



Anti-inflammatory and anti-*Helicobacter* effects of the *Aralia elata* hot-water extract

Se-Won Lee¹, Jeong Ho Lee^{2*}

¹Division of Biotechnology, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Korea

²Sunchang Research Institute of Health and Longevity, Sunchang 56015, Korea

두릅 열수추출물의 항염 및 항헬리코박터 효과

이세원¹ · 이정호^{2*}

¹전북대학교 생명공학부, ²(재)순창건강장수연구소

Abstract

Aralia elata contains several bioactive compounds, such as saponin, oleanolic acid, and beta-carotene, which are known widely to control blood pressure and diabetes. In this study, we investigated the anti-*Helicobacter pylori*, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic effects of the extract of *A. elata* which was procured from Sunchang-gun, South Korea. The extract was prepared using water bath at 80°C for 5 h. The total polyphenolics content in *A. elata* hot-water extract was 186.8±2.7 mgGAE/g, and the total flavonoid content was 81.9±1.5 mgQE/g. In addition, the extract exhibited anti-*Helicobacter pylori* activity and the growth of the bacteria was decreased with increasing concentration of the extract. SC₅₀ value of DPPH radical scavenging activity was 3,274.7±47.7 µg/mL, and ABTS radical scavenging activity was 2,660.1±50.3 µg/mL. Furthermore, *A. elata* hot-water extract reduced the production of nitric oxide (NO), TNF-α, IL-1β, and IL-6 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cell viability assay revealed no cytotoxicity in RAW264.7 cells even at a concentration of 100 µg/mL. The results confirmed that *A. elata* hot-water extract could be used as an antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory agent.

Key words : *Aralia elata*, *Helicobacter pylori*, antimicrobial activity, anti-inflammatory effect, pro-inflammatory cytokine

서 론

염증반응은 기본적인 면역반응으로 인체 내 대부분 기관에서 유발된다(Chae 등, 2011). 염증반응은 물리·화학적 자극이나 세균감염과 같은 외부 유해물질에 대응하기 위한 생체의 방어기작이며, 손상된 조직이나 장기를 회복시키는 역할을 한다(Lee 등, 2017). 대식세포(macrophage)는 동물 체내 모든 조직에 존재하며, 면역기능과 항상성 유지를 담당하는 세포로 유해물질, 바이러스, 세균 및 노화 세포 등을 외부로 배출시키는 역할을 하고, 염증 유발 물질이 유입되면 염증

매개 물질을 분비하여 신체를 보호하고 기능을 유지할 수 있게 한다(Kim 등, 2018; Min과 Park, 2009). 그러나 지속적인 염증반응으로 인하여 대식세포가 과도하게 반응하면 염증 매개 물질이 과발현되어 종양, 자가면역질환 및 제2형 당뇨 등 다양한 질병을 일으키는 요인이 된다(Hofseth와 Ying, 2006). 염증반응은 lipopolysaccharide(LPS), 활성산소종, 사이토카인 등을 통해 염증반응이 활성화되어 nitric oxide(NO) 및 prostaglandin E₂ 등의 염증인자나 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6)과 같은 염증성 사이토카인의 생성에 관여한다(Kim 등, 2019). NO는

*Corresponding author. E-mail : wooju1119@naver.com, Phone : +82-63-653-8708, Fax : +82-63-653-8710

Received 02 November 2020; Revised 22 December 2020; Accepted 22 December 2020.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

reactive nitrogen species(RNS)의 일종이며, O_2 과 반응하여 peroxyntirite를 생성한다(Lee와 Jeong, 2006). Peroxyntirite는 산화제로 작용하여 지질과 단백질의 과산화를 유도시키고, 세포독성을 일으킨다(Radi 등, 1991). 따라서 염증반응 억제제는 염증질환을 치료하는 데 있어 중요한 목표가 된다.

최근 우리나라의 주요 암종별 유병률은 갑상선암 21.7%, 위암 15.5%, 대장암 13.4%, 유방암 11.6%이며(Healthcare Bigdata Hub, 2018), 이 중 위암의 유병률이 높은 것은 우리나라 사람들의 서구화된 식생활 환경 등 다양한 요인이 존재하지만 *Helicobacter pylori*(*H. pylori*)와 같은 위염 원인균의 감염도 중요한 요인 중 하나이다(Park과 Kim, 2006). 만성 위염, 위궤양, 소화불량 등 소화기 질환을 일으키는 인자로 알려진 *H. pylori*의 국내 감염률은 51%이다(Ahn, 2019). *H. pylori*는 일반적으로 프로톤 펌프 억제제(proton pump inhibitor)를 기초로 하여 아목시실린(amoxicillin), 클라리트로마이신(clarithromycin) 또는 레보플록사신(levofloxacin)로 치료하는 것으로 알려져 있다(Choi 등, 2018). 그러나 삼제요법의 치료는 질병의 재발, 내성균주의 출현 및 환자의 약제 부작용 등 여러 문제를 발생시킨다(Francesco 등, 2011). 이에 따라 최근에는 로즈마리(Yoon 등, 2011), 돌나물(Choi 등, 2012), 강황(Oh 등, 2020), 소함홍탕 및 황련(Lee 등, 2014) 등 천연소재를 활용한 *H. pylori*에 대한 항균활성 연구가 증가하고 있다.

