DPPH free radical scavenging and ABTS+ cation radical activities. As a result of MTT assay for cell experiments, the survival rate of NCI-H292 cells was reduced to less than 70% when treated at

<sup>†</sup>Corresponding author

(E-mail: k\_yunhwan@nikom.or.kr)

each concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$ , subsequent experiments were conducted at 50  $\mu\text{g/ml}$ . Anti-inflammatory efficacy evaluation, NO production, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and PGE2 decreased, and COX-2 also decreased significantly at 50  $\mu\text{g/ml}$ . The mucin protein expression of *Potentillae Chinensis Herba* extract and bioconverted extract, it was observed that MUC5AC expression was significantly reduced. In the zebrafish toxicity evaluation, concentrations below 50  $\mu\text{g/ml}$  did not show embryotoxicity and showed anti-inflammatory efficacy by reducing NO production due to LPS. The above results are valid to be valuable for use as a functional material that suppresses inflammation by helping the expression of *Potentillae Chinensis Herba*'s respiratory mucus proteins.

*Keywords* : *Potentillae Chinensis Herba*, human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line, Antioxidant, Musin gene, Anti-inflammation

## 1. 서론

호흡기 상피세포는 점액 분비를 통해 기도 내에서 적절한 습도를 유지하며, 외부 물질들과 감염의 원인으로 부터 기도를 보호한다. 점액(mucus)은 호흡기 상피의 표면을 덮고 있는 물질로 물리적인 보호기능과 운환작용을 하며 부착된 외부 물질을 섬모 운동을 통해 배출시키고 적절한 습도를 유지시켜준다<sup>2,9)</sup>. 하지만 점액의 과분비는 오히려 병의 경과를 악화시킬 수 있어, 폐기능을 약화시키고 염증성 호흡기 질환을 유발하는 원인이 되므로 만성 폐쇄성 폐질환, 천식 등과 같은 기도 염증 질환에서 점액의 성상이 변화하고 과분비가 일어난다<sup>2)</sup>. 이런 점액의 과분비로 인해 염증성 호흡기 질환을 악화시킬 수 있어, 점액 과분비의 조절이 중요하다. 이러한 점액의 물리적, 생화학적 특징을 결정하는 주요 성분은 고분자 당단백으로 구성되어진 점소이다<sup>20)</sup>. 점소는 당단백으로 점액유전자(mucin gene)에 의해 생성을 조절하게 되고, 점액의 유동학적, 물리화학 또는 생화학적 특징이 결정될 때 큰 역할을 담당한다. 점액유전자는 현재까지 20여개가 발견되었으며, 이러한 유전자에 의해 발현되는 점액의 단백질 구조는 분비형 점소와 세포의 수용체 역할을 하는 막 부착형 점소로 크게 2가지 형태로 나눈다. 분비형 점소는 MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC8가 알려져 있으며, 막 부착형 점소는 MUC1, MUC4, MUC11, MUC13, MUC15, MUC16 MUC20로 이루어져 있다<sup>2,3)</sup>. 이 중에서 분비형 점소인 MUC5AC, MUC5B가 생물학적으로 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있으며 최근 이와 관련된 연구가 증가하고 있다.

점막 상피세포에서는 점액 유전자 발현들과 점액 분비에 관련하는 여러 물질이 존재한다. lipopolysaccharide(LPS), Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), phorbol myristate acetate(PMA)와 같은 cytokine이나 염증 유발 물질이 호흡기에서 점액 분비를 증가시킨다<sup>12,15)</sup>. 이 중 LPS는 그람음성세균 세포외막에 존재하는 물질로 대식세포를 자극해 사이토카인, 염증성 매개물질, 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 등을 유도한다. 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 등의 만성 호흡기 질환에서 사이토카인, 염증성 매개물질, 활성산소 등에 의해 MUC5AC와 MUC5B 점액질 유전자 발현이 증가하고, 점액질의 성상이 변화하거나 점액 과분비가 나타나면 질환을 더욱 악화시킬 수 있다<sup>1,8,10)</sup>.

위릉채(萎陵菜)는 장미과(Rosaceae)의 다년생 식물 딱지꽃(*Potentilla chinensis* Ser.)의 전초를 말하며 학명은 *Potentillae Chinensis Herba*이다. 위릉채는 각종 염증을 줄이기 위해 사용되어졌으며, 각혈, 설사, 감기, 위장과 관련된 질병, 통풍, 기관지 천식 등의 치료에 사용되어져 왔다<sup>22)</sup>. 위릉채의 성분으로는 quercetin, kaempferol, apigenin, flavonoid glycoside의 flavonoid 성분과  $\beta$ -sitosterol, daucosterol의 steroid, oleanolic acid,  $\alpha$ -amyrin 등의 triterpenoid가 함유되어 있으며, 항산화, 항염증, 항당뇨, 항고지혈, 항산화 등이 보고되었다. 이렇게 현재까지 진행된 연구에 따르면 위릉채의 만성호흡기 질환에 관한 연구는 아직까지 이루어지지 않았다<sup>9,17,18,21)</sup>.

