

도라지 잎 에탄올 추출물의 주요 성분 분석 및 마우스 대식세포와 인체 폐암세포에서 항염효과

이정민 · 배병준 · 최지림* · †정영신**,**

호서대학교 대학원 생명공학과 대학원생, *(주)황초원 대표이사,
호서대학교 생명공학과 교수, *호서대학교 기초과학연구소 교수

Analysis of Major Constituents of an Ethanol Extract of *Platycodon Grandiflorum* Leaves and Protective Effects on Inflammation in Murine Macrophage and Human Lung Carcinoma Cells

Jung Min Lee, Byeong Jun Bae, Jee-Lim Choi* and †Young-Shin Chung**,**

Master's Student, Dept. of Biotechnology, Graduate School, Hoseo University, Asan 31499, Korea

*CEO, Royal Greens Co., Ltd., Seongnam 13201, Korea

**Professor, Dept. of Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Korea

***Professor, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 31499, Korea

Abstract

This study investigated major constituents and anti-inflammatory effects of an ethanol extract of *Platycodon grandiflorum* leaves. Through HPLC analysis, chlorogenic acid and luteolin-7-O-glucoside were identified as predominant constituents in the ethanol extract. Their anti-inflammatory effects were evaluated using murine macrophage (RAW 264.7 cells) and human lung carcinoma cells (NCI-H292 & A549). The ethanol extract significantly ($p < 0.01$) inhibited the production of nitrite, interleukin-6 (IL-6), and prostaglandin E2 (PGE2) induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW 264.7 cells. Furthermore, the ethanol extract suppressed the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible NO synthase (iNOS) proteins in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. In NCI-H292 and A549 cells, treatment with the ethanol extract significantly ($p < 0.05$) decreased levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 induced by IL-1 β . The phosphorylation of ERK rather than JNK in the mitogen-activated protein kinase signaling pathway was observed to be a more important mediator in the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in NCI-H292 cells. These findings suggest that the ethanol extract of *Platycodon grandiflorum* leaves containing luteolin-7-O-glucoside exhibits promising anti-inflammatory properties.

Key words: *Platycodon grandiflorum* leaves, anti-inflammatory effect, RAW 264.7 cells, NCI-H292 cells, A549 cells, luteolin-7-O-glucoside

서론

도라지(*Platycodon grandiflorum*) 식물은 도라지속(platycodon genus)에 속하는 유일한 종으로 동북 아시아에 분포되어 자라며 풍선꽃(balloon flower)이라고도 한다. 전통약물에서는 주로 뿌리(Rhizom)를 사용하고 있고 한국은 길경(kilkyoung), 중국은 jiepeng, lingdanghua, 일본은 kikyō, 몽골은 Hurijunzhaga

로 기침, 가래, 목아픔, 폐농양, 흉통 등에 오랫동안 사용하였다(Ha & Kim 2009; Zhang 등 2015; Wang 등 2017). 국내에서 식품 원료로 섭취되고 있고 다양한 가공 형태의 건강기능식품으로도 섭취되고 있는 도라지 뿌리의 주성분은 트리테르페노이드 글리코사이드(triterpenoid glycoside)인 사포닌(saponins)으로 75종이 보고되었고(Ji 등 2020) 길경 추출물 또는 단일 사포닌의 효능연구 분야는, 전통약물로 사용된 예를 바탕으로

† Corresponding author: Young-Shin Chung, Professor, Dept. of Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Korea. Tel: +82-41-540-9671, Fax: +82-41-540-9538, E-mail: yschung@hoseo.edu

항염, 면역증강, 진해거담 뿐아니라 다양한 질환, 항암, 항비만, 항당뇨, 간보호 및 심혈관 활성 등이 보고되었다(Shin 등 2002; Ahn 등 2005; Wu 등 2012; Li 등 2014; Li 등 2015; Bailly & Vergoten 2020; Jung 등 2022; Shen 등 2023).

뿌리 외에도 자생식물의 부위별 성분 및 효능에 관심이 높아지면서 최근 도라지 식물의 지상부위(잎과 줄기), 싹 그리고 씨에 대한 성분분석 및 효능에 관한 연구가 보고 되었으며 식물의 부위 및 산지에 따라 성분이 다른 것으로 판단된다. Inada 등(1992)은 씨에서 플라보노이드 성분을 분석하여 4종 즉 (2R,3R)-taxifolin, quercetin-7-O-glucoside, quercetin-7-O-rutinoside, luteolin-7-O-glucoside를 제시하였고, Kim 등(2020)은 UPLC-DAD-QTOF/MS를 사용하여 새싹의 추출물에서 플라보노이드 성분인 kaempferol-3-O-galactoside와 1-O-caffeoylquinic acid를 분석하였다. 대구의 약령시장(Daegu Herbal market)에서 구매한 도라지의 줄기와 잎, 즉 지상 부위에서는 가장 많이 검출된 대사물질이 tetrahydroxy flavone 종류로 5,7,2',5'-위치에 hydroxy 작용기를 가지는 물질과 apigenin로 확인되었다(Lee 등 2015). Jeong 등(2010)은 진주에서 수집한 도라지 지상부의 부탄을 분획을 분석하였고 apigenin-7-O-glucoside와 luteolin-7-O-glucoside를 주성분으로 보고하였다. Wang 등(2017)은 잎의 biomarker로 7종의 물질을 제시하였고 그중 3종이 플라보노이드로 grosvenorin, 7-hydroxy-1-methoxy-2-methoxyxanthone, 4',7-dimethyltectorigenin였다. Mazol 등(2004)은 폴란드 도라지의 지상부를 꽃이 피었을 때 채취하여 분석하였고 luteolin-7-O-glucoside를 주성분으로, 그 외 apigenin 7-O-glucoside, luteolin, apigenin 성분을 보고하였으며, 3,4-dimethoxycinnamic, caffeic, chlorogenic, ferulic을 포함하여 12종의 폴리페놀 성분이 함유되어 있음을 확인하였다. 도라지 잎의 효능에 관한 연구는 제한적이며 Jeong 등(2010)이 지상 부위의 부탄을 분획의 항산화가 탁월함을 검증하였고, Kim 등(2020)은 새싹의 에탄올 추출물에 항산화효능이 탁월하며 플라보노이드 함량과 관련이 있음을 보고하였으며, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증 관련 사이토카인들을 분석한 결과, 새싹 추출물보다 뿌리 추출물에서 NO 억제 효과가 높았고, 뿌리와 새싹 추출물에서 IL-6 억제 효과가 관찰되었으며, 새싹 추출물에서 TNF- α 억제 효과가 더 유의적으로 높은 것으로 평가하였다.

염증반응은 감염, 손상, 오염의 노출 등에 의해 체내 항상성이 깨지면서 야기되는 일련의 반응으로 선천적 면역 수용체가 병원체나 손상된 세포들을 인지하면서 시작되며 전염증성 사이토카인(IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ 등)이 매개하여 다양한 질환, 즉 류마티스 관절염, 천식, 심혈관 및 뇌혈관 질환, 당뇨, 비만, 암 등을 유발한다. 따라서, 염증을 억제하면 다양한 질환의 유발을 감소시킬 수 있어서 염증 억제 약

물들의 개발과 함께 자생식물 또는 식용 작물로부터 항염작용을 나타내는 성분들의 연구개발이 중요해지고 있고 그중 폴리페놀(polyphenol) 또는 플라보노이드(flavonoid)들이 보고되었다(Bialsalski HK 2007; Mueller 등 2010; Leyva-López 등 2016).

도라지는 다년생 식물로 다년생 뿌리를 사용하기 위하여 여러 해를 재배하는 동안에 자라는 지상 부위 또는 잎을 사용할 수 있어서 도라지 잎의 활용이 늘고 있으므로 잎의 성분 및 효능 또는 안전성에 관한 연구가 필요한 시점이다. 사전연구(Lee JY 2019)에서 도라지 잎 추출물에 총 플라보노이드와 총 페놀산(phenolic acid) 성분이 뿌리보다 20배 이상 많은 것을 확인하였고 마우스 대식세포에서 nitrite 생성억제 효과가 뿌리 추출물과 유사하게 관찰되어 본 연구를 통하여 주요성분 분석과 항염효능을 검증함으로써 잎에 대한 활용도 및 부가 가치를 높이고자 하였다. 또한, 최근 바이러스성 호흡기 질환, 미세먼지의 증가 및 고령화의 추세로 일상에서 호흡기 건강 관리가 중요해지고 있으므로 항염효능을 기관지, 천식 등 폐 보호 기능에도 적용할 수 있을지를 타진하고자 다양한 세포, 마우스 대식세포(RAW 264.7)와 함께 인체 유래 폐암세포(NCI-H292와 A549)를 사용하여 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 도라지 잎 추출물

충북 옥천 산골도라지농원(청성면 삼남리)에서 도라지 식물의 지상(줄기와 잎) 부위 원료를 봄(6월)과 가을(10월)에 2회 직접 수집하였다. 지상 부위를 60°C에서 8시간 건조한 후 잎만을 분리하고 분쇄하여 80 mesh를 통과한 분말을 사용하였다. 잎 분말을 70% 에탄올과 1:10 비율로 섞고 40분간 초음파 추출을 2회 수행하였고 microfiber glass filter(47 mm, 1.6 μ m, Chmlab Group, Barcelona, Spain)로 여과 후 회전진공농축기에서 감압 농축하였다.

