

Effect of Fractions From *Stachys sieboldii* Miq. Root on Antioxidant, Anti-inflammation and Smad Signaling

Jung Woo Lee, Myungwon Choi and Sun Young Lim*

Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

Received January 7, 2024 / Revised March 28, 2024 / Accepted April 4, 2024

We investigated to analyze total flavonoid content and fatty acid composition of *Stachys sieboldii* Miq root. In order to determine antioxidant and anti-inflammatory effects of fractions from *S. sieboldii* Miq. root, we conducted 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS) assays for antioxidant and measured nitric oxide (NO) production induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW 264.7 cells. In addition, we examined an inhibitory effect of fractions from *S. sieboldii* Miq. root on smad signaling induced by transforming growth factor (TGF) β . Among the fractions, *n*-butanol (*n*-BuOH) fraction showed the highest flavonoid content (16.67 mg/g), followed by *n*-Hexane, water and 85% aqueous methanol (85% aq. MeOH) fractions. The fatty acid composition of *S. sieboldii* Miq. root was in the following order : *n*-6 fatty acids (54.3%) > *n*-3 fatty acids (21.2%) > saturated fatty acids (19.7%) > *n*-9 fatty acids (3.6%). As a result of the antioxidant efficacy, the DPPH and ABTS assays showed that *n*-BuOH fraction had higher scavenging activity compared to other fractions. Inhibitory effect on NO production showed that all fractions decreased LPS-induced NO production, indicating an anti-inflammatory activity of *S. sieboldii* Miq. root. 85% aq. MeOH and water fractions showed a higher efficacy in inhibiting transforming growth factor (TGF) β induced smad signaling. From the results, it suggests that food processing products using *S. sieboldii* Miq. root will be developed as a functional food for promoting health.

Key words : Anti-inflammation, antioxidant, *Stachys sieboldii* Miq., transforming growth factor (TGF) β

서 론

초석잠은 중국의 전통적인 건강채소로서 중국, 일본 및 러시아 등에서 주로 재배되고 있다. 초석잠은 뿌리뿐만 아니라 잎도 식용이 가능하며 초석잠 잎은 나물로 먹거나 말려서 차로 사용하기도 한다. 선행연구에서 초석잠 뿌리 추출물의 플라보노이드 함량 및 항산화 활성에 대해 보고하였고[26], Lee [25]는 초석잠 뿌리의 물 추출물 및 60% 에탄올 추출물에서 항산화, 항균 및 항염증 효과가 나타났다고 보고하였다. 또한 식용이 가능한 초석잠 잎에 대해 항산화 및 세포독성 등에 대해 보고되었고[33], 초석잠 분말을 첨가한 식품의 품질 특성 및 항산화 활성에 대해서도 보고되었다[13]. 이러한 초석잠의 항산화 및 항염증 효과 등으로 인해 다양한 기능성 식품 소재로서의 연구도

진행되고 있다. 기능성 식품 소재로 개발을 위해서 건조 방법에 따른 초석잠 분말의 품질 특성 및 항산화 활성[15] 및 신경세포 보호 효과[34]에 대해 보고되었다. 초석잠 분말을 첨가한 식품으로는 초석잠 분말을 첨가한 초콜릿의 품질 특성 및 항산화 활성과 초석잠 분말을 첨가한 죽의 항산화 활성 및 품질 특성 등이 보고되었다[10, 20, 24]. 초석잠의 항염증 효과에 대해서는 Lee 등[27]은 알레르기성 접촉성 피부염이 유도된 마우스에서 초석잠 에탄올 추출물은 혈청 pro-inflammatory 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 와 interleukin (IL)-4의 분비를 억제하였다고 보고하였다. Chen 등[7]은 만성 폐쇄성 폐질환 환자에서 초석잠 섭취는 pro-inflammatory 인자를 감소시키고 반면 anti-inflammatory 인자는 증가시키는 활성을 보여 치료제로서 임상 적용 가치에 대해 보고하였다. 그러나 초석잠의 항산화 효능과 비교했을 때 항염증 효과에 대해서는 연구가 아직은 부족한 실태이다.

염증은 천식, 당뇨병, 퇴행성질환, 섬유증 또는 암과 같은 여러 질병에 관여하고 유전적인 요인이 아닌 식이습관에 따른 환경적인 요인도 염증에 중요한 역할을 한다. 적혈가공육, 포화 또는 트랜스지방, 알코올을 기반으로 한 가공 식품의 높은 소비는 염증 유발과 관련이 있다[4, 12,