따라서 본 연구에서는 위릉채 추출물 및 생물 전환 분획물이 NCI-H292세포에서 LPS에 의해 증가된 점액단백질 발현에 대한 효능을 검증함으

로써, 효과적인 만성 폐질환 예방 및 개선을 소재 발굴의 가능성을 제시하였다.

## 2. 연구 방법

### 2.1. 재료

LPS는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, RPMI 1640 medium, DMEM medium을 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA), fetal bovine serum(FBS)을 Hyclone Laboratories(Logan, UT, USA)에서 구입했다. Elisa kit는 MUC5AC, MUC5B(LSbio, Shirley, MA)에서 구입하였으며, PGE2(R&D system, Inc., Minneapolis, MN, USA), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 일체항체인 iNOS (BD bioscience), COX-2(cayman), MUC5AC, MUC5B(LSbio, Shirley, MA)에서 구입하였으며, 이차항체인 anti-rabbit horseradish peroxidase(HRP)-conjugated는 Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA, USA)에서 구입했다.

### 2.2. 추출물의 제조

본 실험에서 사용한 위릉채는 (제천약초생활건강)에서 직접 구입하여 세척 후 사용하였다. 추출물의 제조 시료 추출물은 500 g에 70% 에탄올 2000 ml를 추출용매로 가하여 상온 24시간 동안 교반 추출하였다. 각 추출물은 Whatman No. 1 filter (Whatman Inc., Piscataway, USA)로 여과 후 동결건조기 (FD8518, Ilshinbiobase Co., Dongducheon, Korea)를 사용하여 85°C에서 동결 건조를 실시하였다. 이후 실험은 동결건조물을 증류수에 녹여 사용하였다. 생물전환 추출물은 위릉채 추출물에 아스퍼질러스 가와치 (*Aspergillus Kawachii*)를 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 발효물을 100 ml의 100 mM의 PBS (pH 7.0)에 현탁시켜 4°C에서 18시간 방치한 후 거즈로 여과하였으며, 여과액을 10,000 rpm 15분 동안 저온 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액의 효소는 beta-glucosidase 활성을 나타내는 것을 확인하여 발효시킨 발효물을 수득하였다.

### 2.3. 추출물 및 생물전환 분획물의 항산화 효과 항산화를 측정하기 위해 1,1-diphenyl-2-

picryl hydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis (3-ethyl benzo thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)를 측정하였다. DPPH radical에 대한 소거활성은 Blios (1958) 방법으로 측정하였으며, 저해율(%)은  $(1 - \text{반응구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 계산 했다. ABTS radical cation decolorization 측정은 Fellegrin (1999) 방법으로 측정하였고, 저해율(%)은  $(1 - \text{반응구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 계산했다.

### 2.4. 세포 배양 및 처치

사람 유래 호흡기 점액상피양 암세포주 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line) NCI-H292 세포를 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 100 Unit/mL penicillin, 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin, 10% fetal bovine serum (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 포함 RPMI 1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 배양하며 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 배양하였다. 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well의 세포를 seeding하여 배양하였다. NCI-H292 세포에 위릉채 추출물 및 생물전환 분획물에 의한 MUC5AC, MUC5B 점액 유전자들의 발현과 단백질 생성을 확인하기 위해 NCI-H292 세포에 다양한 농도의 위릉채 추출물 및 생물전환 추출물을 전처리한 후 1시간 뒤에 1  $\mu\text{g/mL}$  농도의 LPS를 처리하였다. Raw264.7 세포에서 Cytokines, iNOS, COX-2 점액 유전자 발현 및 단백질 생성을 평가하기 위해 Raw264.7 세포에 LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ 을 전처리한 후 1시간 뒤 위릉채 추출물 및 생물전환 추출물을 농도별로 처리하였다.