2. 지표성분 확인 및 함량 측정

주요 성분으로 예측되는 플라보노이드 또는 폴리페놀 성분의 정량 분석을 위하여 HPLC 분석조건을 확립하였다. Inno C18 컬럼(5.0 μ m, 4.6 mm×250 mm, YoungJin Biochrom Co., Ltd., Seongnam, Korea)을 사용하였고 용리액으로는 0.1% formic acid 포함 증류수와 acetonitrile을 90:10부터 50:50까지의 구배 조건으로 40분간 분석하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 하였고 검출 파장은 348 nm로 하였다. Luteolin-7-O-glucoside(Cat. No. CFN98565)와 chlorogenic acid(Cat. No. CFN99116)의 표준시료는 ChemFaces(Wuhan, Hubei, China)에

서 각각 구입하였다.

3. 세포배양

마우스 대식세포는 RAW 264.7(KCLB No. 40071, Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)을 사용하였고 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)과 1% penicillin-streptomycin(Pen/Strep, Welgene Inc., Gyeongsan, Korea)이 첨가된 DMEM(Gibco/Thermo Fisher Scientific) 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 인체 폐암세포는 NCI-H292(KCLB No. 21848, KCLB)와 A549(KCLB No. 10185, KCLB)를 사용하였고 10% FBS와 1% Pen/Strep이 첨가된 RPMI-1640(Gibco/Thermo Fisher Scientific) 배양액에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

RAW 264.7 세포의 생존율은 24웰 플레이트를 사용하여 2×10⁵ cells/well로 분주한 후 24시간 배양하고 에탄올 추출물을 DMSO(Cat. No. DMS666, BioShop, Burlington, OT, Canada)에 용해하여 농도별(0~0.5 mg/mL) 배양액의 1%(v/v)가 되도록 처리하였고 2시간 후 lipopolysaccharide(LPS, Cat. No. L4516, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 100 ng/mL로 처리한 후 24시간에 WST assay kit(EZ-Cytox, DoGenBio, Seoul, Korea)을 사용하여 평가하였다. EZ-Cytox 시료 처리 조건은 37°C에서 2시간이었으며 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 평가하였다. NCI-H292 세포는 24웰 플레이트에 1×10⁵ cells/well로 분주하였고, A549 세포는 5×10⁴ cells/well로 분주하였다. 48시간 배양하여 세포가 80% 이상 증식 후에 10 ng/mL의 IL-1β(Cat. No. 201-LB, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 포함하는 배지로 교체하였다. 4시간 후 추출물을 DMSO에 용해하여 처리하고 12시간 후에 세포 생존율을 측정하였다.

5. Nitrite 및 cytokine 측정

RAW 264.7을 24웰 플레이트에 2×10⁵ cells/well로 분주한 후, 24시간 배양하고 에탄올 추출물을 세포독성이 없는 농도인 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL로 처리하였으며 2시간 후 LPS를 100 ng/mL로 처리하였다. 24시간 후 배양액 일부를 사용하여 nitrite를 측정하였다. 배양액에 Griess reagent(Cat. No. G2930, Promega, Madison, WI, USA)를 첨가하였고 37°C에서 15분 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 배양액에서 mouse IL-6 kit(Cat. No. M6000B, R&D Systems Inc.)와 PGE2 kit(Cat. No. KGE004B, R&D Systems Inc.)를 사용하여 IL-6와 PGE2 함량을 각각 측정하였다. NCI-H292 세포와 A549 세포를 24 웰 플레이트에 1×10⁵ cells/well과 5×10⁴ cells/well로 각각 분주

하였고 48시간 배양한 후 IL-1β를 처리하고 4시간 후 추출물을 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL 농도로 12시간 처리하였다. 배양액을 수거하였고 인체 IL-6 ELISA kit(Cat. No. K0331194, Komabiotech, Seoul, Korea)와 인체 IL-8/CXCL8 ELISA kit(Cat. No. D8000C, R&D Systems Inc.)를 사용하여 IL-6와 IL-8을 각각 측정하였다.

6. 전기영동 및 western blot 분석

RAW 264.7 세포에 LPS와 추출물을 처리·배양 후, protease inhibitor(Cat. No. 87785, Thermo Fisher Scientific)를 첨가한 RIPA buffer(Cat. No. 89900, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 세포를 용해시키고 원심분리 후 상층액을 사용하여 단백질을 정량하였다. NCI-H292 세포는 protease inhibitor와 phosphorylase inhibitor(Cat. No. 78420, Thermo Fisher Scientific)를 첨가한 RIPA buffer로 용해 시켰다. 10% SDS-PAGE 겔을 사용하여 100 V에서 전기영동하여 단백질을 분리한 후, 80 V에서 1.5시간 동안 PVDF 멤브레인(Roche, Basel, Swiss)에 옮겼다. 멤브레인을 3% non-fat dry milk 또는 5% BSA가 포함된 PBS buffer에서 1시간 동안 blocking하였고, 1차 항체를 4°C에서 밤샘 반응시켰다. 2차 항체로 1시간 반응 후 화학발광 기질로 EzWestLumiOne(ATTO, Tokyo, Japan)을 처리하고 Chemiluminescence imaging system(LuminoGraph II EM, ATTO)을 사용하여 단백질 밴드를 확인하였으며, Image J(NIH, USA)를 사용하여 정량화하였다. RAW 264.7 세포의 단백질 발현을 분석하기 위해 사용한 1차 항체는 anti-COX-2(Cat. No. 12282, 1:2,000, Cell signalling, Danvers, MA, USA), anti-iNOS(Cat. No. 13120, 1:1,000, Cell signalling)와 anti-β-actin(Cat. No. sc-47778, 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였고 2차 항체는 Horse radish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-rabbit-IgG(Cat. No. 7074, 1:1,000, Cell signalling) 또는 anti-mouse-IgG(Cat. No. sc525409, 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 사용하였다. NCI-H292 세포의 단백질 발현 분석을 위하여 사용한 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.의 EKR(Cat. No. sc-514302), p-ERK(Cat. No. sc-7838), JNK(Cat. No. sc-7345), p-JNK(Cat. No. sc-6254) 및 β-actin(Cat. No. sc-47778)에 대한 항체를 1:1,000으로 희석하여 사용하였고, 2차 항체는 HRP가 결합된 anti-mouse IgG(Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 사용하였다.

7. 통계처리

통계처리를 위하여 최소 3회 반복시험 결과를 사용하였고 모든 결과는 평균과 표준편차(mean±S.D.)로 제시하였으며 추출물 처리에 의한 유의성 검증은 SPSS(PASW statistics 18)의 Dunnett *t*-test 또는 Graphpad prism의 multiple *t*-test를 사용

하였고, 0.05와 0.01의 *p*값을 기준으로 유의성을 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 도라지 잎 에탄올 추출물의 지표성분 함량분석

도라지 잎 추출물의 지표성분을 선정하기 위하여 HPLC 분석을 수행한 결과에서 2종의 주요 피크가 관찰되었다. 표준물질들의 HPLC 피크의 retention time과 200-400 nm의 UV 스펙트럼을 비교한 결과에서 에탄올 추출물 분석에 따른 2종의 주요 피크가 chlorogenic acid와 luteolin-7-O-glucoside으로 확인되었다. Spike test를 수행하였고 추출물에 표준물질을 각각 첨가했을 때, 피크가 각각 커지는 것을 확인하였다 (Fig. 1). Chlorogenic acid와 luteolin-7-O-glucoside의 retention

time은 각각 11.12 ± 0.11 분과 20.23 ± 0.15 분이었다. 지표성분의 정량분석을 위하여 분석조건의 직선성, 정확성, 반복성 및 정성한계와 정량한계 등을 확인하였고 그 결과를 Table 1에 제시하였다. 정확성은 세 농도의 표준물질이 첨가된 각각의 추출물에서 표준물질의 회수율을 측정하여 RSD(relative standard deviation)를 산출하였고 chlorogenic acid와 luteolin-7-O-glucoside 정확성 분석의 RSD가 각각 5% 이내로 평가되었다. 정밀성은 5개 별도 농도로 조제된 추출물을 당일 분석한 반복성(intra-day)과 다른 날에 분석하여 평가한 반복성(inter-day)으로 평가하였고 2종의 주요 성분에 대하여 모두 RSD가 5% 이하로 확인되었다. 이에 따라서 에탄올 추출물의 계절(봄 또는 가을)에 따른 시료에서 주요 성분 2종의 함량을 측정하였고 Table 2에 제시하였다. 봄에 채취한 도라지 잎 추출