두릅(*Aralia elata*)은 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 식물로 크기는 4-5 m 정도이며, 봄철에는 새순을 식용으로 섭취하고, 뿌리는 약용으로 사용한다(Moon 등, 1999). 두릅에는 사포닌, 올리에놀산, 트라이터펜, 베타 카로틴, 아스코르브산 등의 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며(Kwon 등, 2018), 항산화 효과(Cha 등, 2009), 항고혈압 효과(Jin 등, 2017), 당뇨예방 효과(Kim 등, 2004) 등이 보고된 바 있다. 이 외에도 항염증(Lee 등, 2009), 살모넬라와 대장균의 성장 억제(Ma 등, 1996) 등에 대한 연구가 보고되어 있지만, *H. pylori*의 항균효과에 관한 보고는 찾아보기 힘든 실정이다.

이에, 본 연구에서는 두릅을 이용하여 *H. pylori*의 항균활성을 확인하고, 염증발생에 대한 억제능은 대식세포를 이용하여 NO, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 평가를 통해 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

2020년 5월 전북 순창군 농특산물 직판장에서 구매한 두릅(*Aralia elata*)은 수돗물로 수세하여 이물질을 제거하고, 2 mm 두께로 자른 후 건조기를 이용하여 60 $^{\circ}$ C에서 건조하였다. 건조한 두릅은 20 mesh에 통과할 정도로 분쇄기(Philips, HR3752/00, Amsterdam, Nederland)로 분쇄하였으며, 얻어

진 분말은 4 $^{\circ}$ C에서 저온 저장하며 실험에 사용하였다. 본 연구에서 항산화 성분 분석, 항균활성 및 항염증 활성 측정에 사용된 시약은 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), ascorbic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, quercetin, potassium persulfate($K_2S_2O_8$), amoxicillin, lipopolysaccharide(LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(PS)은 HyClone(Pittsburgh, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

두릅 추출물의 제조

건조된 두릅을 증류수로 80 $^{\circ}$ C의 water bath에서 5시간 동안 추출하였다. 추출액은 원심분리기(3,000 \times g)에서 10분간 원심분리하고, 여과지(Advantec No.2, Toyo Roshi Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 여과하였다. 여과한 추출액은 freezer (CLN-50C, Nihon freezer Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 동결한 다음 동결건조기(FD 8508, IIShin BioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)를 사용하여 -80 $^{\circ}$ C에서 동결건조하였다. 건조된 시료(수율 12.8%)는 증류수에 완전히 용해하여 시료액으로 사용하였다.

항산화성분 함량 측정

두릅 열수추출물의 총폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Singleton과 Rossi, 1965)으로 측정하였다. 농도별로 조제한 두릅 열수추출물 1 mL에 1 N Folin-Ciocalteu's reagent 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 다음, 5% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하여 암소에서 1시간 동안 반응시킨 후 분광광도계(Agilent 8453, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 분석하였다. 두릅에 함유된 총폴리페놀 함량은 gallic acid의 표준곡선(25-200 μ L/mL)을 이용하여 측정하였고, 회귀식은 $y=0.0055x-0.0318$ ($R^2=0.9969$)로 나타났으며, 총폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalent(GAE)/g으로 나타내었다.

두릅 열수추출물의 총플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법을 응용하여 측정하였다. 두릅 열수추출물 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL와 1 M potassium acetate 0.1 mL를 순차적으로 첨가한 후, ethanol 4.3 mL를 가하여 혼합하고, 40분간 실온에서 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 quercetin의 표준곡선(20-100 μ L/mL)을 이용하여 측정하였고, 회귀식은 $y=0.0014x+0.0011$ ($R^2=0.9989$)로 나타났으며, 총플라보노이드 함량은 mg quercetin(QE)/g으로 나타내었다.

항산화 활성 측정

두릅 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Blois (1958)법으로 측정하였다. 여러 농도로 조정된 시료 40 μ L와 메탄올로 제조된 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L를 96-well plate에 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd., Zurich, Switzerland)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 아래 식에 대입하여 산출하였으며, 라디칼 소거활성(%) 값을 50% 감소시키는 scavenging concentration(SC)₅₀ 값으로 표시하였으며, 대조군은 ascorbic acid을 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거활성(%) =

$$1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}} \times 100$$

두릅 열수추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 Van den Berg 등(1999)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 증류수로 제조한 7 mM ABTS 용액에 2.4 mM의 potassium persulfate를 첨가한 다음 12시간 동안 반응시키고, 734 nm에서 흡광도 1.0이 되도록 증류수로 조정하였다. 농도별로 조정된 두릅 열수추출물 10 μ L와 ABTS 용액 190 μ L를 96-well plate에 혼합하고 10분간 상온에서 반응시킨 다음 microplate reader를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 두릅 열수추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 아래 식에 대입하여 산출하였으며, 라디칼 소거활성(%) 값을 50% 감소시키는 SC₅₀ 값으로 표시하였으며, 대조군은 ascorbic acid을 사용하였다.