### 2.5. 위릉채 추출물 및 생물전환물의 세포독성 평가

NCI-H292 세포와 Raw264.7 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well를 96 well culture plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 10% FBS, 1% streptomycin이 포함된 RPMI와 DMEM에 24시간 동안 배양하였다. 세포가 80~90% 차면 배지를 제거한 다음 FBS가 포함되지 않은 RPMI와 DMEM 배지에 위릉채 추출물과 생물전환 추출물을 농도별로 각 well에 24시간 동안 처리하였다. 그 후 MTT (5 mg/ml) 시약을 이용하여 세포독성평가를 시행하였으며, MTT (5 mg/ml) 시약 20  $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 3시간 동안 37°C에서 배양

하여 반응시키고 540 nm 흡광도로 측정하였다.

## 2.6. 정량적 real-time PCR 분석

NCI-H292 세포에 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도의 위룽채 추출물 및 생물전환 추출물을 전 처리한 후 1시간 뒤에 100 ng/mL 농도의 LPS를 처리 하였으며, Raw264.7 세포는 1  $\mu\text{g/mL}$  농도의 LPS를 전 처리한 후 1시간 뒤에 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도의 위룽채 추출물 및 생물전환 추출물을 처리하였다. 8시간 후에 배양된 세포를 차가운 PBS로 세척 후 Quiazol lysis reagent (Qiagen, Grqwley, U.K.)을 이용하여 총 mRNA를 추출하였다. 세포로부터 추출한 RNA를 이용하여 Goscrip<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase system (Promega, madison, WI)를 이용하여 메뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 Goscrip<sup>®</sup> qPCR Master Mix(Promega, madison, WI)와 primer를 이용하여 real-time PCR을 진행하였다. PCR에서 사용된 oligonucleotide primer는 아래와 같이 밝혀진 염기서열에 의해 제작했으며, 각 반응의 양성 대조군은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용했다. 실험에 사용된 primer는 Table 1에 나타냈으며 Bioneer사(Korea)에서 구매하였다. MUC5AC, MUC5B mRNA에 대한 PCR 반응 조건은 denaturation (95°C, 30초), annealing (60°C, 60초), extension (72°C, 60초)으로 진행하였다.

## 2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay 분석

MUC5AC, MUC5B(LSbio, Shirley, MA), PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 를 측정하기 위해서 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하였다. NCI-H292와 세포에 25, 50  $\mu$

g/ml 농도의 위룽채 추출물 및 생물전환 추출물을 전 처리한 후 1시간 뒤에 100 ng/ml LPS 처리 후 사용하였고, Raw264.7 세포에 1  $\mu\text{g/ml}$  농도의 LPS를 전 처리한 후 1시간 뒤에 위룽채 추출물 및 생물전환 추출물을 농도별(25, 50  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였다. 24시간 후에 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 이용하여 제조사 메뉴얼에 따라 ELISA assay를 수행했다.

## 2.8. Western blot analysis 분석

Raw264.7 cell을 6-well plate에  $5 \times 10^5$  cells/well로 접종한 후 24시간 배양시킨 뒤 위룽채 추출물 및 생물전환 추출물을 농도별로 처리하였다. 1시간 후 LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 상등액을 제거하고 cold PBS로 세척 한 뒤 세포를 수확한 후 RIPA buffer (Thermo, USA)용액을 첨가하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 BCA protein kit를 통하여 단백질 정량하였다. 단백질을 확인하기 위해 10% Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Precast Protein Gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 20  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 분리하였고, 이를 Immobilon<sup>®</sup>-P PVDF Membrane (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 transfer하였다. 1차 항체는 iNOS, COX-2,  $\beta$ -actin으로 사용하였으며, 2차 항체 HRP-conjugated mouse antibody, HRP-conjugated rabbit antibody를 사용했다. 항체반응을 완료한 후 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)을 사용하여 반응시킨 후 LAS-4000 (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

## 2.9. 통계

모든 실험은 3회 이상 반복 실험 하였으며 실

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Target gene		Primer sequence
MUC5AC	forward	5'-TCA ACG GAG ACT GCG AGT ACA C-3'
	reverse	5'-CTT GAT GGC CTT GGA GCA-3'
MUC5B	forward	5'-CAC ATC CAC CCT TCC AAC-3'
	reverse	5'-GGC TCA TTG TCG TCT CTG-3'
GAPDH	forward	5'-CCT CCA AGG AGT AAG ACC CC-3'
	reverse	5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'

험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험 결과의 유의성은 SPSS version 22.0(IBM NY, USA)를 사용했으며, 대조군과 비교하여 p값이 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 정하여 Student's t-test를 활용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 위릉채 추출물 및 생물전환 추출물의 항산화 활성 확인