*Corresponding author

Tel : *** - **** - **** Fax : +82-51-404-4750

E-mail : sylim@kmou.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

31]. 또한 세포 내 미토콘드리아 산화대사로 reactive nitrogen species (RNS)가 생성될 수 있으며[35], 산화 대사과정에서 과도하게 생성된 reactive oxygen species (ROS)/RNS은 다양한 염증 자극제로 작용하여 pro-inflammatory 사이토카인의 합성 및 분비를 초래하는 것으로 보고되었다[22]. 산화질소(NO)는 신경활동 및 면역방어 매커니즘[3]을 조절하는 확산성 분자로, 많은 생리학적 및 병리학적인 역할을 한다. 또한 체내 불포화지방산의 산화는 세포대사 전구체 및 구조적 구성요소 역할을 하는 지질을 prostaglandins, leukotrienes, isoprostanes, hydroxyl 및 hydroperoxyeicosatetraenoate를 비롯한 강력한 신호 분자로 전환되는 것으로 알려졌으며 그 중 prostaglandins은 염증반응, 혈관기능 및 세포생존에 대한 수용체 의존적 조절을 유도하는 지질 매개체이다[39]. 불포화 지방산 중 eicosapentaenoic acid (EPA) 및 docosahexaenoic acid (DHA)는 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었으며[1], Maleki 등[29]은 식물유래의 플라보노이드의 라디칼 소거능에 의해 ROS/RNS가 억제된다고 보고하였다. 이를 근거로 산화스트레스와 염증 반응에 관련한 초석잠의 생리활성을 확인하고자 이번 연구에서는 초석잠의 지방산 함량과 총 플라보노이드 함량을 확인하였고 라디칼 소거능과 더불어 강력한 염증 활성을 조절하는 다발성 사이토카인[28]으로 알려진 Transforming growth factor (TGF) β signaling의 억제 효능을 통해 항산화 및 항염증 효과에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 초석잠은 미산약초농장(경상북도 대구광역시)로부터 구입하여 동결건조기를 이용하여 -70°C 에서 20 Pa의 압력으로 3일간 건조시켰다. 건조된 시료는 분말화하여 실험 사용 전까지 -75°C deep freezer (NF-400SF, NIHON FREEZER, Tokyo, Japan)에 냉동 보관하였다. 세포배양에 사용된 DMSO의 최종 농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다.

초석잠 뿌리의 지질 및 지방산 추출 및 분석

지질 추출은 Folch의 방법[11]을 변형하여 실시하였으며 간단히 요약하면 다음과 같다. 조직을 butyl hydroxy toluene (BHT)을 함께 함유한 methanol로 교반하여 균질화하였다. 균질물을 1 ml 취한 후 chloroform 2 ml와 0.2 M NaH_2PO_4 1.4 ml를 넣고 교반하여 4°C , 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 지질층을 얻었다. 이와 같은 방법을 한번 더 진행한 뒤 질소가스를 이용하여 지질층의 유기용매를 완전히 날린 다음 지질을 얻었다. Morrison 와 Smith의 방법[32]에 따라 추출된 지질에 methylation용 시약인 boron trifluoride (BF_3) methanol 1 ml와 *n*-Hexane 0.4 ml를 가

한 후 1시간 동안 100°C 에서 가열하였다. 1시간 후 실온까지 충분히 냉각시킨 다음 *n*-Hexane 2 ml와 증류수 2 ml를 가한 후 다시 4°C , 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 얻었다. 이 상등액에서 질소 가스를 이용하여 유기용매를 날린 후 얻은 지방산은 지방산 분석 전까지 -75°C deep freezer (NF-400SF, Nihon freezer, Japan)에 보관하였다. 샘플에서 분리된 지방산을 1 μl 취하여 지방산 분석용 gas chromatography에 주입하여 지방산을 분석하였다[37]. 지방산 분석에 사용한 표준용액은 미국 Nu-Chek-Prep사의 462 standard이며, 이용된 column은 silica capillary column (CP-7856, 60 m \times 0.32 mm inner diameter \times 0.10 μm film thickness)이다. 기기의 분석 조건은 injector 250°C , detector (FID) 250°C , oven (initial 130°C , 분당 증가율은 175°C 까지 $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 210°C 까지 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 245°C 까지 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$), carrier gas는 헬륨을 사용하였다. 지방산 분석은 표준용액의 retention time 과 비교하여 정성하였고, 내부 표준물질 (22: 3n-3, methyl ester)을 이용하여 총 지방산을 정량하였으며 각각의 지방산들은 전체 peak area의 퍼센트로 산출하였다.

추출 및 분획

초석잠의 유기용매 추출을 위하여 acetone:methylene chloride를 1:1 비율로 혼합하여 초석잠이 충분히 잠기도록 하여 24시간 방치한 후 추출하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (N-1000, Eyela, Japan)로 농축하여 acetone:methylene chloride (A+M) 추출물을 얻었다. A+M 용매로 추출되지 않은 성분을 methanol (MeOH)로 추출하고자 남은 잔사에 A+M과 동량의 MeOH을 부어 위와 동일한 방법으로 2회 반복한 후 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 두 용매로부터 최대 수득한 추출물을 혼합하여 다시 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hexane, 85% aqueous methanol (85% aq. MeOH), *n*-butanol (*n*-BuOH) 및 water 분획물을 얻었다. 실험에는 각각의 추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 세포배지로 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 DMSO의 최종농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

시료 중 총 플라보노이드(flavonoid) 함량은 Chae 등[6]의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 용매별 초석잠 뿌리 분획물 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 시험관에 취하고 10 ml의 diethylene glycol을 가하여 잘 혼합한 후 1 N NaOH 1 ml 첨가하여 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 rutin (Sig-

ma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성

초석잠 뿌리 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성 측정을 위해 먼저 각 분획물을 MeOH로 농도별로 희석하여 사용하였다[9]. DPPH 2 mg을 ethanol 15 ml에 녹여 DPPH 원액을 조제하였다. DPPH 용액 1.2 ml에 DMSO 0.5 ml와 ethanol을 3 ml를 혼합하여 DPPH 희석액을 사용하였다. DPPH 희석액의 흡광도가 0.94-0.97이 되도록 하여 실험에 사용하였다. 시료 0.1 ml와 DPPH 희석액 0.9 ml를 섞은 후 10분 후 UV-visible spectrophotometer (Helios beta, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA)로 518 nm에서 측정하였다. 이때 대조군은 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)를 사용하였다. 시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \times 100$$

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS+) 라디칼 소거활성

초석잠 뿌리 분획물에 대한 ABTS+ 라디칼 소거활성을 측정하기 위해 7 mM의 ABTS+와 2.45 mM의 potassium persulfate를 첨가하여 radical생성을 위해 암소에서 16시간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도가 0.68-0.72 가 되도록 EtOH로 희석하였다[36]. ABTS+ 희석액 0.98 ml와 분획물 0.02 ml를 혼합하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 BHT를 사용하였다. 시료의 ABTS+ 라디칼 소거활성은 DPPH 소거활성의 식에 따라 계산하였다.