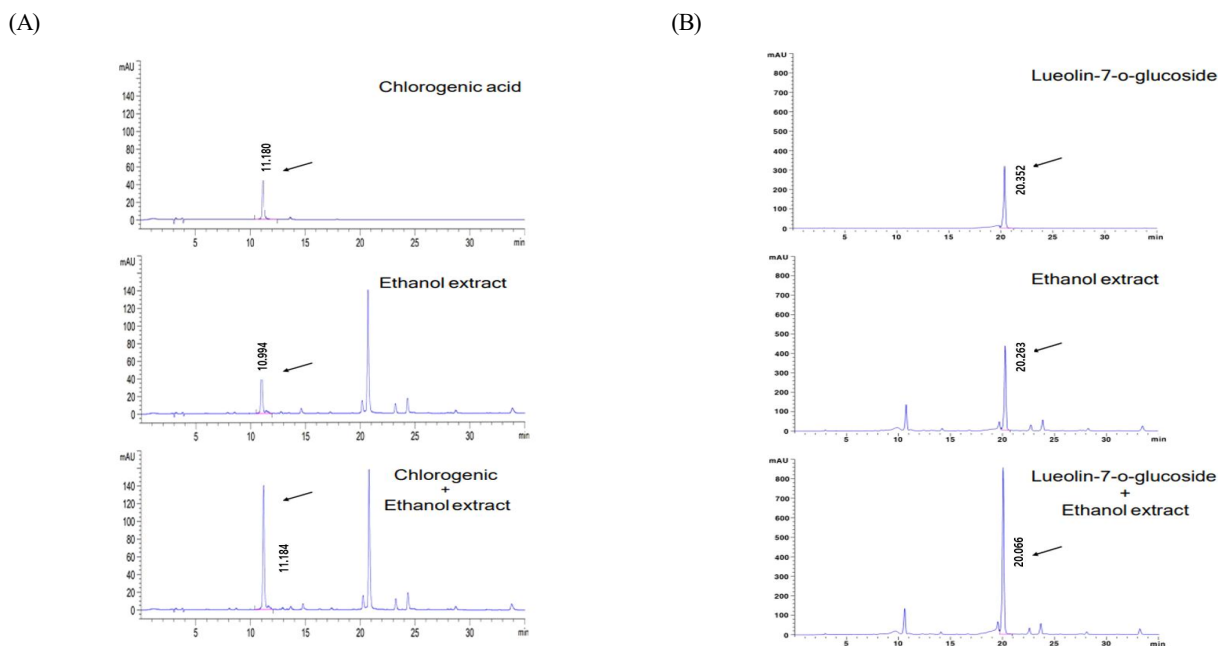


Fig. 1. HPLC chromatograms of standard, ethanol extract and standard+ethanol extract at 348 nm in spike tests. (A) chlorogenic acid and (B) luteolin-7-O-glucoside.

Table 1. Linearity, precision, accuracy and limit of HPLC analysis method for chlorogenic acid and luteolin-7-O-glucoside

Components	Regression equation ¹⁾	r^2	Intra-day ²⁾ (RSD%)	Inter-day ³⁾ (RSD%)	Recovery ⁴⁾ (RSD%)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Chlorogenic acid	$y=6.644x+3.141$	0.9997	2.94	1.90	2.57	0.18	0.59
Luteolin-7-O-glucoside	$y=13.147x+2.715$	0.9996	3.16	2.07	1.58	1.03	3.42

¹⁾ y: peak area, x: amount ($\mu\text{g/mL}$).

²⁾ Intra-day: intra-day precision in RSD% of peak area (n=5).

³⁾ Inter-day: inter-day precision in RSD% of peak area for 3 days.

⁴⁾ Recovery %: accuracy in three different samples.

r: regression coefficient, RSD: relative standard deviation, LOD: Limit of detection, LOQ: Limit of quantitation.

Table 2. Contents of chlorogenic acid and luteolin-7-O-glucoside in extracts of *Platycodon grandiflorum* leaves evaluated from HPLC analysis

Samples (Codes)	Chlorogenic acid (mg/g)	Luteolin-7-O-glucoside (mg/g)	Ratio ¹⁾
ES-PGL	73.42±1.42 ²⁾	75.74±1.38	1.03
EF-PGL	78.08±2.87	100.93±3.06	1.29

¹⁾ Ratio of luteolin-7-O-glucoside to chlorogenic acid.

²⁾ Mean±S.D. (n=3).

ES-PGL: ethanol extract of *Platycodon grandiflorum* leaves (PGL) harvested in spring, EF-PGL: ethanol extract of PGL harvested in fall.

물(ES-PGL)보다는 가을에 채취한 도라지 잎 추출물(EF-PGL)에서 luteolin-7-O-glucoside가 3.3% 정도 더 많이 함유된 것으로 나타났다. 본 연구에서 분석한 2종의 주요 성분 중 luteolin-7-O-glucoside는 Mazol 등(2004)이 폴란드 도라지 식물 지상부의 분석에서 luteolin-7-O-glucoside를 주성분으로 보고한 결과와 일치하는 것으로 평가되었고 함량에서는 건조 중량 단위 g당 7.06 mg으로 보고되었다. 또한, Jeong 등(2010)은 도라지 지상부의 부탄을 분획에서 apigenin-7-O-glucoside와 luteolin-7-O-glucoside를 주성분으로 분석하였고 부탄을 분획의 건조 중량을 기준으로 각각 19.9 mg/g과 23.0 mg/g으로 보고하였다. 싹(Kim 등 2020)에서와 씨(inada 등 1992)에서는 luteolin-7-O-glucoside가 관찰되지 않았고 Wang 등(2017)의 보고에서는 잎보다 뿌리와 씨에서 luteolin-7-O-glucopyranoside를 관찰한 것으로 보고하였다.

2. 마우스 유래 대식세포에서 에탄올 추출물의 항염작용

염증을 야기시키는 매개체들 중에는 cytokines, nitrite와 PGE2 등이 있는데 cytokines 중 IL-6는 조직 손상이나 병원체에 대해 즉각적으로 생성 분비되어 염증 유발을 매개하며 (Tanaka 등 2014), nitrite는 병원체를 사멸시키고 혈관벽의 투과성을 증가시켜 백혈구의 조직이동을 촉진시키며(Ji 등 2004), PGE2도 혈관을 이완시켜 염증기전을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Kang 등 2000). IL-6, nitrite와 PGE2는 대식세포에서 생성 분비되므로 도라지 잎 추출물의 염증억제 효과를 측정하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 사용하여 염증 매개체들을 평가하였다.

RAW 264.7 세포에서 에탄올 추출물의 처리 농도를 결정하기 위해 세포 생존율을 관찰하였고 Fig. 2A에 제시하였다. ES-PGL과 EF-PGL을 각각 0.50 mg/mL까지 세포에 처리하였고 모든 농도에서 에탄올 추출물은 세포 생존율에 영향을 주지 않았다. 따라서 항염효과 검증을 위하여 0.50 mg/mL를 최고농도로 하고 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL 농도에서 항염효과를 측정하였다. 대식세포에서 생성되고 분비되는 nitrite, IL-6 및 PGE2를 세포 배양액에서 측정한 결과를 Fig. 3에 제시하였다. LPS는 nitrite 생성을 유도하였고 에탄올 추출물 세 농도