ABTS 라디칼 소거활성(%) =

$$1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}} \times 100$$

항균활성 측정

Helicobacter pylori(*H. pylori*) 균주는 경상대학교 의학전문대학원 헬리코박터 균주은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 균주배양은 10% FBS가 첨가된 brucella agar 배지에 균주를 접종하고, 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

두릅 열수추출물의 항균 활성은 paper disc diffusion method를 이용하여 측정하였다. 농도별로 제조된 두릅 열수추출물을 paper disc에 100 μ L씩 주입하고 30분간 건조한 다음, *H. pylori*가 도말된 brucella agar 배지에 삽입한 후 37°C,

10% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 두릅 열수추출물에 의해 생성된 clear zone을 측정하였으며, 대조군은 amoxicillin을 사용하여 두릅 열수추출물과 항균 활성을 비교하였다.

최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)의 결정

두릅 열수추출물의 *H. pylori*에 대한 최소저해농도(minimal inhibitory concentration)는 broth-microdilution method(Takarada 등, 2004)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 brucella broth 배지를 100 μ L씩 분주하고, 농도별 두릅 추출물을 50 μ L 분주한 다음 OD₆₀₀ 0.2로 조절한 균주액을 50 μ L(0.5 \times 10⁷ CFU/mL) 첨가하여 24시간 동안 37°C의 10% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 microplate reader를 이용해 600 nm에서 균주의 성장을 확인할 수 없는 농도를 MIC로 하였다. 균이 성장하지 않은 혼합액을 brucella agar 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤, colony가 확인되지 않은 최소농도를 최소사멸농도(minimal bactericidal concentration)로 결정하였다.

세포배양 및 세포생존율 측정

RAW264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 10% fetal bovine serum, 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

두릅 열수추출물의 처리에 따른 RAW264.7 대식세포의 생존율 측정은 Chamichael 등(1987)의 방법을 이용하여 측정하였다. 세포를 96-well plate에 1 \times 10⁵ cell/well로 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 농도별로 희석된 두릅 추출물을 100 μ L 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양한 후 0.5 mg/mL의 MTT 용액을 well에 50 μ L 첨가하고 4시간 동안 반응시킨 다음 용액을 제거하고 실온에서 건조하였다. 이후 DMSO 200 μ L를 첨가하여 각 well에 생성된 formazan 결정을 완전히 용해하고 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide(NO) 생성억제능 측정

두릅 열수추출물의 NO 생성억제능은 Green 등(1982)의 방법을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 24-well plate에 5 \times 10⁵ cell/well로 분주하고 24시간 배양한 후, 농도별로 제조한 두릅 시료를 세포에 2시간 처리한 다음 LPS 1 μ g/mL를 첨가하여 24시간 염증반응을 유도하였다. 이후 세포배양 상등액 100 μ L와 griess 시약(0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine과 1% sulfanilamide 1:1) 100 μ L를 새로운

96-well plate에 혼합하여 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

염증성 cytokine(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 분비량 측정

RAW264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5 cell/well이 되도록 분주하고, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 농도별로 제조한 두릅 열수추출물을 세포에 2시간 처리한 다음, 각 well에 LPS 1 μ g/mL를 처리하고 24시간 배양하였다. 이후 배양 상층액을 수거하여 실험에 사용하고, ELISA kit(ELISA MAXTM Deluxe Set, BioLegend, San Diego, CA, USA)를 이용하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비량을 측정하였다. 실험방법은 manufacturer's instruction을 따라 측정하였다.

통계처리

모든 실험의 통계처리는 통계 패키지인 Sigma plot(Sigma plot for window version 10.0, Microsoft Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 각 측정 군의 평균 \pm 표준편차를 산출하였으며, t-test를 사용하여 유의성을 $p < 0.001$, $p < 0.005$, $p < 0.01$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

총폴리페놀 함량 및 총플라보노이드 함량

식물체에 널리 분포되어 있는 식물성 polyphenol은 식물세포의 생성과 활성화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Kim, 2009). 또한, 식물이 자외선 또는 병원성 미생물의 침입을 방어하기 위해 방출하는 물질로서 phenylalanine과 tyrosine으로부터 합성되며, 항산화, 항암, 항염증, 항균 등의 효능을 갖고 있다(Kim 등, 2018). 총폴리페놀 함량은 폴리페놀 산화환원반응을 응용한 것으로 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용하였다(Singleton과 Rossi, 1965).