항산화 활성을 쉽게 측정하는 방법 중 하나인 DPPH radical을 소거시켜 탈색되는 정도를 측정하는 방식이며 이러한 전자공여 작용은 지방질 산화, 활성 라디칼에 의한 인체 내 노화 억제하는 작용의 척도로도 이용되고 있다<sup>5)</sup>. 각 위릉채 추출물(PCE) 및 생물전환 추출물(PCB)과 합성 항산화제인 ascorbic acid(Vit.C)의 DPPH의 소거 활성을 측정하여 비교하였다(Fig. 1). PCE 및 PCB는 가장 높은 농도인 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 60.5%, 68.5%의 높은 소거활성을 나타내었다. 또 다른 항산화 측정으로 널리 이용되고 있는 ABTS 양이온 라디칼 소거활성법은 생성된 ABTS<sup>+</sup>가 항산화력에 의해 ABTS<sup>+</sup> 소거되어 radical 특유색인 청록색이 탈색이 된다. ABTS<sup>+</sup>

탈색반응을 통해 free radical의 제거 수준을 흡광도 값으로 나타내고 ABTS<sup>+</sup> 소거활성은 소수성과 친수성 모두에 적용가능한 방법이다<sup>13)</sup>. 본 실험에서는 PCE 및 PCB와 ascorbic acid(Vit.C)의 ABTS<sup>+</sup> 소거활성을 비교 측정하여 나타내었다(Fig. 1). PCE 와 PCB는 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 73.2%, 80.2% 이상의 높은 소거 활성을 나타내었다. 이는 DPPH· 소거활성과 유사한 경향을 나타내는 것이다. 국내 시판되는 다류의 항산화를 검색한 결과 DPPH· 소거활성과 ABTS<sup>+</sup> 소거활성간의 높은 상관관계가 존재하다고 보고하였다<sup>6)</sup>. 이에 따라 PCE 와 PCB가 DPPH·와 ABTS<sup>+</sup> 소거활성이 우수하게 나타나 그 경향이 매우 유사함을 알 수 있다.

#### 3.2. 위릉채 추출물 및 생물전환 추출물의 생존율 확인

NCI-H292와 Raw264.7 세포를 이용하여 PCE 및 PCB에 대한 세포생존율을 확인하고자 MTT assay를 수행하였다. PCE 및 PCB를 다양한 농도별(25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리 결과 PCE 및 PCB에서 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 NCI-H292와 Raw264.7 세포의 생존율에 큰영향을 나타내지 않았지만, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 처리 시 NCI-H292 세포의 생존율이 70% 이하로 감소되

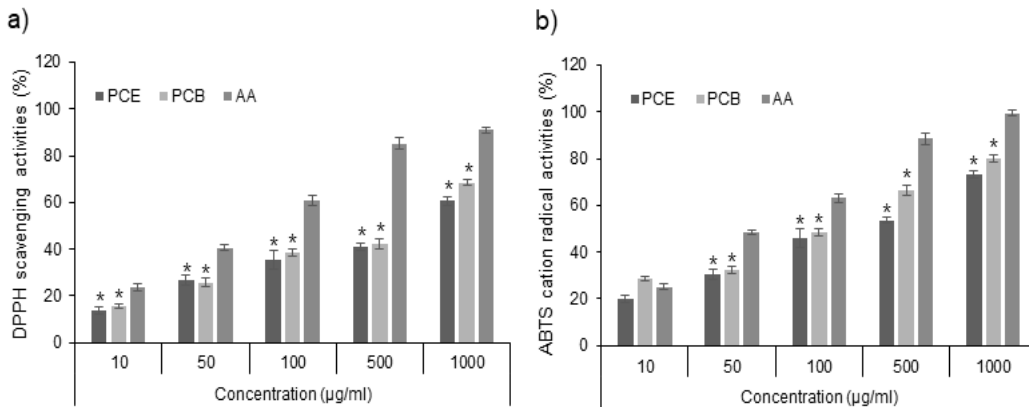


Fig. 1. Anti-oxidant effects of PCE and PCB extracts a) DPPH free radical scavenging activity b) ABTS cation radical activity. PCE, *Potentilla Chinensis* SER, 70% ethanol extracts; PCB, Bioconversion with kawachi of *Potentilla Chinensis* SER; ; Vit.C, Vitamin C. The value shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assays.

\* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) from the ascorbic acid treated group.