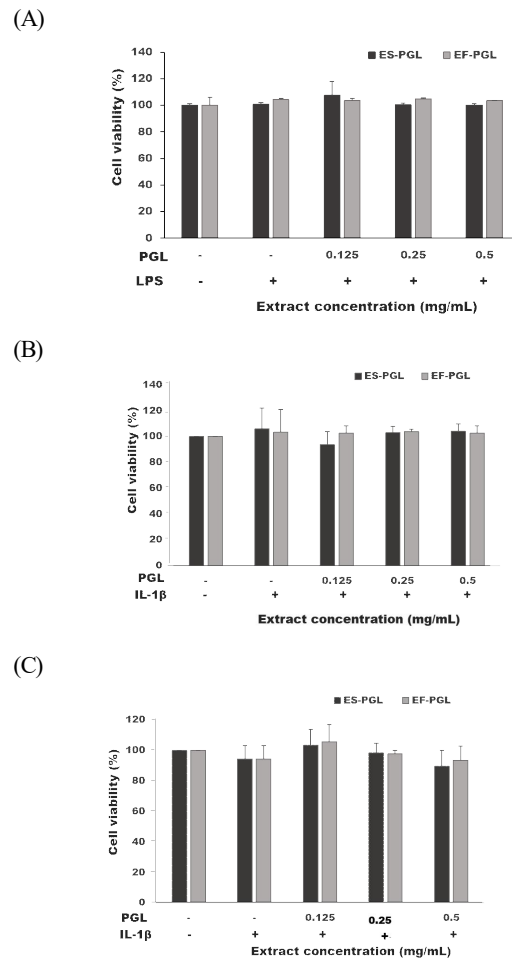


Fig. 2. Effects of the ethanol extracts on the cell viabilities. (A) RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of the extracts of PGL (*Platycodon grandiflorum* leaves) and stimulated with LPS (100 ng/mL), and (B) NCI-H292 & (C) A549 cells treated with the extract of PGL and stimulated with IL-1 β (10 ng/mL). Cell viabilities were analyzed by EZ-Cytox and data are presented as mean±S.D. (n=3). ES-PGL: ethanol extract of PGL harvested in spring, EF-PGL: ethanol extract of PGL harvested in fall.

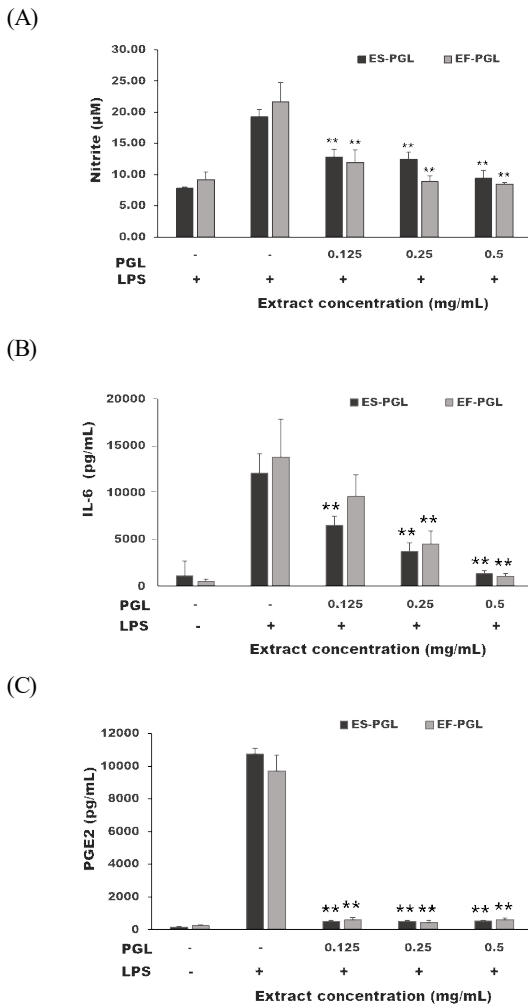


Fig. 3. Effects of ethanol extracts on the levels of nitrite, IL-6 and PGE2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of the extracts of PGL (*Platycodon grandiflorum* leaves) and stimulated with LPS (100 ng/mL). (A) Nitrite, (B) IL-6 and (C) PEG2 were analyzed by ELISA kits and data are presented as mean±SD (n=3). Ethanol extract treatment groups were compared with LPS-stimulated group without extract treatment by Dunnet *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01). ES-PGL: ethanol extract of PGL harvested in spring, EF-PGL: ethanol extract of PGL harvested in fall.

에서 모두 LPS에 의해 유도된 nitrite 생성을 통계 유의적 (*p*<0.01)으로 억제하였으며 농도 의존적이었다(Fig. 3A). 염증성 사이토카인 IL-6의 생성은 LPS 처리로 유도되어 12,800~14,300 pg/mL까지 증가하였고 에탄올 추출물 0.25, 0.5 mg/mL 농도에서 통계 유의적(*p*<0.01)으로 감소하였으며 농도 의존적이었다(Fig. 3B). PGE2 생성은 LPS에 의해 증가하

였고 에탄올 추출물 모든 농도에서 통계 유의적(*p*<0.01)으로 억제되었다(Fig. 3C). 봄잎 추출물과 가을잎 추출물의 차이는 크게 관찰되지 않기 때문에 식물성장에 영향을 적게 미칠 수 있는 가을잎을 채취하여 활용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

PGE2와 nitrite 생성억제에 대한 기전을 확인하기 위하여 arachidonic acid(아라키돈산)으로부터 PGE2를 생성하는 COX-2 효소와 nitrite 생성 효소인 iNOS의 단백질 발현을 평가하였다(Kang 등 2000; Ji 등 2004). 세포 용해액을 사용하여 웨스턴 블롯으로 COX-2와 iNOS 효소의 단백질 발현을 평가하였고 그 결과를 Fig. 4A 웨스턴 블롯 이미지로 제시하였다. COX-2 효소는 LPS에 의해 발현이 유도되어 증가하였고 에탄올 추출물에 의해 감소하였으며, COX-2의 발현정도를 β-actin의 상대적인 발현으로 수치화하였을 때 봄잎 추출물 (*p*<0.01)에 의한 감소가 가을잎 추출물(*p*<0.05)보다 통계 유의성이 높았다(Fig. 4B). LPS에 의해 iNOS의 발현이 증가하였고 에탄올 추출물에 의해 감소하였으며(Fig. 4A) 거의 발현되지 않아 수치화하지 않았다. 도라지 잎 에탄올 추출물에 의한 PGE2 생성의 감소는 COX-2 발현 조절 작용에 의한 것으로 판단되며 nitrite 생성의 감소는 iNOS 발현 감소에 따른 것으로 사료된다.

3. 인체 유래 폐암세포에서 에탄올 추출물의 항염작용

인체 기관지 상피세포(bronchial epithelial) 유래의 NCI-H292 세포와 폐포 상피세포(alveolar epithelial) 유래의 선암종(adenocarcinoma) A549 세포를 사용하였다. NCI-H292는 염증 유발 물질에 노출 시 사이토카인들과 점액을 생성하여 분비하므로 항염작용 및 점액 생성 관련 연구에 사용되고 있으며(Hulina-Tomašević 등 2019), A549는 폐포의 type II 상피세포 모델로 암에 의한 염증 그리고 바이러스에 의한 염증 유발 모델로 사용되며 IL-1β에 의해 전염증성 cytokine들의 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Boost 등 2008). 두 세포에 대한 에탄올 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였고 결과를 Fig. 2B, Fig. 2C에 각각 제시하였다. 에탄올 추출물은 봄잎과 가을잎 추출물 모두 0.5 mg/mL까지 처리하였고 두 세포의 생존율에 영향을 주지 않았다. 폐암 세포에 대한 항염작용을 관찰하기 위하여 IL-1β를 염증 유도제로 사용하였고 전염증성 사이토카인 IL-6와 IL-8을 측정하였다. NCI-H292 세포에서 IL-1β는 IL-6와 IL-8의 생성을 각각 유도하였고 에탄올 추출물의 세 농도에서 모두 IL-6 생성이 통계 유의적(*p*<0.05 또는 *p*<0.01)으로 감소하였으며 농도 의존적 경향을 보였다(Fig. 5A). IL-8 생성은 봄 잎 추출물의 0.5 mg/mL에서 통계 유의적(*p*<0.05)으로 억제되었다(Fig. 5B).

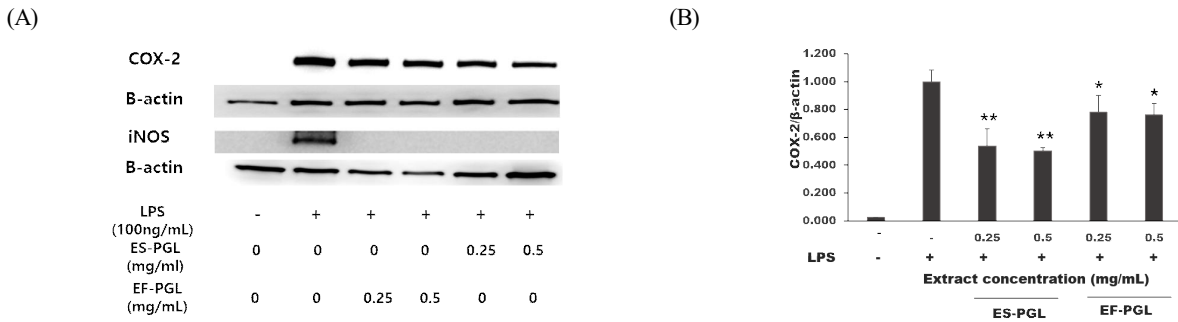


Fig. 4. Effects of ethanol extracts on the protein expressions of COX-2 and iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of the extracts of PGL (*Platycodon grandiflorum* leaves) and stimulated with LPS (100 ng/mL). Western blot analysis of cell lysates showed the protein expressions of COX-2 and iNOS. (A) Representative image of western blot and (B) the relative expression levels of COX-2 protein were normalized as an internal protein of β -actin. Data are presented as mean \pm S.D. (n=3). Ethanol extract treatment groups were compared with LPS-stimulated group without extract treatment by Dunnet *t*-test (* p <0.05, ** p <0.01). ES-PGL: ethanol extract of PGL harvested in spring, EF-PGL: ethanol extract of PGL harvested in fall.