세포배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포와 인체 섬유종세포(HT-1080)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. Raw 264.7 세포와 HT-1080 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Corning Cellgro, USA)가 함유된 RPMI 1640 (Lonza, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japan)에서 배양하였다.

세포 내 nitric oxide (NO) 생성 측정

Raw 264.7 세포를 96 well cell culture plate에 well 당

5×10^4 cells/ml가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체한 후 초석잠 뿌리 분획물을 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/ml = 1 ppm)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이 후 생성된 NO의 양은 Griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1)을 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여 생성된 NO의 함량을 정량하였다. Over night 후 plate를 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 assay diluent 200 µl를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 plate의 각 well에 시료 100 µl를 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 4번 세척한 후 avidin-horseradish peroxidase액 100 µl를 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 100 µl를 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액을 100 µl씩을 가하여 반응을 정지시켰다. optical density는 ELISA (Bio-Rad, Model 500, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다[21].

Western blot

세포를 6 well plate에 5×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 부착시킨 다음 초석잠 뿌리 분획물 24시간 처리 한 후 TGFβR1 (proteintech, Illinois, USA)를 1시간 처리하여 배양하였다. 배양된 세포 media를 회수하여 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 상층액을 얻은 다음 Bradford assay (Bio-rad, Hercules, CA, USA) [19]를 이용하여 추출된 단백질을 정량하였다. 정량 된 단백질을 4-12% Bolt™ Bis-Tris Plus Mini Protein Gels (Thermo Fisher, CA, USA)에 전기영동하고 Polyvinylidene difluoride (PVDF) Mini Stacks (Thermo Fisher, CA, USA)에 단백질을 흡착시켰다. 실험에 사용한 p-Smad3, Smad2/3 항체는 Cell Signaling Technology (CST, MA, USA), GAPDH 항체는 Proteintech Group, Inc (Proteintech, IL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 탐색하고자 하는 단백질의 1차 항체와 2차 항체를 반응 시킨 후 ECL kit (Thermo Fisher, CA, USA)를 사용하여 ImageQuant Las500 (Cytiva, Incheon, Korea)에서 단백질 발현 정도를 확인하였다[17].

통계분석

실험결과는 Mean ± SD (Standard deviation)으로 나타내었다. 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 one-way ANOVA를 실시하여 $p < 0.05$ 수

Table 1. Fatty acid composition (% area) of root of *S. sieboldii* Miq.

Fatty Acid	%
14:0	0.18
16:0	17.5
18:0	1.01
20:0	0.31
22:0	0.67
Total Sat. ¹⁾	19.67
18:1n-9	2.28
20:1n-9	0.19
22:1n-9	0.13
Total Mono. ²⁾	2.60
18:2n-6	54.27
Total n-6	54.27
18:3n-3	20.82
20:3n-3	0.35
Total n-3	21.17

¹⁾Sat, saturated fatty acids.

²⁾Mono, monounsaturated fatty acids.

준에서 유의성을 검증하였고 사후검증은 Tukey's test를 실시하여 각 군들 간의 유의성은 알파벳으로 표시하였다 (SAS program v.9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

결과 및 고찰

초석잠 뿌리의 지방산 조성

초석잠 뿌리 지방산 조성은 총 n-6 지방산(54.27%) > 총 n-3 지방산(21.18%) > 총 포화지방산(19.70%) > 총 n-9 지방산(3.60%) 순으로 나타났으며, 지방산들 중 n-6 계열인 linoleic acid (LA, 18:2n-6)은 54.27%로 나타났고 n-3 계열인 linolenic acid (LNA, 18:3n-3)가 20.82%로 나타났다 (Table 1). 초석잠 뿌리는 n-3계 지방산인 LNA도 상당량 함유하고 있어 LNA는 체내에서 고도불포화 지방산들인 EPA 및 DHA로 대사되고 이들 n-3계 고도불포화 지방산 유래 prostaglandins는 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다[1]. 또한 Calder [5]는 LNA는 EPA의 선구물질로 EPA는 Arachidonic acid (20:4n-6)로부터 유래된 항염증성 prostaglandins의 생성을 억제하고 염증성 사이토카인 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다.

초석잠 뿌리 분획물의 총 플라보노이드 함량

초석잠 뿌리의 용매별 분획물의 총 플라보노이드 함량은 Table 2에 나타내었다. 초석잠 뿌리 분획물 중 n-BuOH 분획물이 16.67±0.74 mg rutin equivalent (QE)/g dw로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었으며, 다음으로 n-Hexane,

Table 2. Contents of total flavonoid of fractions from root of *S. sieboldii* Miq.