두릅 열수추출물의 총폴리페놀 함량과 총플라보노이드 함량을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 두릅을 80°C에서 물로 추출하였을 때, 총폴리페놀 함량은 186.8 \pm 2.7 mgGAE/g으로 나타났다. 두릅 열수추출물의 총폴리페놀 함량을 다른 식용 및 약용 식물 추출물과 비교하면, 아로니아 70% 에탄올 추출물의 117.2 mgGAE/g(Chung, 2014)보다는 높고, 돌단풍 물추출물의 183.8 mgGAE/g(Lee 등, 2011)과 비슷하였으며, 복분자 잎 물추출물의 190.7 mgGAE/g(Lee 등, 2014)보다는 낮게 나타났다. 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로 활성 산소종을 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있으며, 폴리페놀과 마찬가지로 항암, 항염증 및 항바이러스

Table 1. Total polyphenolics and flavonoid contents of *A. elata* hot-water extract

Total polyphenolics (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid (mg QE ² /g)
186.8 \pm 2.7 ³⁾	81.9 \pm 1.5

¹⁾Gallic acid equivalent.

²⁾Quercetin equivalent.

³⁾Values represent the mean \pm SD (n=3).

스 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2012). 두릅 열수추출물의 총플라보노이드 함량은 81.9 \pm 1.5 mgQE/g으로 나타내었다. 항산화능이 높다고 알려진 한방 식물류인 감초 및 오갈피나무의 플라보노이드 함량은 각각 55.3 mg QE/g, 44.0 mgQE/g으로 보고된 바 있는데(Kim 등, 2004), 두릅 열수추출물의 플라보노이드 함량이 이들 식물류보다 높은 수준이므로 항산화능이 높을 것으로 사료된다.

항산화 활성

인체 내 항산화의 불균형은 질병을 유발하게 되므로 radical scavenging activity는 항산화 시스템의 중요한 인자로서 질병 예방에 효과적이다(Reis 등, 2012). 본 연구에서 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

항산화 활성 측정에 자주 활용되고 있는 DPPH는 항산화 물질과 반응하여 anion radical이 소거되면서 보라색에서 노란색으로 변하는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정한다. 두릅 열수추출물을 312.5-10,000 μ g/mL의 농도 범위에서 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과, 19.0-73.2%의 활성을 나타내었으며 SC₅₀ 값은 3,274.7 \pm 47.7 μ g/mL로 나타났다. 대조군으로 사용된 ascorbic acid의 SC₅₀ 값인 192.2 \pm 2.1 μ g/mL를 100%로 기준하여 두릅 열수추출물의 relative activity를 환산한 결과, 5.87%에 해당하는 수준으로 나타났다.

ABTS 라디칼 소거활성 측정도 DPPH를 이용한 방법과 함께 항산화 활성을 측정하는 데 자주 이용되는 방법이다. ABTS가 항산화 물질과 반응하여 cation radical이 소거되면서 청록색에서 무색으로 변하는 원리를 이용하여 측정한다

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity of *A. elata* hot-water extract

Sample	DPPH radical SC ₅₀ ¹⁾ (μ g/mL)	ABTS radical SC ₅₀ (μ g/mL)
AHWE ²⁾	3,274.7 \pm 47.7 ³⁾	2,660.1 \pm 50.3
Ascorbic acid	192.2 \pm 2.1	101.8 \pm 1.2

¹⁾SC₅₀, concentration required for 50% scavenging of radicals.

²⁾AHWE, *A. elata* hot-water extract.

³⁾Values represent the mean \pm SD (n=3).

(Pellegrini 등 1999). ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과, 312.5-10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 8.2- 63.7%의 활성이 측정되었으며, SC_{50} 값은 $2,660.1 \pm 50.3 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 대조군으로 사용된 ascorbic acid의 SC_{50} 값($101.8 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$)을 기준으로 두릅 열수추출물의 relative activity를 확인한 결과, 3.83%에 해당하는 수준으로 나타났다.

항균활성

두릅 열수추출물의 *H. pylori*에 대한 항균활성을 Paper disc diffusion 분석법을 이용하여 측정하였으며, 측정 결과는 Table 3, Fig. 1에 나타내었다. 일정하게 균을 도말한 배지에 두릅 열수추출물을 1-3 mg을 점종한 paper disc를 배치하고 24시간 후 disc 주변에서 clear zone을 확인하였다. 점종된 paper disc에서 1, 2 mg을 점종한 결과 각각 1.89 mm, 2.14 mm의 clear zone으로 확인되었고, 가장 고농도인 3 mg은 2.85 mm의 clear zone으로 확인되었다. 이를 통해 두릅 열수추출물이 *H. pylori*에 대해 항균활성 있음이 확인되었으나, 대조군 항생제인 amoxicillin은 0.1 mg 용량에서 9.62 mm의 clear zone으로 두릅보다 높은 항균활성이 나타났다. 하지만 amoxicillin은 담마진, 소양증, 천식 등 알레르기 반응을 유발

시키는 부작용이 있으며, pbp1A 유전자의 돌연변이가 *H. pylori*의 amoxicillin에 대한 내성을 발현시키는 것으로 알려져 있다(Kim과 Oh, 2017; Lee 등, 2019).