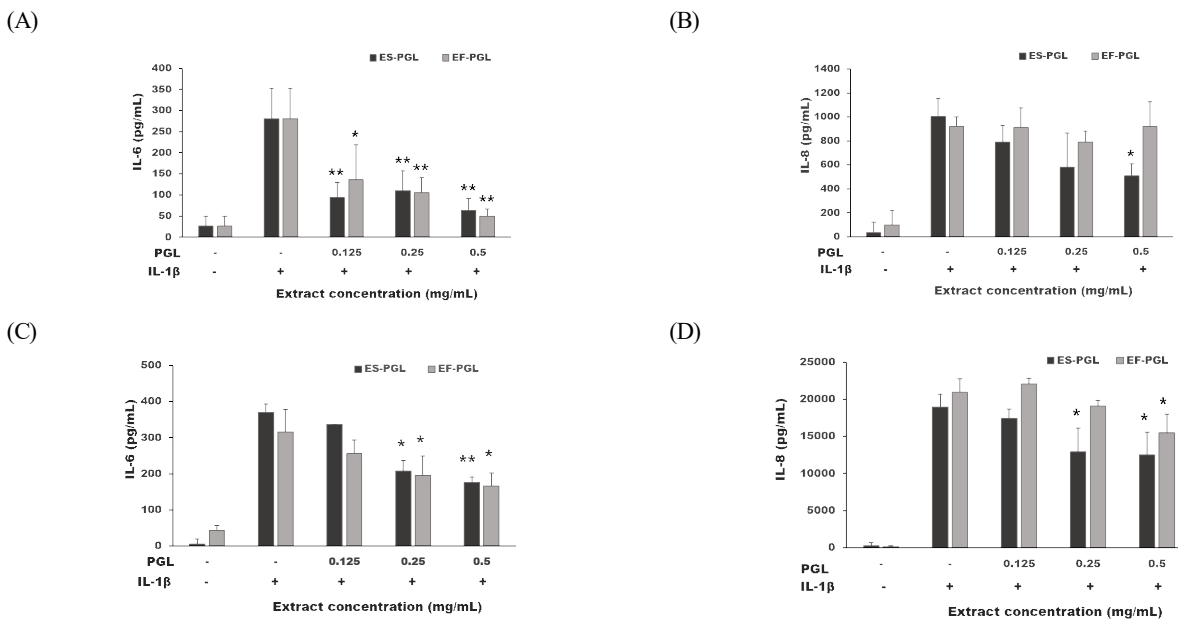


Fig. 5. Inhibitory effects of ethanol extracts on cytokines productions. NCI-H292 & A549 cells were treated with the extracts of PGL (*Platycodon grandiflorum* leaves) and stimulated with IL-1 β (10 ng/mL). The levels of (A) IL-6 & (B) IL-8 in NCI-H292 cells, and (C) IL-6 & (D) IL-8 in A549 cells were evaluated using ELISA kits and data are presented as mean \pm S.D. (n=3). Data are Ethanol extract treatment groups were compared with IL-1 β -stimulated group without extract treatment by Dunnet *t*-test (* p <0.05; ** p <0.01). ES-PGL: ethanol extract of PGL harvested in spring, EF-PGL: ethanol extract of PGL harvested in fall.

A549 세포에서도 IL-1 β 는 IL-6와 IL-8의 생성을 각각 유도하였고 에탄올 추출물은 0.25, 0.5 mg/mL 농도에서 IL-6를 각각 통계 유의적(p <0.05 또는 p <0.01)으로 감소시켰으며 농도 의존적인 경향을 나타냈다(Fig. 5C). IL-8 생성억제 정도는 봄잎

추출물의 0.25, 0.5 mg/mL에서, 가을잎 추출물의 0.5 mg/mL에서 각각 통계 유의적(p <0.05)으로 관찰되었다(Fig. 5D).

IL-1 β 는 세포막 수용체(IL-1R)에 결합하여 세포내로 신호를 전달하며 IKK(I-kappa-B kinase) 또는 MAPKases(mitogen-

activated protein kinases)를 통하여 전사인자를 활성화시켜 염증 매개체들의 전사 및 발현을 촉진하는 것으로 보고되었다. MAPKases는 3종 즉 ERK, JNK, p38이 알려져 있으며 각각 인산화를 통해 활성화된다(Behl 등 2021). 본 연구에서는 도라지 잎 추출물의 전염증성 cytokines 억제 작용이 신호전달 체계의 ERK와 JNK의 인산화 활성화와 관련이 있는지 평가하였다. NCI-H292 세포에서 ERK와 JNK 단백질의 인산화를 웨스턴 블롯으로 평가하였고 그 결과, 웨스턴 블롯 결과는 Fig. 6A, Fig. 6C)에 각각 제시하였으며 IL-1 β 에 의해 유도된 인산화정도를 100으로 하여 상대적인 인산화 정도를 Fig. 6B, Fig. 6D)에 각각 제시하였다. IL-1 β 는 ERK 단백질의 인산화(p-ERK/ ERK)를 증가시켰고 에탄올 추출물은 ERK의 인산화를 유의적($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$)으로 감소시켰다(Fig. 6B). JNK의 인산화는 IL-1 β 에 의해 유도되었고 에탄올 추출물에 의해 감소하는 경향은 보이나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig.

6D). 따라서, 도라지 잎의 에탄올 추출물은 MAPKases 경로 중 ERK의 인산화를 통해 신호를 전달하는 것으로 관찰되었다.

일상에서 섭취하는 식물들은 다양한 종류의 폴리페놀 화합물들을 함유하고 있으며 많은 종류의 폴리페놀 물질들은 항산화 효과 및 항염효과가 있는 것으로 알려져 있다(Biesalski HK 2007). 플라보노이드는 폴리페놀 물질의 한 형태로 10,000종이 넘는 플라보노이드 물질들이 식물에서 발견되었고, 소량으로도 특별한 기능을 나타내기 때문에 그 특성에 관한 연구들이 활발히 수행되고 있다(Caporali 등 2022). 이러한 플라보노이드는 radical oxygen species(ROS)와 radical nitrogen species(RNS)의 생성을 억제하는 항산화 활성을 나타내며 nitric oxide와 전염증성 사이토카인들을 억제하는 항염효과와 관련이 있어서 주목을 받고 있으며(Leyva-López 등 2016) 대표적인 플라보노이드로는 quercetin, wogonin, catechin, naringin, daidzine, genistine, cyanidin, luteolin, apigenin 등이 있