Sample	Total flavonoid contents (mg rutin QE/g) ¹⁾
n-Hexane fraction ²⁾	7.22±1.30 ^b
85% aq. MeOH fraction	3.89±0.56 ^d
n-BuOH fraction	16.67±0.74 ^a
Water fraction	5.19±0.37 ^c

¹⁾Values are expressed as mean ± SD and ^{a-d}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple range test

²⁾n-Hexane; n-hexane fraction, 85% aq. MeOH; 85% aqueous methanol fraction; n-BuOH; n-butanol fraction; Water; water fraction.

water 분획물 및 85% aq. MeOH 순이었다. Jeon과 Park [16]은 초석잠 분말의 총 플라보노이드 함량은 74.33±2.69 mg quercetin (QE)/g dw로 나타났다고 보고하였다. Kang 등 [18]은 용매별 추출하여 얻어진 추출물들의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과 부탄올 > 에탄올 > 물 > 클로로포름 > 헥산 추출물의 순으로 나타났으며 총 플라보노이드 함량이 가장 높은 부탄올 추출물은 5.21±0.08 mg QE/g dw 이었다고 보고하였다. Lee 등 [26]은 초석잠 분말과 6배 메탄올 첨가 메탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량이 각각 74.33±2.69 g QE/g 및 9.9 µg/ml 이었다고 보고하였다. 이러한 차이는 초석잠의 재배 환경, 추출 용매의 종류, 추출 온도 및 시간과 같은 추출 조건 등의 차이에 기인한 것으로 여겨진다. Benedec 등 [2]은 6종의 *Stachys* 종의 플라보노이드 종류를 분석한 결과 isoquercitrin, rutin, quercitrin, luteolin 및 apigenin로 나타났다고 보고하였다. Luteolin은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 TNF-와 IL-6의 방출을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다고 보고되었다[41]. 또한 Tank 등 [40]은 quercetin과 quercitrin은 LPS로 자극된 macrophage 염증을 억제하였고 산화적 스트레스도 저해하였다고 보고하였다.

초석잠 뿌리 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성

초석잠 뿌리 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 활성 산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA (electron donating ability, %)로 Fig. 1에 나타내었다. 각 용매별 분획물을 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/ml의 농도로 control (L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. 분획물들 중 n-BuOH 분획물은 실험한 모든 농도에서 EDA 값이 높게 나타났으며, 0.5 mg/ml의 농도에서 85.35%의 소거능을 나타내었다. 이는 n-BuOH 분획물의 높은 함량의 총 플라보노이드와 연관되어 있다고 여겨진다. Kang 등 [18]도 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 총 플라보노이드 함량이 높은 부탄올 추출물에 의한 소거활성도가 더 높았다고 보고하였다.

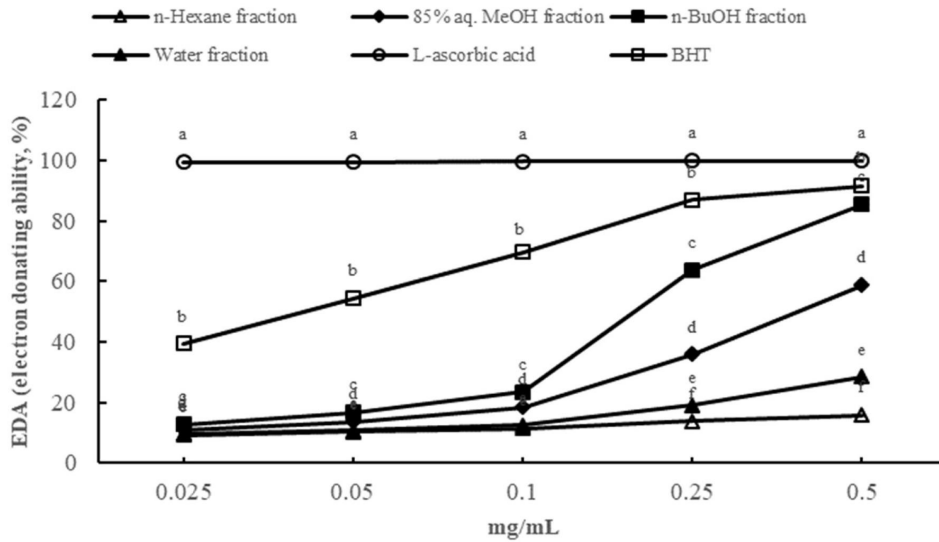


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of fractions from *S. sieboldii* Miq. root. ¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and ^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple range test. ²⁾*n*-Hexane, *n*-hexane fraction; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction; *n*-BuOH, *n*-butanol fraction; Water, water fraction.

초석잠 뿌리 분획물의 ABTS 라디칼 소거활성

초석잠 분획물의 ABTS 라디칼 소거활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 전자공여능인 EDA로 Fig. 2에 나타내었다. 각 용매별 분획물을 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/ml의 농도로 control (L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. DPPH 라디칼 소거활성 결과와 비슷하게 *n*-BuOH 분획물이 0.5 mg/ml의 농도에서 90.22%로 control과 유사한 값을 나타내었다. 85% aq. MeOH 분획물도 0.5 mg/mL의 농도에서 90.77%로 높은 라디칼 소거능을 보였

으며 이하의 농도에서도 농도 의존적으로 라디칼 소거능을 확인하였다. 선행연구[26]에서 초석잠 뿌리 추출물들에 의한 소거활성 결과에서도 총 플라보노이드 함량이 높은 A+M 추출물에서 높은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성이 높았음을 보고하였다.