두릅 열수추출물이 *H. pylori*의 생육을 저해하는 데 필요한 최소농도를 확인하기 위하여 흡광도를 측정해 생장이 검출되지 않는 농도를 측정하였다. 또한, 최소의 사멸농도를 확인하기 위하여 최소저해농도가 나타난 이상의 농도를 배지에 도말하여 최소사멸농도를 확인하였다(Table 4). 두릅 열수추출물의 150 mg/mL 농도에서 최소저해농도를 나타냈으며, 최소사멸농도는 400 mg/mL로 확인되었다. Lee(2014)의 연구에 따르면 소함홍탕 에탄올 추출물과 황련 총 알칼로이드의 *H. pylori*에 대한 최소저해농도는 각각 250 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 이었다고 보고되었으며, 백지 메탄올 추출물(Choi 등, 2018)의 최소사멸농도는 250 $\mu\text{g/mL}$ 이었다고 보고되었다.

세포생존율 및 nitric oxide 생성억제능 측정

*H. pylori*의 감염에 의하여 위점막이 손상되면 대식세포가 침윤하고 염증세포는 NO의 독성에 의하여 위점막이 손상된다고 보고되었다(Mannick 등, 1996). 또한, 인체 내 과발현된 NO는 toxic radical로 작용하여 위점막을 손상시킬 뿐만 아니라, 파킨슨 병, 뇌막염 및 알츠하이머병과 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다(Chung 등, 2001; Kawamata

Table 3. Evaluation of antibacterial activity of *A. elata* hot-water extract using paper disc diffusion analysis

Sample	Concentration (mg/disc)	Diameter of clear zone (mm)
		<i>H. pylori</i>
AHWE ¹⁾	1	1.89
	2	2.14
	3	2.85
Amoxicillin	0.1	9.62

¹⁾AHWE, *A. elata* hot-water extract.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *A. elata* hot-water extract against *H. pylori*

Sample	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
AHWE ¹⁾	150	400
Amoxicillin	0.75	1.5

¹⁾AHWE, *A. elata* hot-water extract.

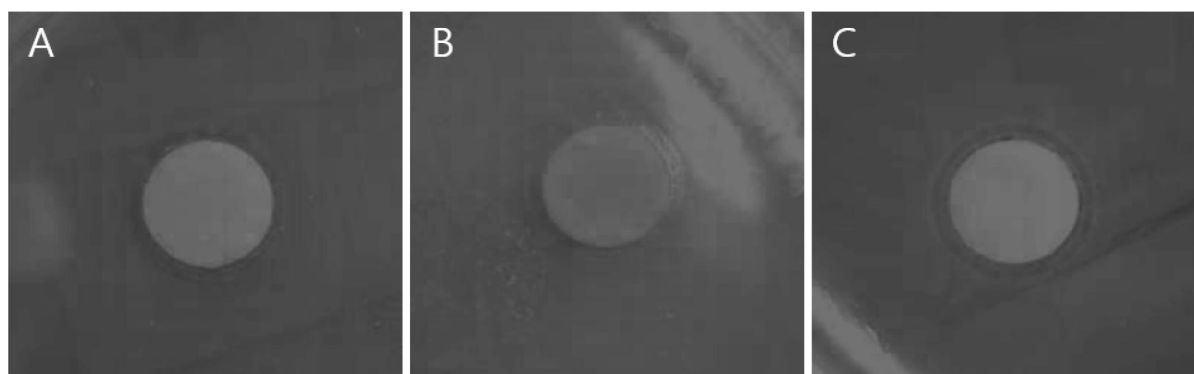


Fig. 1. Antibacterial effect of *A. elata* extract as clear zone of inhibition against *H. pylori* by paper disk diffusion methods.
A, 1 mg; B, 2 mg; C, 3 mg.

등, 2000). 따라서 본 연구에서는 MTT assay를 이용하여 RAW264.7 대식세포에 대한 두릅 열수추출물의 세포 독성을 확인하였다(Fig. 2). 두릅 열수추출물을 농도별(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 99% 이상의 생존율을 보여 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 그러므로 독성이 나타내지 않은 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 NO 생성 및 염증성 cytokine의 분비량을 측정하였다. LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 두릅 열수추출물을 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 처리하여 NO 생성을 측정 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. LPS 처리군에 대비 두릅 열수추출물 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 76.6 ± 0.6 , 72.5 ± 0.5 , 66.4 ± 3.1 , $56.3\pm 2.6\%$ 로 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소됨을 확인하였다. 이를 통해 두릅 열수추출물에서 NO 생성의 억제가 확인됨에 따라 두릅은 다양한 염증인자들을 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

염증성 cytokine 분비량 측정

Cytokine은 대식세포와 같은 면역세포가 분비하는 단백질로서 면역세포의 증식, 활성화 및 분화 조절을 통해 염증을 활성화시키는 매개하는 인자이며, 염증반응을 조절하는 TNF- α , IL-1 β , IL-6은 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로 알려져 있다(Namkoong 등, 2015). LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 두릅 열수추출물을 농도별로 처리한 후, 생성되는 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량을 측정함으로써 두릅 열수추출물에 의한 염증성 cytokine의 생성 억제 효과를 검토하였다(Fig. 4). LPS로 인하여 RAW264.7 세포에서 TNF-