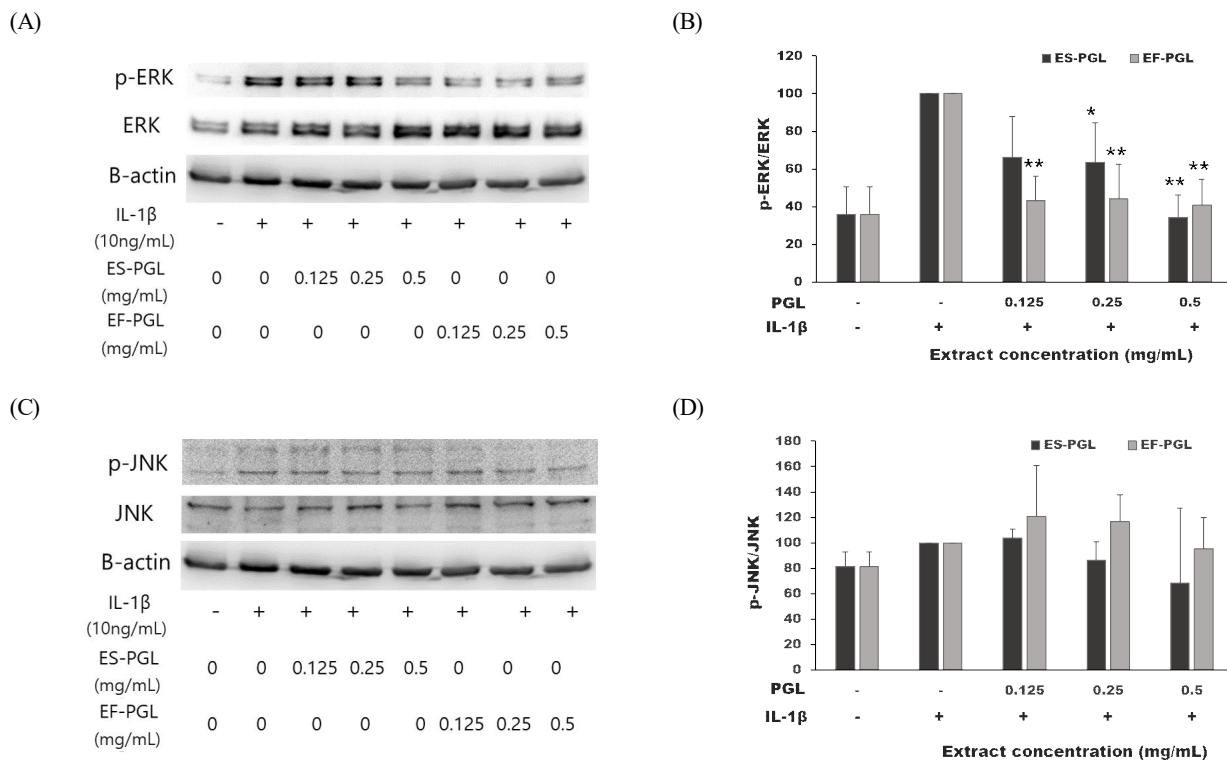


Fig. 6. Inhibitory effects of ethanol extracts on the phosphorylation of MAPK signaling proteins. NCI-H292 were treated with the extracts of PGL (*Platycodon grandiflorum* leaves) and stimulated with IL-1 β (10 ng/mL). Western blot analysis of cell lysates showed the expression levels of the phosphorylated or unphosphorylated MAPK signaling proteins. Representative images of western blots of (A) p-ERK & ERK and (C) p-JNK & JNK are presented and phosphorylated signals of (B) ERK & (D) JNK were normalized to unphosphorylated forms and expressed as a ratio to IL-1 β -stimulated group without extract. Data are presented as mean \pm S.D. (n=3). Ethanol extract treatment groups were compared with IL-1 β -stimulated group without extract by Dunnett *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). ES-PGL, ethanol extract of PGL harvested in spring; EF-PGL, ethanol extract of PGL harvested in fall.

다(Chahar 등 2011; Jeon & Kim 2011; Douglas 등 2013; Kozłowska & Szostak-Wegierek 2014; Leo & Woodman 2015; Panche 등 2016). 본 연구에서 에탄올 추출물의 주성분인 luteolin-7-O-glucoside는 flavonoids 중 flavones에 속하는 물질로서 luteolin 구조에서 7번 위치의 산소에 배당체가 결합된 형태로 설치류 또는 인체의 소장에서 장내 미생물의 β -glucosidase에 의해 가수 분해되어 luteolin(비배당체)으로 흡수되는 것으로 보고되었다(Shimoi 등 1998). 흡수된 luteolin은 소장세포에서 다시 glucuronide/sulfate와 결합하여 혈액으로 이동하는 것으로 관찰되었으며(Wittemer 등 2005), 몇몇 논문에서는 luteolin-7-O-glucoside의 배당체 형태로도 일부 흡수되며(Andlauer 등 2000), 비배당체와 체내 이용률은 다르지 않다고 보고하였다(Zubik & Meydani 2003).

Luteolin에 관한 다양한 연구들이 보고되었는데 대표적인 효능은 항염효능으로 인체 mast cell, 설치류 mast cell, macrophage cell, microglial cell, cardiomyocytes, 인체 synovial sarcoma cell, umbilical vein endothelial cell, retinal pigment epithelial cell, glioblastoma cell 등에서 염증 관련 중간 매개체들에 영향을 주는 것으로 보고되었다(Seelinger 등 2008; Nabavi 등 2015; Aziz 등 2018; Caporali 등 2022). 급성 폐 손상 ICR mice(Li 등 2012), COPD mice(Li 등 2023), 신장 손상 Balb/cN mice(Domitrović 등 2013), 알코올 유도 간손상 C57BL/6 mice(Rafacho 등 2015), 심각한 췌장 손상 ICR mice(Xiong 등 2017), 알츠하이머 마우스 모델(Kou 등 2022)에서 항염효과가 관찰되었다. 최근 보고된 luteolin-7-O-glucoside에 관한 효능연구는 De Stefano 등(2021)이 인체 유래 HUVEC 세포에서 ROS와 전염증성 사이토카인을 감소시켜 콜레스테롤의 수산화와 지질 축적을 억제하였고 결과적으로 동맥경화와 심혈관에 긍정적인 영향을 확인하였고 STAT3 기전을 억제함으로써 나타나는 효과임을 제시하였다. Palombo 등(2016)은 건선모델 마우스의 피부 표피세포(keratinocytes)에서 luteolin-7-O-glucoside가 IL-22/STAT3 기전을 억제하여 흑색극세포증(acanthosis)과 염증을 억제하는 것으로 보고하였다. Jin 등(2011)은 luteolin-7-O-glucoside가 마우스 골수 유래의 mast cells에서 MAPKases와 phospholipase C γ 1의 인산화를 억제하여 leukotriene C 생성과 탈과립화를 감소시키는 것을 관찰하였다. Palombo 등(2019)은 luteolin-7-O-glucoside가 표피세포 내에서 HEK2와 상호작용하여 에너지 생성을 감소시키는 것으로 보고하였다. Luteolin-7-O-glucoside와 luteolin의 비교 연구에서는 RAW 264.7 세포에 처리했을 때, 강력한 항산화효과가 heme oxygenase-1(HO-1)를 매개체로 하는 기전으로 보고하였고(Song & Park 2014), 또한 항염효과 기전(Park & Song 2013)에 있어서 luteolin은 전사인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성을 억제하고, 반면에 luteolin-7-O-glucoside는

NF- κ B의 활성을 억제하는 것으로 평가하였다. GalN/LPS에 의해 유도된 간염에서 염증매개체 억제 효과는 luteolin이 더 강력하고 2단계 효소 조절능은 luteolin-7-O-glucoside가 더 강력한 것으로 보고하였다(Park & Song 2019). 또한, Luteolin은 독성이 없는 물질로 마우스 경구투여 시 LD₅₀가 2,500 mg/mL 보다 큰 안전한 물질로 보고되었고(Aziz 등 2018) 유전독성을 유발하지 않으며(Czeczot 등 1990) 오히려 유전독성을 억제하는 물질로 평가되고 있으므로(Horváthová 등 2005) luteolin-7-O-glucoside도 유사한 안전성을 나타낼 것으로 예측된다.

최근 27종의 유통채소류에서 플라보노이드 성분의 분석 결과에 따르면 luteolin과 luteolin-7-O-glucoside가 풍부한 식물로 고추잎, 민들레, 샐러리 등을 보고하였고(Kang 등 2021), Hu & Kitts(2004)는 민들레속 식물의 에틸아세테이트 분획을 분석한 결과에서 luteolin이 25.2±0.6 mg/g(2.5%)과 luteolin-7-O-glucoside은 83.3±0.2 mg/g(8.3%)으로 함유량을 보고하였다. 에틸아세테이트 분획에 chlorogenic acid(4.8%)와 caffeic acid(0.7%)가 함유된 것으로 제시하였고 각각의 주요 성분에 대한 표준물질의 nitric oxide의 항염효과도 측정하였는데 chlorogenic acid와 caffeic acid는 100 μ M 농도까지 nitric oxide 억제 효과가 관찰되지 않았고 luteolin과 luteolin-7-O-glucoside는 10 μ M에서 각각 91.8%, 102.4% 억제 효과가 나타난 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 도라지 잎의 에탄올 추출물에 luteolin-7-O-glucoside가 평균적으로 7.6%(봄 잎) 또는 10%(가을 잎) 함유된 것으로 평가되었고, 민들레속 식물의 에틸아세테이트 분획에 버금가는 용량이므로 도라지 잎의 유용성이 더 클 것으로 기대된다. 본 연구에서도 도라지 잎 에탄올 추출물에 chlorogenic acid와 luteolin-7-O-glucoside의 함량과 동일한 농도의 표준물질로 항염효능을 평가한 결과 RAW 264.7 세포에서 chlorogenic acid에 의한 nitrite의 억제효과는 관찰되지 않았고 luteolin-7-O-glucoside에 의한 억제효과가 관찰되었으며 RAW 264.7 세포에서 두 물질을 혼합하여 처리하였을 때도 synergistic effect는 관찰되지 않았다(결과는 제시하지 않음).