초석잠 뿌리 분획물의 세포 내 nitric oxide (NO) 생성 저해 효과

초석잠 뿌리 분획물이 세포 내 NO 생성 저해에 얼마나

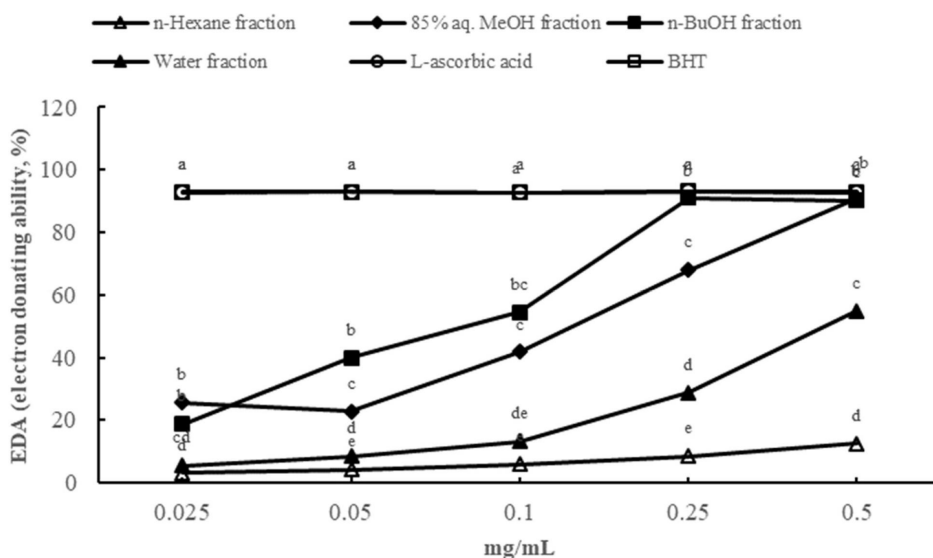


Fig. 2. ABTS radical scavenging effect of fractions from *S. sieboldii* Miq. root. ¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and ^{a-e}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple range test. ²⁾*n*-Hexane; *n*-hexane fraction, 85% aq. MeOH; 85% aqueous methanol fraction; *n*-BuOH; *n*-butanol fraction; Water; water fraction.

영향을 끼치는지 알아보기 위해서 세포 배양액에 처리하고, 자극제인 LPS를 이용해 세포를 자극시킨 후 세포 배양액에 Griess 시약을 반응시켜 확인하였다(Fig. 3). 독성을 나타내지 않는 농도를 1 mg/ml이하의 농도로 설정하고 실험하였다. 시료는 0.5 및 1 mg/ml의 농도로 처리하였으며 대조군으로는 시료 대신 PBS를 처리한 control군과 LPS를 처리하지 않은 blank군을 사용하였다. LPS를 처리한 control군의 경우 NO 생성량이 상대적으로 높았으며 LPS를 처리하지 않은 blank군은 NO 생성량이 상대적으로 낮게 나타났다. 모든 분획물들이 0.5 및 1 mg/ml의 농도에서 control과 유의적 차이를 보였고($p < 0.05$) 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였다. LPS는 생체 내에서 염증을 일으키는 inflammagen으로 널리 사용되어 왔으며 염증반응 병원체의 중심적 역할을 하고 NO와 같은 염증매개체의 생성을 자극하며 이 염증매개체의 신호경로를 자극한다[3]. 본 실험에서 초석잠 뿌리 분획물은 LPS로 자극된 RAW 264.7세포에서 NO 생성을 억제하였다. 홍삼추출물[14]과 한약제 일종인 당귀음자도 LPS로 자극된 NO 생성을 억제시켰고 이는 inducible nitric oxide synthase와 cyclooxygenase-2의 mRNA 발현을 효과적으로 감소시켜 항염증 효과가 나타났다고 보고하였다[21].

초석잠 뿌리 분획물의 TGFβ signaling 억제 효과

TGFβ는 다른 용해성 인자와 함께 pro-inflammatory 및

anti-inflammatory 반응을 중재하는 다양한 면역 세포의 성숙과 분화에 중요하다고 보고되어 있다[38]. 활성화된 TGFβ1은 신호전달을 위해 R-smad 단백질인 smad2/3을 모집하고 인산화 하여 co-smad인 smad4 와 헤테로복합체를 형성한다[8]. 그런 다음 smad 복합체는 표적 유전자의 전사를 조절하기 위해 핵으로 전위된다[30]. 초석잠 뿌리 분획물이 TGFβ signaling을 억제하고 그 하위조절 단백질인 smad3의 인산화 억제 효과를 확인하기 위해서 자극제인 TGFβR1과 함께 초석잠 뿌리 분획물을 세포를 처리한 후 세포 배양액에 처리하고, western blot 실험을 통해 확인하였다(Fig. 4). 시료는 0.1 mg/ml의 농도로 처리하였으며 대조군으로는 시료 대신 PBS를 처리한 control군과 TGFβR1을 처리하지 않은 blank군을 사용하였다. TGFβR1를 처리한 control군의 경우 smad3의 인산화 발현량이 상대적으로 높았으며 TGFβR1를 처리하지 않은 blank군은 smad3의 인산화 발현량이 상대적으로 낮게 나타났다. 초석잠 뿌리 분획물을 처리한 결과, 85% aq. MeOH 및 water 분획물에서 control과 비교하여 각각 88% 및 77% 수준으로 smad3의 인산화가 저해되는 것을 확인하였다. 이와 같은 85% aq. MeOH 분획물에 의한 TGFβ signaling 억제효과는 n-3 지방산에 의한 전사인자 Nrf2를 억제함으로써 TGFβ/smard 경로와 관련된 유전자의 발현을 낮추는 효과[42]로 사료된다. Jung 등[17]은 플라보노이드 화합물인 icariin, icaritin 및 quercetin을 함유하고 있는 삼지구엽초 열수 추출물은