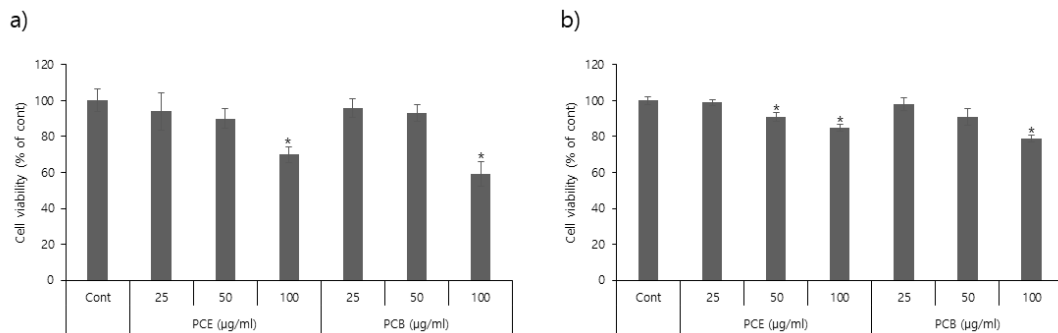


Fig. 2. Effect extracts of on cell viability of NCI-H292 and Raw264.7. PCE, *Potentilla Chinensis* SER, 70% ethanol extracts; PCB, Bioconversion with kawachi of *Potentilla Chinensis* SER. NCI-H292 and Raw264.7 cell were incubated for 24 h in RPMI and DMEM medium with 10% FBS, were treated with concentrations of extracts for 24 h and cell viability was measured from MTT reagent. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three times assays. \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) from control group.

는 것을 확인할 수 있어 PCE 및 PCB이 100  $\mu$ g/ml 농도로 처리 시 세포의 viability를 저해 하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

### 3.3. 위릉채 추출물 및 생물전환 추출물의 항염증 활성 확인

초기 염증 반응은 iNOS와 COX-2와 이들 단백질에 의한 염증 매개체들(NO, PGE<sub>2</sub>)이 유도된다<sup>14,16</sup>. 본 연구에서는 위릉채 추출물 및 생물전환 추출물의 항염증 효과를 비교하기 위하여 Raw264.7 세포에 PCE 와 PCB의 25, 50  $\mu$ g/ml을 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 24시간 동안 처리하여 NO의 생성량에 미치는 영향을 같은 방법으로 분석 결과, PCE 와 PCB의 50  $\mu$ g/ml 에서는 15%, 25% 감소시켰다(Fig. 3a). 또한, LPS에 의해 유도되는 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 생성에 미치는 영향을 분석 결과, PCE와 PCB의 50  $\mu$ g/ml에서 우수한 저해 활성을 나타내었으며 특히 PCB 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 를 각각 35%, 58%, 52% 저해하는 것을 확인하였다(Fig. 3b,c,d). 마지막으로 PCE와 PCB의 항염증 효과 작용 기전을 알아보기 위하여 염증발현효소(iNOS, COX-2)의 protein 발현을 조사하였다. iNOS에 의해 생성된 NO는 면역반응에서 유용한 역할을 한다. 하지만 지속적인 NO 생성은 만성염증을 일으키는 요인이 된다. 따라서 체내에

과도한 NO를 생성하는 iNOS와 COX-2의 발현에 대한 PCE와 PCB의 영향을 조사하기 위해 western blot을 시행하였다. LPS를 처리한 군은 LPS를 처리하지 않은 그룹보다 COX-2 protein이 증가함을 확인하였으며, PCE와 PCB를 처리한 군에서는 LPS 처리군과 비교하였을 때 iNOS, COX-2 protein의 발현량이 유의적으로 감소함으로써 iNOS, COX-2 protein 저해효과는 NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  생성 억제효과가 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 3 e,f). 그러므로 PCE와 PCB는 iNOS, COX-2 발현을 억제하여 염증 감소 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

### 3.4. 위릉채 추출물 및 생물전환 추출물의 점액단백질 발현 확인

MUC5AC, MUC5B는 호흡기 점막의 배상세포에서 분비되는 당단백질이며 점막세포 운동 기능을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 과도한 당단백질의 분비는 만성 폐쇄성 폐질환 및 염증성 호흡기 질환과 밀접한 연관이 있다<sup>6</sup>. MUC5AC, MUC5B 점액단백의 생성을 증가시키는 물질로 phorbol myristate acetate, LPS, ILs 등이 알려져 있으며, 다양한 신호전달체계에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>10,12,15</sup>. 본 연구에서는 NCI-H292 세포에 LPS를 처리함으로써 MUC5AC, MUC5B 점액유전자의 발현과 단백질 생성이 유도됨을 확인 하였으며, PCE 및 PCB의