본 연구에서 도라지 잎의 주성분으로 확인된 chlorogenic acid는 폴리페놀 물질 중 페놀산(henolic acid)으로 항산화력과 항염효능이 탁월하여 산화적 스트레스 또는 염증으로 인한 심장과 뇌 질환을 완화하고 심혈관 및 뇌혈관을 보호하는 작용이 있는 것으로 보고하였다. 항염효과는 염증과 관련된 다양한 동물 모델 및 염증 유발 세포 모델에서 연구되었고 LPS로 유도된 마우스 대식세포에서 iNOS 발현억제에 의한 NO 감소효과 및 바이러스 또는 화학물질 유도 장염 모델에서 전염증성 사이토카인(IL-6, IL-1 β , TNFF- α)의 감소가 관찰되었다. 이러한 항염효과는 I κ B와 NF- κ B의 인산화 억제 기

전 또는 MAPK/ERK/JNK의 인산화 억제 기전을 통해 전염증성 사이토카인들의 전사발현이 감소되어 염증이 완화되는 것으로 설명하였다(Santana-Gálvez 등 2017; Gao 등 2019; Huang 등 2023). 그러나 chlorogenic acid는 구조적으로 안정성이 낮아 빠르게 산화되며 생체이용률도 낮아서 활용하는 데 문제가 되기 때문에 liposome, micelle, nanoparticle들을 사용하여 생체이용률을 높이는 연구들이 수행되고 있다(Mortelé 등 2021; Trivedi & Puranik 2023). 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO가 chlorogenic acid에 의해 감소되는 결과도 있지만, 영향을 주지 않는 결과도 보고되었는데(Wang & Mazza 2002), chlorogenic acid에 처리 농도가 다르기 때문으로 판단된다. Shan 등(2009)은 37.5 µg/mL(105.8 µM)까지 처리하였고 COX-2 mRNA 발현은 감소하였으나 iNOS mRNA 발현과 NO에는 영향을 주지 않았다. 또한, Kim 등(2017)의 보고에서는 0.05~2 mM로 chlorogenic acid를 LPS로 유도된 대식세포에서 0.5 mM에서부터 NO와 iNOS mRNA 발현이 감소하기 시작하는 것으로 나타났다. 민들레속 식물에서는 100 µM까지 NO에 영향을 주지 않았고 본 연구에서도 0.5 mg/mL 에탄올 추출물에 chlorogenic acid 함량은 36.5 µg/mL로 산출되므로 에탄올 추출물 0.5 mg/mL까지의 농도에서는 chlorogenic acid 보다는 luteolin-7-O-glucoside에 의한 항염효과로 예측된다. 그러나, 주요 성분과 추출물의 비교연구가 추가적으로 필요한 것으로 판단되며, 도라지 뿌리에서 항염증 성분으로 알려진 사포닌 계통의 성분들이 지상부에도 함유된 것으로 보고되므로(Lee 등 2015) 잎 추출물에서 사포닌 계통의 성분들에 대한 분석도 필요한 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 도라지 식물(*Platycodon grandiflorum*)의 잎을 사용하여 에탄올 추출물을 제조하고 주요 성분을 분석하고 항염효과를 검증하기 위해 수행하였다. HPLC 분석을 통해 chlorogenic acid와 luteolin-7-O-glucoside이 에탄올 추출물의 주요 성분임을 확인하였다. 에탄올 추출물의 항염효과는 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)와 인체 유래 폐암 세포(NCI-H292 & A549)에서 검증하였다. 에탄올 추출물은 LPS로 처리된 RAW 264.7 cells에서 nitrite, IL-6, PGE2의 생성을 통계 유의적($p < 0.01$)으로 감소시켰다. LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서 iNOS(inducible NO synthase)와 COX-2(cyclooxygenase-2) 효소 발현이 에탄올 추출물 처리에 의해 감소하였다. NCI-H292 and A549 cells에서 IL-1 β 는 전염증성 사이토카인 IL-6와 IL-8의 생성을 증가시켰고, 에탄올 추출물은 통계 유의적($p < 0.05$)으로 감소시켰다. 에탄올 추출물은 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 중 JNK 보다는 ERK의 인산화를 통해 전

염증성 사이토카인을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 따라서, 본 연구를 통해 luteolin-7-O-glucoside가 다량 함유된 도라지 잎의 추출물은 마우스 대식세포의 염증 유발을 억제하고 인체 유래 폐암 세포에서도 염증을 감소시키는 탁월한 항염효과가 확인되어 지속적인 기전연구 및 안전성평가연구 등이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 중소벤처기업부 창업성장기술개발사업 전략형 창업과제(Big3, S287589) 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 2022년도 호서대학교 연구년 결과물로 제출됩니다.

References

- Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SS, Kim YS. 2005. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci* 76:2315-2328
- Andlauer W, Kolb J, Fürst P. 2000. Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine. *J Nutr* 130:3021-3027
- Aziz N, Kim MY, Cho JY. 2018. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *J Ethnopharmacol* 225:342-358
- Bailly C, Vergoten G. 2020. Proposed mechanisms for the extracellular release of PD-L1 by the anticancer saponin platycodin D. *Int Immunopharmacol* 85:106675
- Behl T, Upadhyay T, Singh S, Chigurupati S, Alsubayiel AM, Mani V, Vargas-De-La-Cruz C, Uivarosan D, Bustea C, Sava C, Stoicescu M, Radu AF, Bungau SG. 2021. Polyphenols targeting MAPK mediated oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis. *Molecules* 26:6570
- Biesalski HK. 2007. Polyphenols and inflammation: Basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:724-728
- Boost KA, Sadik CD, Bachmann M, Zwissler B, Pfeilschifter J, Mühl H. 2008. IFN-gamma impairs release of IL-8 by IL-1beta-stimulated A549 lung carcinoma cells. *BMC Cancer* 8:2656
- Caporali S, De Stefano A, Calabrese C, Giovannelli A, Pieri M, Savini I, Tesaro M, Bernardini S, Minieri M, Terrinoni A. 2022. Anti-inflammatory and active biological properties of the plant-derived bioactive compounds luteolin and luteolin

- 7-glucoside. *Nutrients* 14:1155
- Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev* 5:1-12
- Czczot H, Tudek B, Kusztelek J, Szymczyk T, Dobrowolska B, Glinkowska G, Malinowski J, Strzelecka H. 1990. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutat Res* 240:209-216
- De Stefano A, Caporali S, Di Daniele N, Rovella V, Cardillo C, Schinzari F, Minieri M, Pieri M, Candi E, Bernardini S, Tesaro M, Terrinoni A. 2021. Anti-inflammatory and proliferative properties of luteolin-7-O-glucoside. *Int J Mol Sci* 22:1321
- Domitrović R, Cvijanović O, Pugel EP, Zagorac GB, Mahmutefendić H, Škoda M. 2013. Luteolin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of platinum accumulation, inflammation and apoptosis in the kidney. *Toxicology* 310:115-123
- Douglas CC, Johnson SA, Arjmandi BH. 2013. Soy and its isoflavones: The truth behind the science in breast cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 13:1178-1187
- Gao W, Wang C, Yu L, Sheng T, Wu Z, Wang X, Zhang D, Lin Y, Gong Y. 2019. Chlorogenic acid attenuates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice through MAPK/ERK/JNK pathway. *BioMed Res Int* 2019:6769789
- Ha YW, Kim YS. 2009. Preparative isolation of six major saponins from Platycodi Radix by high-speed counter-current chromatography. *Phytochem Anal* 20:207-213
- Horváthová K, Chalupa I, Šebová L, Tóthová D, Vachálková, A. 2005. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. *Mutat Res* 565:105-112
- Hu C, Kitts DD. 2004. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol Cell Biochem* 265:107-113
- Huang J, Xie M, He L, Song X, Cao T. 2023. Chlorogenic acid: A review on its mechanisms of anti-inflammation, disease treatment, and related delivery systems. *Front Pharmacol* 14:1218015
- Hulina-Tomašković A, Grdić Rajković M, Jelić D, Bosnar M, Sladoljev L, Žanić Grubišić T, Rumora L. 2019. Pro-inflammatory effects of extracellular Hsp70 on NCI-H292 human bronchial epithelial cell line. *Int J Exp Pathol* 100: 320-329
- Inada A, Murata H, Somekawa M, Nakanishi T. 1992. Phytochemical studies of seeds of medicinal plants II. A new dihydroflavonol glycoside and a new 3-methyl-1-butanol glycoside from seeds of *Platycodon grandiflorum* A. DE CANDOLLE. *Chem Pharm Bull* 40:3081-3083
- Jeon YS, Kim MW. 2011. The antioxidative effects and isolation and characterization of the extracts from *Morus alba* L. *Korean J Food Nutr* 24:94-100
- Jeong CH, Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Kim DO, Kim YJ, Heo HJ. 2010. Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*. *Food Chem* 118:278-282
- Ji JD, Lee YH, Song GG. 2004. Prostaglandin E₂ (PGE₂): Roles in immune responses and inflammation. *J Rheum Dis* 11:307-316
- Ji MY, Bo A, Yang M, Xu JF, Jiang LL, Zhou BC, Li MH. 2020. The pharmacological effects and health benefits of *Platycodon grandiflorus*: A medicine food homology species. *Foods* 9:142
- Jin M, Son KH, Chang HW. 2011. Luteolin-7-O-glucoside suppresses leukotriene C₄ production and degranulation by inhibiting the phosphorylation of mitogen activated protein kinases and phospholipase C γ 1 in activated mouse bone marrow-derived mast cells. *Biol Pharm Bull* 34:1032-1036
- Jung JI, Lee HS, Kim SM, Kim S, Lim J, Woo M, Kim EJ. 2022. Immunostimulatory activity of hydrolyzed and fermented *Platycodon grandiflorum* extract occurs via the MAPK and NF- κ B signaling pathway in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract* 16:685-699
- Kang JM, Yeo SW, Lee HY, Chang KH, Suh BD. 2000. Effect of antioxidants and dexamethasone on inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in murine macrophage cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 43:136-142
- Kang KJ, Kim BH, Kim DH, Yun HJ, Cho YS, Han NE, Choi JC, Lee SN, Choi OK. 2021. Determination of the contents of apigenin and luteolin in vegetables. *Korean J Food Nutr* 34:233-241
- Kim M, Hwang IG, Kim SB, Choi AJ. 2020. Chemical characterization of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) sprout extracts and their regulation of inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. *Food Sci Nutr* 8:246-256
- Kim SH, Park SY, Park YL, Myung DS, Rew JS, Joo YE. 2017. Chlorogenic acid suppresses lipopolysaccharide-induced