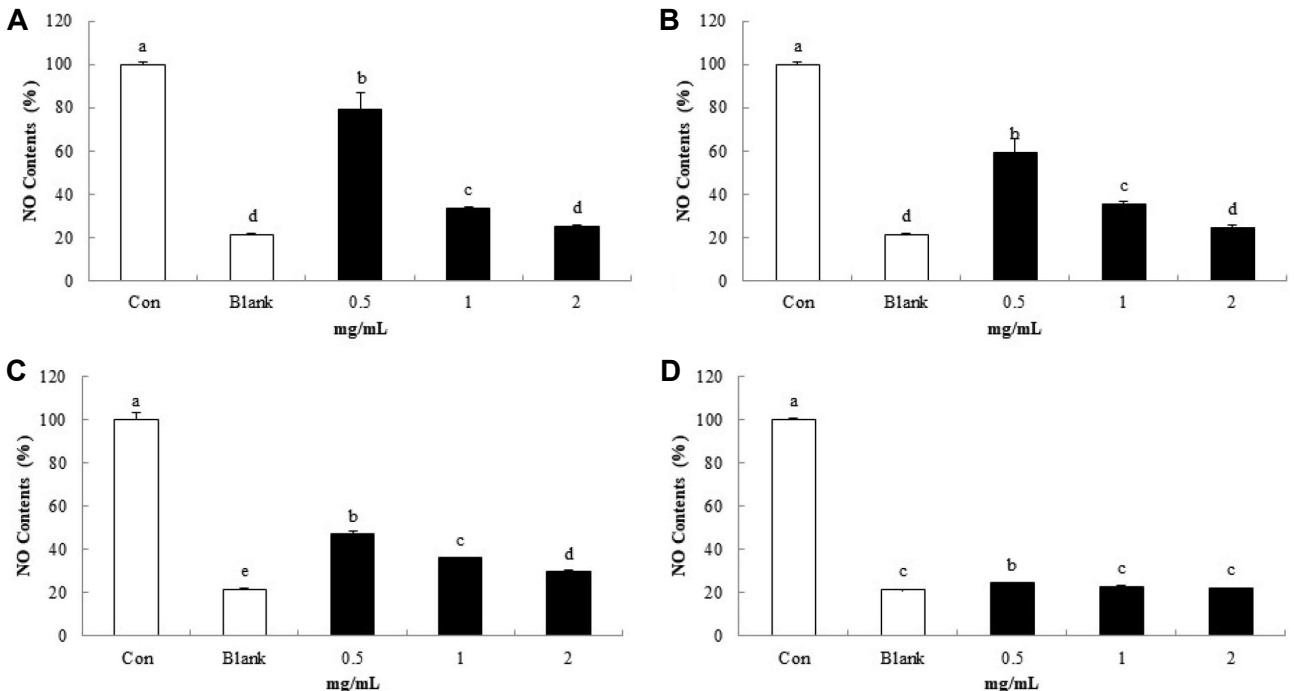


Fig. 3. Effect of solvent fractions from *S. sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells. ^{a-d}Different superscripts indicated significant differences at $p < 0.05$. A, *n*-Hexane fraction with *n*-Hexane; B, 85% aq. MeOH fraction; C, *n*-BuOH fraction; D, Water fraction.

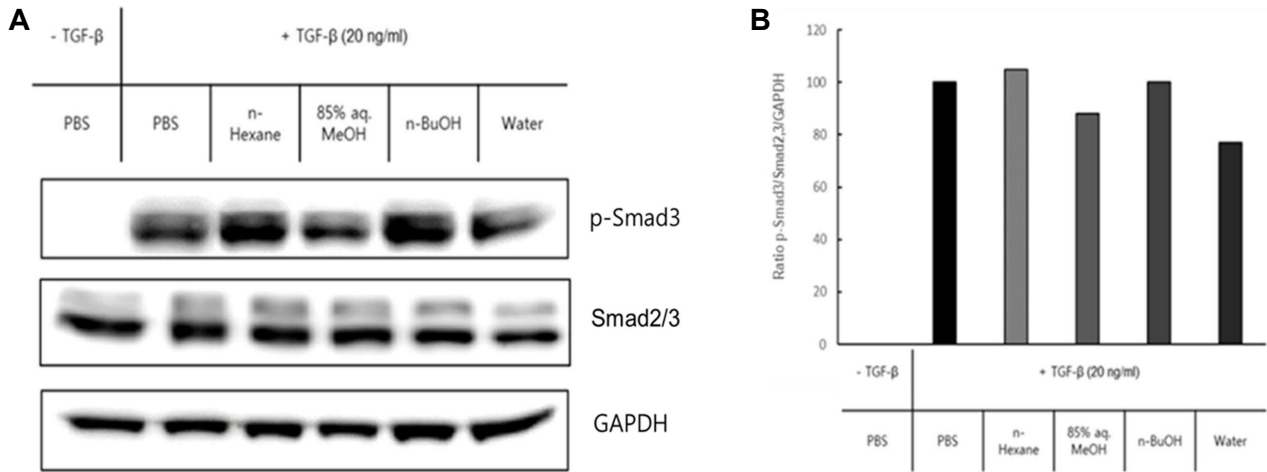


Fig. 4. Inhibitory effect of solvent fractions from *S. sieboldii* Miq. on smad3 phosphorylation. A, Western blot analysis in whole cell lysates HT-1080 cells. B, Quantification of pSmad3/Smad2,3 protein levels in using the ImageJ software is presented.