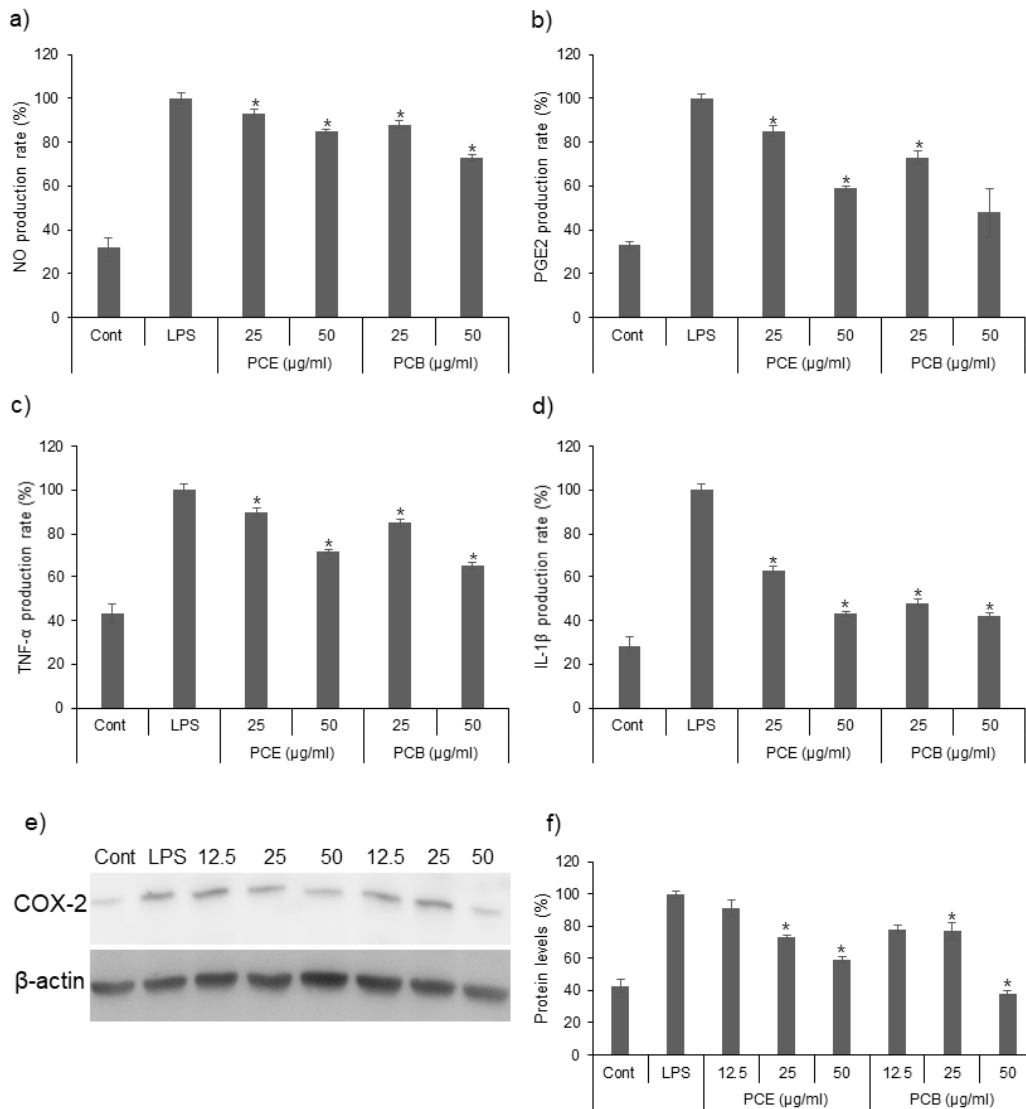


Fig. 3. Effects of PCE and PCB extract on LPS induced inflammation response in RAW 264.7 cells. a) Effect of PCE and PCB extract on NO production, Effect of PCE and PCB extract on b) TNF- $\alpha$ , c) IL-1 $\beta$ , d) PGE<sub>2</sub> secretion. e) COX-2 protein expression level, f) COX-2 protein level was validated by image J. RAW 264.7 cells were pretreated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 1 h and then treated with PCE and PCB extracts (25, 50  $\mu$ g/ml) for 18 h. The value shown represent mean  $\pm$  SEM of three times assays. \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) from the LPS treated group.