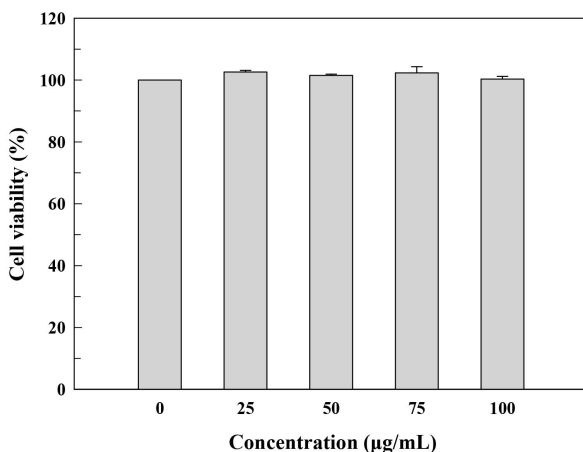


Fig. 2. Cell viability according to treatment of *A. elata* extract on RAW264.7 cell.

Values represent the mean \pm SD (n=3). Means with different superscript in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test *p<0.01, **p<0.005, ***p<0.001.

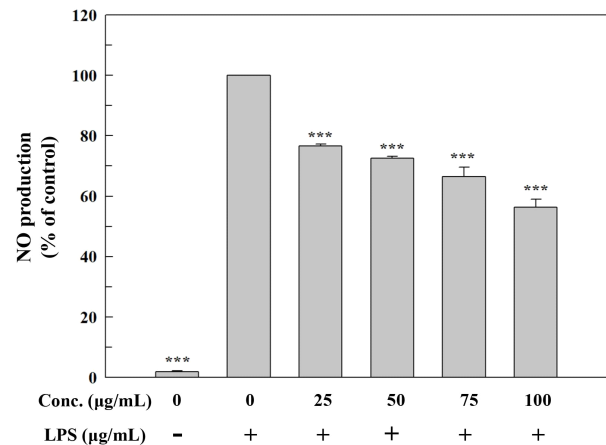


Fig. 3. Inhibitory effects of nitric oxide production according to treatment of *A. elata* extract on LPS-induced RAW264.7 cell.

Values represent the mean \pm SD (n=3). Means with different superscript in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test *p<0.01, **p<0.005, ***p<0.001.

α , IL-1 β , IL-6 생성이 증가하였으나, 두릅 열수추출물(25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$) 처리군에서는 농도 의존적으로 억제되었다. 두릅 열수추출물의 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 TNF- α , IL-6의 생성량을 각각 31.9, 39.2%로 억제됨을 확인하였고 특히, IL-1 β 의 생성량을 61.1%로 억제시킴으로써 cytokine 중 가장 높게 억제되었다. 따라서 두릅 열수추출물은 염증성 cytokine의 생성 억제를 통해 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

요 약

두릅(*A. elata*)은 두릅나뭇과(Araliaceae)에 속하는 식물로 식용과 약용으로 사용되고 있으며, 사포닌, 올리에놀산, 트라이테펜 등의 성분을 함유하고 있어 항산화, 당뇨, 항염증 등에 효과가 있다. 두릅은 살모넬라와 대장균의 성장억제에 대한 효과가 보고되어 있지만, *H. pylori*에 관한 연구는 거의 연구된 바가 없다. 본 연구는 순창군에서 재배한 두릅을 활용하여 80 $^{\circ}\text{C}$ 의 water 조건에서 5시간 동안 추출하였고, 얻어진 추출물의 total polyphenol 및 flavonoid 함량, 항산화 활성, 항균 및 항염 효과를 조사하였다. 두릅 열수추출물의 total polyphenol 및 flavonoid 함량은 각각 186.8 ± 2.7 mg GAE/g, 81.9 ± 1.5 mg QE/g으로 확인되었다. 두릅 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 SC_{50} 값은 $3,274.7\pm 47.7$ $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군으로 사용한 ascorbic acid SC_{50} 값(192.2 ± 2.1 $\mu\text{g/mL}$)의 5.87%에 해당하며, ABTS 라디칼 소거활성 SC_{50} 값은 $2,660.1\pm 50.3$ $\mu\text{g/mL}$ 로 ascorbic acid SC_{50} 값(101.8 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$)의 3.83%에 해당하는 수준으로 확인되었다. Paper disc