TGFβ1으로 활성화된 간성상세포에서 smad3의 인산화를 억제하였다고 보고하였다. TGFβ 처리 시 DHA가 smad 단백질의 인산화에 영향을 미치는 효과에 대해 알아본 연구에서 TGFβ 만 처리한 군에 비해 TGFβ 와 DHA를 동시에 처리한 군에서 smad2/3의 인산화가 감소됨이 보고되었다 [23]. Lee 등[27]은 알레르기성 접촉성 피부염이 유도된 마우스에서 초석잠 추출물은 피부 장벽의 손상을 완하시킴으로써 Th2 분화를 조절하는 효과가 있으며 TNF-α와 IL-4 같은 염증성 매개물들의 발현을 억제 시켜 피부 손상 완화에 기여한 것으로 보고하였다. 본 연구 결과들로부터 플라보노이드 함량이 높은 n-BuOH 분획물은 높은 항산화 활성을 나타내었고 항염증 활성은 모든 분획물들에서 골고루 나타났으며 TGFβ/smad 경로 인산화 억제 효과는 85% aq. MeOH 및 water 분획물들에서 높은 활성을 나타냈으므로 여기에 대해서는 분획물들의 생리활성 동정 등 향후 연구가 필요하다고 여겨진다.

감사의 글

본 과제(결과물)은 2017년 대한민국 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2017R1A2B4005915)의 연구결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Al Hinai, H. S., Hooper, S., Potter, S., Al Alawi, S. A., Al Shuhoumi, M., and Anna, D. 2023. Anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in THP-1 macrophages: promising in-vitro insights. *Inter J. Clin. Biochem. Res.* **10**, 232-241.
- Benedec, D., Oniga, H., Hanganu, D., Tiperciuc, B., Nistor, A., Vlase, A. M., Vlase L., Puscas, C., Duma, M., Login, C. C., Niculae, M. and Silaghi-Dumitrescu, R. 2023. *Stachys* species: Comparative evaluation of phenolic profile and antimicrobial and antioxidant potential. *Antibiotics* **2023**, doi:10.3390/antibiotics2019.12111644.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 9070916.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L. and Straif, K. 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncology*, **16**, 1599-1600.
- Calder, P. C. 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**, 645-662.
- Chae, S. K., Kang, G. S., Ma, S. J., Bang, K. W., Oh, M. W. and Oh, S. H. 2002. Standard food analysis. Paju: Jigu-Moonwha Sa, Korea. pp 381-382
- Chen, W., Chen, H., Zhu, D., Luo, J., Ying, S., Deng, Y. and Yang, X. 2023. The clinical application value of compound *Stachys sieboldii* Miq granules to stable COPD patients. *Minerva Med.* **114**, 152-161.
- Chen, X. and Xu, L. 2011. Mechanism and regulation of nucleocytoplasmic trafficking of smad. *Cell Biosci.* **1**, 1-8.
- Choi, I. Y., Song, Y. J. and Lee, W. H. 2010. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of some herbal extracts. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **28**, 871-876.
- Choi, S. H. and Hwang, E. S. 2018. Quality characteristics and antioxidant activity of chocolate containing Chinese artichoke (*Stachys sieboldii* Miq.) powder. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **47**, 39-45.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total

- lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
12. Ganguly, R. and Pierce, G. N. 2015. The toxicity of dietary trans fats. *Food Chem. Toxicol.* **78**, 170-176.
 13. Hwang, S. J. 2020. Antioxidant activities and quality characteristics of porridge with Chinese artichoke (*Stachys sieboldii* Miq.) Powder. *Culinary Sci. Hospitality Res.* **26**, 240-250.
 14. Jang Y. A., Kim, H. N. and Kim, B. A. 2019. Effect of red ginseng extract on the inflammatory response of LPS-induced RAW 264.7 cell. *J. Kor. Applied Sci. Technol.* **36**, 1434-1442.
 15. Jegal, J. M. and Jung, J. H. 2023. Quality characteristics and antioxidant activities of Chinese artichoke powder prepared by different drying method. *Culinary Sci. Hospitality Res.* **29**, 39-47.
 16. Jeon, K. S. and Park, S. I. 2015. Antioxidative properties of Chinese artichoke (*Stachys sieboldii* Miq.) added white bread. *Kor. J. Culinary Res.* **6**, 120-132.
 17. Jung, J. Y., Min, B. G., Park, C. A., Byun, S. H., Cho, I. J. and Kim, S. C. 2018. *Epimedium koreanum* Nakai water extract regulates hepatic stellate cells activation through inhibition of Smad signaling pathway. *Herbal Formula Sci.* **26**, 183-193.
 18. Kang, J. R., Kang, M. J., Shin, J. H., Park, J. H., Kim, D. I., Chung, S. Y. and Shin, J. H. 2017. Antioxidant and antidiabetic activities of various extracts from *Stachys sieboldii* Miq. *Kor. Soc. Food Preserv.* **24**, 615-622.
 19. Kielkopf, C. L., Bauer, W. and Urbatsch, I. L. 2020. Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harb Protoc.* **2020**, doi:10.1101/pdb.prot102269.
 20. Kim, B. H. and Lee, J. J. 2019. Quality characteristics and antioxidant activity of *Stachys sieboldii* Miq. leaf cookies. *Kor. J. Community Living Sci.* **30**, 581-594.
 21. Kim, T. Y. 2013. Effect of *Gagam-Danguieumja* through regulation of MAPK on LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Orient. Int. Med.* **34**, 339-348.
 22. Kim, Y. S., Young, M. R., Bobe, G., Colburn, N. H. and Milner, J. A. 2009. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. *Cancer Prevention Res.* **2**, 200-208.
 23. Ko, J., Oh, I. J., Kang, J. I., Choi, Y. K., Yoon, H. S., Yoo, E. S., Ko, C. I. and Ahn, Y. S. 2019. Effect and mechanism of docosahexaenoic acid on the proliferation of dermal papilla cells. *J. Med. Life Sci.* **16**, 84-89.
 24. Lee, J. E., Jin, S. Y. and Han, Y. S. 2014. Antioxidant activities and quality characteristics of tufu supplemented with Chinese artichoke powder. *Kor. J. Food Nutr.* **27**, 10-21.
 25. Lee, J. H. 2021. Antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory effects of *Stachys sieboldii* extract. *Kor. J. Plant Resources* **34**, 420-432.
 26. Lee, J. W. and Lim, S. Y. 2018. Comparison of flavonoid content and antioxidant effect of extracts from *Stachys sieboldii* Miq. and *Lycopus lucidus* Turcz. *J. Life Sci.* **28**, 841-848.
 27. Lee, Y. S., Jeong, S. O. and Pae, H. O. 2022. Effect of the extract of *Stachys Affinis* on DNFB-induced allergic contact dermatitis in Mice. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **36**, 23-27.
 28. Li, M. O. and Flavell, R. A. 2008. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- β and interleukin-10. *Immunity*, **28**, 468-476.
 29. Maleki, S. J., Crespo, J. F. and Cabanillas, B. 2019. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* **299**, doi:10.16/j.foodchem.2019.125124.
 30. Massagué, J., Seoane, J. and Wotton, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Develop.* **19**, 2783-2810.
 31. Moodie, R., Stuckler, D., Monteiro, C., Sheron, N., Neal, B., Thamarangsi, T. and Casswell, S. 2013. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. *The lancet* **381**, 670-679.
 32. Morrison, W. R. and Smith, L. M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* **5**, 600-608.
 33. Na, E., Lee, J. W. and Lim, S. Y. 2020. Comparison of antioxidant, cytotoxicity and flavonoid content of *Stachys sieboldii* Miq. vs. *Lycopus lucidus* Turcz. leaf extracts. *J. Life Sci.* **30**, 147-155.
 34. Oh, H. K. 2018. Antioxidant and Neuronal cell protective effects of *Stachys sieboldii* Miq. according to drying methods. *J. Kor. Applied Sci. Technol.* **35**, 1320-1326.
 35. Poyton, R. O., Ball, K. A. and Castello, P. R. 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinol. Meta.* **20**, 332-340.
 36. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
 37. Salem Jr, N., Wegher, B., Mena, P. and Uauy, R. 1996. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proceedings Nat. Academy Sci.* **93**, 49-54.
 38. Schon, H. T. and Weiskirchen, R. 2014. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver. *Hepatobiliary Surgery Nutr.* **3**, 386.
 39. Smith, W. L. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **263**, F181-F191.
 40. Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L. and Xiong, L. 2019. Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW 264.7 cells: In vitro assessment and a theoretical model. *Biomed Res. Inter.* **2019**, doi:10.1155/2019/7039802.
 41. Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Maruromatis, A., Economou, M., Fotisis and Roussos, C. 2001. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and pro-inflammatory cytokine production in macrophages. *Inflammation Immunopharmacol.* **296**, 181-187.
 42. Xu, J., Feng, Z. P., Peng, H. Y. and Fu, P. 2021. Omega-3 polyunsaturated fatty acids alleviate adenine-induced chronic renal failure via regulating ROS production and TGF- β /SMAD pathway. *Euro. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* doi:10.26355/eurrev_202111_27221.

초록 : 초석잠 뿌리 분획물의 항산화 및 항염증 효과와 smad 신호 전달에 미치는 효과

이정우 · 최명원 · 임선영*

(한국해양대학교 해양과학융합학부)

본 연구는 초석잠 뿌리 분획물의 항산화 및 항염증 효과를 규명하고 transforming growth factor (TGF) β 자극에 의한 smad 신호전달에 미치는 효과에 대해 연구하였다. 초석잠 뿌리 분획물들 중 *n*-BuOH 분획물이 16.67 mg/g 으로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었으며, 다음으로 *n*-Hexane, water 및 85% aq. MeOH 분획물 순이었다. 초석잠 뿌리의 지방산 조성은 n-6 지방산(54.27%) > n-3 지방산(21.18%) > 포화지방산(19.70%) > n-9 지방산(3.60%) 순으로 나타났으며, 지방산들 중 n-6계 지방산인 linoleic acid (18:2n-6)가 54.27%로 나타내었고 n-3계 지방산인 linolenic acid (18:3n-3)는 20.82%의 함량을 나타내었다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결과, 초석잠 뿌리 분획물들 중 *n*-BuOH 분획물은 0.5 mg/mL 의 농도에서 각각 85.4% 및 90.2%로 라디칼 소거능을 나타내었다. 85% aq. MeOH 분획물은 0.5 mg/mL 의 농도에서 각각 58.7% 및 90.8%로 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. 항염증 효능 중 NO 생성 저해 효과는 모든 분획물들이 0.5, 1 및 2 mg/mL의 농도에서 control 과 유의적 차이를 보이면서 NO 생성을 저해하였다 ($p < 0.05$). TGF β signaling의 smad3 의 인산화 발현량을 확인한 결과 85% aq. MeOH 및 water 분획물들을 처리한 군에서 control과 비교했을 때 각각 88% 및 77% 수준으로 smad3의 인산화가 저해되는 것을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 플라보노이드 함량이 높은 *n*-BuOH 분획물의 항산화 활성이 높았고 항염증 및 TGF β signaling의 smad3 의 인산화 저해 활성은 85% aq. MeOH 및 water 분획물들에서 높은 활성이 나타났었다.