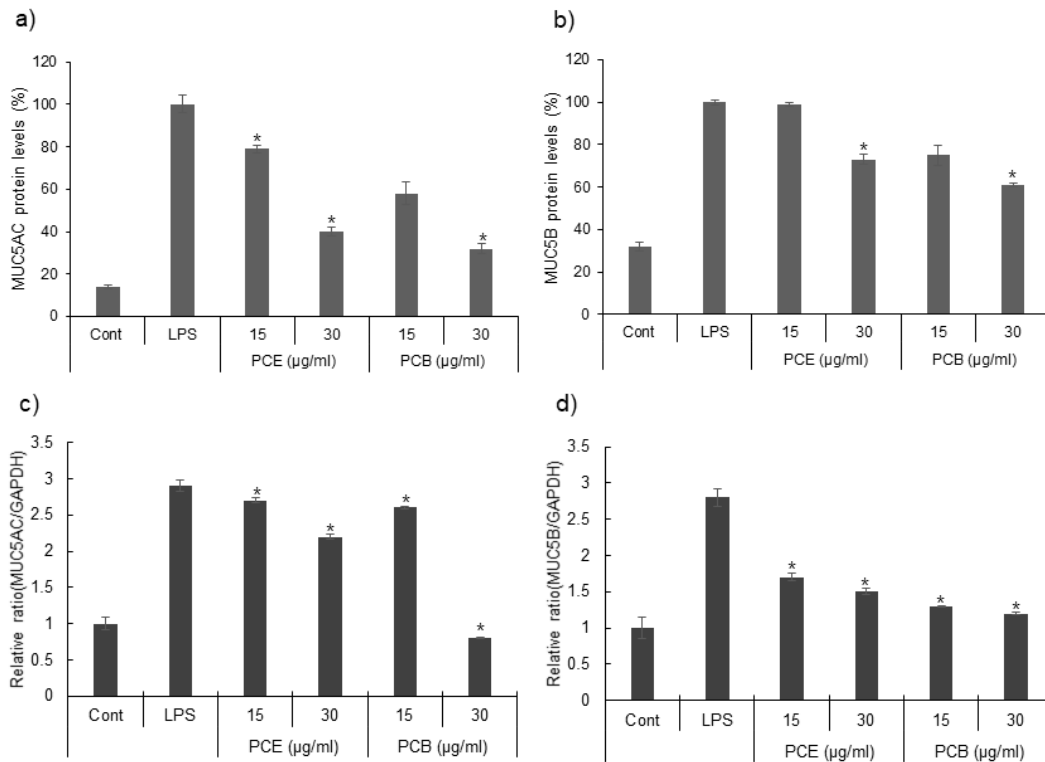


Fig. 4. The effects of PCE and PCB extracts on LPS-induced MUC5AC and MUC5B expressions in NCI-H292 cell. NCI-H292 cell was pretreated with concentrations of PCE and PCB 1 h and then stimulated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. Results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that PCE and PCB extracts significantly attenuated LPS (100 ng/ml)-induced (A) MUC5AC and (B) MUC5B protein production. Results of reverse real-time PCR(RT-PCR) showed that PCE and PCB extracts significantly attenuated LPS-induced (C) MUC5AC and (D) MUC5B mRNA expression. \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) from LPS treated group.

NCI-H292 세포에서 MUC5AC, MUC5B의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 PCE 및 PCB이 LPS로 유도된 MUC5AC, MUC5B 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 ELISA를 통하여 분석하였다. NCI-H292 세포에 LPS로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현과 및 점액단백의 생성량은 PCE, PCB를 전처리한 군에서는 통계학적으로 의미있게 감소하였다. PCE 및 PCB의 처리 농도가 높아질수록 mRNA의 발현이 감소하였으나, 점액단백의 경우에는 30  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 그룹과 15  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서의 감소하는 패턴은 확인되었지만, mRNA 발현 결과 만큼 큰 차이는 없었고(Fig. 4) PCB 처리군에서 MUC5AC

발현이 크게 감소하는 것이 관찰되었다. 따라서 NCI-H292 세포에서 PCE 및 PCB이 점액 과분비 조절에 기여함을 확인하였으며, 점액의 과분비를 억제하는 새로운 조절제로서 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 4. 결론

위릉채 추출물의 항산화 효능 평가를 위해 호흡기 점막 상피 세포, RAW264.7 세포 대상으로 항염증 효능을 평가하였다. 그 결론은 다음과 같다.



1. DPPH 자유라디칼 소거 활성과 ABTS 양이온 라디칼 활성 모두 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

2. 세포 MTT 분석 결과, 각 농도 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 경우 NCI-H292 세포의 생존율이 70% 미만으로 감소하였고, 이후 실험은 50  $\mu\text{g/ml}$ 로 진행하였다.

3. 항염증 효능 평가에서는 NO생성, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>가 감소하였고, COX-2도 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 감소하였다.