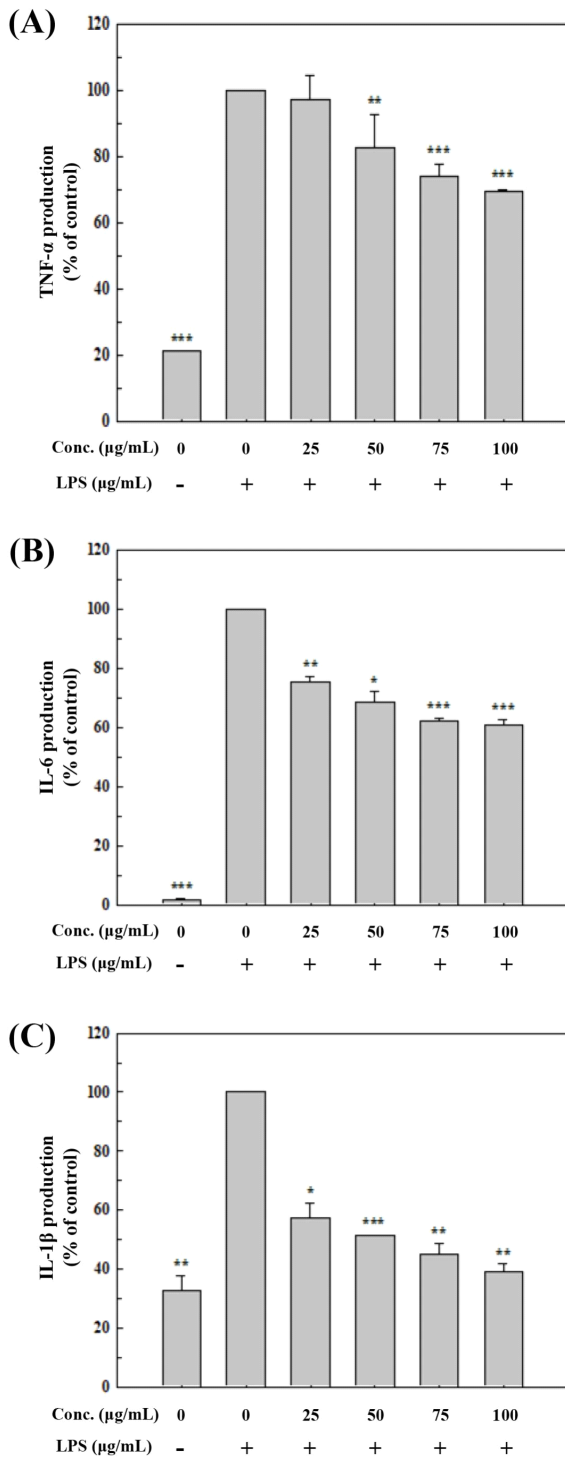


Fig. 4. Inhibitory effects of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) production according to treatment of *A. elata* extract on LPS-induced RAW264.7 cell.

A, TNF- α ; B, IL-1 β ; C, IL-6 production. Values represent the mean \pm SD (n=3). Means with different superscript in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test ^{*}p<0.01, ^{**}p<0.005, ^{***}p<0.001.

diffusion 분석법으로 *H. pylori*에 대한 항균활성을 측정된 결과, 1, 2, 3 mg 용량에서 각각 1.89, 2.14, 2.85 mm의 clear zone이 확인되었다. 두릅 열수추출물의 *H. pylori*에 대한 최소저해농도 및 최소사멸농도를 확인한 결과, 각각 150, 400 mg/mL로 나타내었다. RAW264.7 세포에 대한 세포생존율은 100 μ g/mL 이내의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았고, NO 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한, 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성량을 농도 의존적으로 억제시켰다. 따라서 두릅 열수추출물의 천연 항균 및 항염증제로의 활용 가능성을 제시하는 결과로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Se-Won Lee <https://orcid.org/0000-0002-9739-7336>

Jeong Ho Lee <https://orcid.org/0000-0002-1052-1497>

References

Ahn JY. Effectiveness of *Helicobacter pylori* eradication before endoscopic resection. The Korean J Helicobacter Up Gastrointest Res, 19, 215-219 (2019)

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200 (1958)

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res, 47, 936-942 (1987)

Cha JY, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Cho YS. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. J Life Sci, 19, 652-658 (2009)

Chae IG, Yu MH, Kim HI, Lee IS. Anti-inflammatory and anti-oxidative activity of methanol extract from *Terminalia chebula* Retz., *Lavandula spica* L., and *Dalbergia odorifera* T. in RAW 264.7 cells. J Life Sci, 21, 561-567 (2011)

Choi JY, Kim HM, Mok SY, Choi K, Ku JJ, Park KW, Cho EJ, Lee SH. Antibacterial activity and protective role against gastric cancer by *Sedum sarmentosum*. J Appl Biol Chem, 55, 157-161 (2012)

Choi MK, Yim DS, Choi SS. Anti-bacterial and anti-inflammatory effects of *Angelica dahurica* extracts in

- Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial AGS cells. Kor J Pharmacogn, 49, 255-261 (2018)
- Chung HJ. Comparison of total polyphenols, total flavonoids, and biological activities of black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. J Korean Soc Food Sci Nutr, 43, 1349-1356 (2014)
- Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 282, 1075-1079 (2001)
- De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol, 2, 35-41 (2011)
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 126, 131-138 (1982)
- Healthcare Bigdata Hub. 100 Disease Statistics in Living. Health Insurance Review and Assessment Service. <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olap3thDsInfo.do>. (accessed March 2018)
- Hofseth LJ, Ying L. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. Biochim Biophys Acta, 1765, 74-84 (2006)
- Jin JY, Park EH, Jeon YA, Lee YJ. Antihypertensive effect of ethanol extracts of *Aralia elata* in spontaneously hypertensive rats. Korean J Vet Res, 57, 181-187 (2017)
- Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzentaiho-to in LPS-activated Raw264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med, 28, 217-226 (2000)
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. Korean J Food Sci Technol, 44, 337-342 (2012)
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean J Food Sci Technol, 36, 333-338 (2004)
- Kim HS, Oh JK. Development of antibiotic prescription guidelines for antibiotic prescription quality management. J Korean Academy Dental Administration, 5, 45-54 (2017)
- Kim HY, Woo SO, Kim SG, Bang KW, Choi HM, Moon HJ, Han SM. Anti-inflammatory activities of drone pupae (*Apis mellifera* L.) in macrophages. J Apiculture, 34, 255-259 (2019)
- Kim MJ, Cho SY, Lee MK, Shin KH. Effects of *Aralia elata* water extracts on activities of hepatic oxygen free radical generating and scavenging enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 653-658 (2004)
- Kim SK, Woo SO, Han SM, Kim SG, Bang KW, Jang HR, Moon HJ, Kim HJ. Anti-inflammatory effects of Korean propolis extracts on Raw264.7 macrophage cells. J Apiculture, 33, 187-194 (2018)
- Kim YJ. Evaluation of antioxidant activity and thermal stability of plant polyphenols. Biomaterials Res, 13, 30-36 (2009)
- Kwon BS, Park SK, Kim JM, Kang JY, Park SH, Kang JE, Lee CJ, Park SB, Yoo SK, Lee U, Heo HJ. Antioxidant capacity and hepatoprotective effect of ethyl acetate fraction from shoot of *Aralia elata* on alcohol-induced cytotoxicity. Korean J Food Sci Technol, 50, 216-224 (2018)
- Lee BW, Choi MS, Yim DS, Choi SS. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of ethanol extract of Sohamhyoongtang and coptidis rhizoma total alkaloids. Kor J Pharmacogn, 45, 168-173 (2014)
- Lee DJ, Jeong JC. peroxynitrite scavenging activity of Samjunghwan. J Int Korean Med, 27, 178-187 (2006)
- Lee JH, Kim JS, Park JS. Antibacterial effect of medicinal plants against *Helicobacter pylori*. J Digital Convergence, 17, 447-451 (2019)
- Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Kwon JW, Chae KS, Jeong JT, Lee TB. Improvement of cholesterol and blood pressure in fruit, leaf and stem extracts from black raspberry *in vitro*. Korean J Medicinal Crop Sci, 22, 177-187 (2014)
- Lee SH, Jin KS, Kim BW, Kwon HJ. The anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Malus melliana* ethanol extract. J Life Sci, 27, 783-789 (2017)
- Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 29-36 (2011)
- Ma SJ, Ko BS, Park KH. Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia*

- elata*. Korean J Food Sci Technol, 27, 807-812 (1995)
- Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Fontham ETH, Mera R, Miller MJS, Correa P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: Effect of antibiotics and antioxidants. Cancer Res, 56, 3238-3243 (1996)
- Min JY, Park YK. Effect of dipsaci radix water extract on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 mouse macrophages. Kor J Herbology, 24, 189-195 (2009)
- Moon HK, OH KE, Son SH. Factors influencing somatic embryo induction and plant regeneration in *Aralia elata* Seem. Korean J Plant Tissue Culture, 26, 275-280 (1999)
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethopharmacol, 71, 109-114 (2000)
- Namkoong S, Jang SA, Sohn EH, Bak JP, Sohn ES, Koo HJ, Yoon WJ, Kwon JE, Jeong YJ, Meng X, Han HS, Kang SC. Comparative study of *Lisea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. Korean J Plant Res, 28, 145-152 (2015)
- Oh MH, Kim MJ, Shin MR, Park HJ, Seo BI, Roh SS. Gastroprotective activity of *Curcuma longae* rhizoma against gastric ulcer in mice. Kor J Herbology, 35, 17-24 (2020)
- Park YS, Kim YH. The effect of medicinal herb extract on antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant activity. J East Asiam Soc Diet Life, 16, 199-206 (2006)
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxy-nitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem, 266, 4244-4250 (1991)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med, 26, 1231-1237 (1999)
- Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira ICFR. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. Food Chem Toxicol, 50, 1201-1207 (2012)
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult, 16, 144-158 (1965)
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol, 19, 61-64 (2004)
- Van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem, 66, 511-517 (1999)
- Yoon SJ, Kim JS, Jo BS, Kim JH, Lee SH, Ahn BJ, Cho YJ. Isolation and identification of antimicrobial compounds against *Helicobacter pylori* from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts. J Appl Biol Chem, 54, 159-165 (2011)