- nitric oxide and interleukin-1 β expression by inhibiting JAK2/STAT3 activation in RAW264.7 cells. *Mol Med Rep* 16:9224-9232
- Kou JJ, Shi JZ, He YY, Hao JJ, Zhang HY, Luo DM, Song JK, Yan Y, Xie XM, Du GH, Pang XB. 2022. Luteolin alleviates cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model via inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent neuroinflammation. *Acta Pharmacol Sin* 43:840-849
- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. 2014. Flavonoids-food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig* 65:79-85
- Lee JW, Ji SH, Kim GS, Song KS, Um Y, Kim OT, Lee Y, Hong CP, Shin DH, Kim CK, Lee SE, Ahn YS, Lee DY. 2015. Global profiling of various metabolites in *Platycodon grandiflorum* by UPLC-QTOF/MS. *Int J Mol Sci* 16:26786-26796
- Lee JY. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Platycodon grandiflorum* leaves. Master's Thesis, Hoseo Univ. Asan. Korea
- Leo CH, Woodman OL. 2015. Flavonols in the prevention of diabetes-induced vascular dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 65:532-544
- Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez, DL, Heredia JB. 2016. Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *Int J Mol Sci* 17:17060921
- Li M, Wang H, Lu Y, Cai J. 2023. Luteolin suppresses inflammation and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease through inhibition of the NOX4-mediated NF- κ B signaling pathway. *Immun Inflamm Dis* 11:e820
- Li T, Xu WS, Wu GS, Chen XP, Wang YT, Lu JJ. 2014. Platycodin D induces apoptosis, and inhibits adhesion, migration and invasion in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:1745-1749
- Li W, Liu Y, Wang Z, Han Y, Tian YH, Zhang GS, Sun YS, Wang YP. 2015. Platycodin D isolated from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum* protects alcohol-induced liver injury in mice. *Food Funct* 6:1418-1427
- Li YC, Yeh CH, Yang ML, Kuan YH. 2012. Luteolin suppresses inflammatory mediator expression by blocking the Akt/NF κ B pathway in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:383608
- Mazol I, Gleńsk M, Cisowski W. 2004. Polyphenolic compounds from *Platycodon grandiflorum* A. DC. *Acta Pol Pharm* 61:203-208
- Mortelé O, Jörisen J, Spacova I, Lebeer S, van Nuijs ALN, Hermans N. 2021. Demonstrating the involvement of an active efflux mechanism in the intestinal absorption of chlorogenic acid and quinic acid using a Caco-2 bidirectional permeability assay. *Food Funct* 12:417-425
- Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem* 122:987-996
- Nabavi SF, Braidy N, Gortzi O, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, Skalicka-Woźniak K, Nabavi SM. 2015. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Res Bull* 119:1-11
- Palombo R, Caporali S, Falconi M, Iacovelli F, Morozzo Della Rocca B, Lo Surdo A, Campione E, Candi E, Melino G, Bernardini S, Terrinoni A. 2019. Luteolin-7-O- β -D-glucoside inhibits cellular energy production interacting with HEK2 in keratinocytes. *Int J Mol Sci* 20:2689
- Palombo R, Savini I, Avigliano L, Madonna S, Cavani A, Albanesi C, Mauriello A, Melino G, Terrinoni A. 2016. Luteolin-7-glucoside inhibits IL-22/STAT3 pathway, reducing proliferation, acanthosis, and inflammation in keratinocytes and in mouse psoriatic model. *Cell Death Dis* 7:e2344
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* 5:e47
- Park CM, Song YS. 2013. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract* 7:423-429
- Park CM, Song YS. 2019. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside protect against acute liver injury through regulation of inflammatory mediators and antioxidative enzymes in GalN/LPS-induced hepatic ICR mice. *Nutr Res Pract* 13: 473-479
- Rafacho BPM, Stice CP, Liu C, Greenberg AS, Ausman LM, Wang XD. 2015. Inhibition of diethylnitrosamine-initiated alcohol-promoted hepatic inflammation and precancerous lesions by flavonoid luteolin is associated with increased sirtuin 1 activity in mice. *Hepatobiliary Surg Nutr* 4:124-134
- Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. 2017. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules* 22:358
- Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. 2008. Anti-oxidant,

- anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 74:1667-1677
- Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264. 7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9:1042-1048
- Shen Q, Zhong YT, Liu XX, Hu JN, Qi SM, Li K, Wang Z, Zhu HY, Li XD, Wang YP, Li W. 2023. Platycodin D ameliorates hyperglycaemia and liver metabolic disturbance in HFD/STZ-induced type 2 diabetic mice. *Food Funct* 14:74-86
- Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki, M, Hara Y, Yamamoto H, Kinae N. 1998. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS lett* 438:220-224
- Shin CY, Lee WJ, Lee EB, Choi EY, Ko KH. 2002. Platycodin D and D3 increase airway mucin release *in vivo* and *in vitro* in rats and hamsters. *Planta Med* 68:221-225
- Song YS, Park CM. 2014. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2/MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264.7 cells. *Food Chem Toxicol* 65:70-75
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016295
- Trivedi HR, Puranik PK. 2023. Chlorogenic acid-optimized nanophytosomes: A novel approach for enhanced permeability and oral bioavailability. *Future J Pharm Sci* 9:116
- Wang C, Zhang N, Wang Z, Qi Z, Zhu H, Zheng B, Li P, Liu J. 2017. Nontargeted metabolomic analysis of four different parts of *Platycodon grandiflorum* grown in northeast China. *Molecules* 22:1280
- Wang J, Mazza G. 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 50:850-857
- Wittermer SM, Ploch M, Windeck T, Müller SC, Drewelow B, Derendorf H, Veit M. 2005. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine* 12:28-38
- Wu J, Yang G, Zhu W, Wen W, Zhang F, Yuan J, An L. 2012. Anti-atherosclerotic activity of platycodin D derived from roots of *Platycodon grandiflorum* in human endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 35:1216-1221
- Xiong J, Wang K, Yuan C, Xing R, Ni J, Hu G, Chen F, Wang X. 2017. Luteolin protects mice from severe acute pancreatitis by exerting HO-1-mediated anti-inflammatory and antioxidant effects. *Int J Mol Med* 39:113-125
- Zhang L, Wang Y, Yang D, Zhang C, Zhang N, Li M, Liu Y. 2015. *Platycodon grandiflorus*: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol* 164:147-161
- Zubik L, Meydani M. 2003. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr* 77:1459-1465

Received 14 February, 2024

Revised 12 April, 2024

Accepted 17 April, 2024