4. *Potentillae Chinensis Herba* 추출물과 생물전환 추출물의 뮤신 단백질 발현은 MUC5AC 발현이 유의하게 감소하는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과는 *Potentillae Chinensis Herba*의 호흡기 점액 단백질 발현을 도와 염증을 억제하는 기능성 소재로 활용하는데 가치가 있음을 알 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원)산림과학기술 연구개발사업'(FTIS 2021370B31-2323-BD02)'의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

### References

- Ahn JH, Kim HG, Seo BH, Choi YS, Song SY, Bae CH, et al, "Effect of multi-walled carbon nanotubes on MUC5AC and MUC5B expression in airway epithelial cells", *Korean J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, Vol.58 pp. 552-557, (2015).
- Ali MS, Pearson JP, "Upper airway mucin gene expression: a review", *Laryngoscope*, Vol.117 pp. 932-938, (2007).
- Ali Mel-S, "Nasosinus mucin expression in normal and inflammatory conditions", *Curropin Allergy Clin Immunol*, Vol.9, No.1 pp. 10-15, (2009).
- Blois, M. S., "A note on free radical formation in biologically occurring quinones", *Biochim. Biophys Acta*, Vol.18, No.1 pp. 165, (1955).
- Choi, J.H. and S.K. Oh, "Studies on the anti-aging action of Korean Ginseng", *Korean J. Food sci. Technol*, Vol.17, No.6 pp. 506-515, (1985).
- Choi, S.Y., S.H. Lim, J.S. Kim, T.Y. Ha, S.R. Kim, K.S. Kang, and I.K. Hwang. "Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants", *Kor. J. Food Sci. Technol*, Vol.37 No.4 pp. 549-556, (2005).
- Fellegrin N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C, "Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay", *Method Enzymol*, Vol.299 pp. 379-389, (1998).
- Fischer BM, Voynow JA, "Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species", *Am J Respir Cell Mol Biol*. Vol.24, No.6 pp. 447-52, (2002).
- Jang HK, Kim JK, Nam JI, So UK, Oh CH, Jeon H, "Antioxidant and anti-inflammatory effect of the methanolic extracts of *Potentilla chinensis*", *Orient pharm Exp. Med*, Vol.11 pp. 137-42, (2011).
- Kim HS, Choi YS, Lee JH, Park NK, Park CH, Lee YH, et al, "Effect of betulinic acid on MUC5AC and MUC5B expression in airway epithelial cells", *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg*, Vol.57, No.8 pp. 526-532, (2014).
- Kim KC. "Role of epithelial mucins during airway infection", *Pulm Pharmacol Ther*, Vol.25, No.6 pp. 415-419, (2012).
- Kim YD, Bai CH, Woo HJ, "Interleukin-1beta-mediated MUC5AC gene expression and mucin secretion via PKC-ERK/p38-COX-2-PGE2 in human airway epithelial cells", *Korean J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. Vol.46, No.1 pp. 27-34, (2003)

13. Lee SO, Kim MJ, Kim DG, Choi HJ, "Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.34, No.2 pp. 139-147, (2005).
14. Lee, S. J. and Lim, K. T, "Phyto-glycoprotein inhibits interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 via p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, Vol.377 pp. 45-54, (2008).
15. Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH, "Expression and regulation of MUC8 & MUC5AC by various cytokines in normal human nasal epithelial cells", *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg*. Vol.44, No.6 pp. 600-605, (2001).
16. Nathan, C. "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells", *FASEB J*. Vol.6, No.12 pp. 3051-3064, (1992).
17. Qiao C, Qin N, Zhai HY, Duan HQ, "Identification of trans-tilioside as active principle with anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects from *potentilla chinensis*", *J. Ethnopharmacology*, Vol.135 pp. 515-521, (2011).
18. Qiao W, Zhao C, Lu B, Zhang Y, Duan H, "Influences of *Potentilla chinensis* flavonoids on blood glucose and lipids in normal and alloxan-induced diabetic mice", *Zhhongcaoyao*, Vol.41 pp. 612-614, (2010).
19. Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA, "Airway mucus obstruction: Mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia", *Am J Respir Cell Mol Biol*, Vol.25, No.5 pp. 533-537, (2001).
20. Rose MC, Voynow JA. "Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease", *Physiol Rev*, Vol.86 pp. 245-278, (2006).
21. Shi L, Qin N, Hu L, Liu L, Duan H, Niu W, "Tilioside-derivatives enhance GLUT4 translocation via AMPK in muscle cells", *Diabetes Res. and Clin. Pract*, Vol.92, No.2 pp. 41-46, (2011).
22. Zhen, L., T. Zhang, L. Ye, et al, "Protective effects of the ethanolic extract from *potentilla chinensis* on mice acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride", *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, Vol.31, No.5 pp. 422-423, (2004).