각질 형성 세포에서 TNF- α 로 유도된 염증 반응에 대한 흑삼 추출물의 항염증 효과

최원영¹ · 이계원² · 권득상³ · 신현중⁴ · 조영호^{1,2}

¹건양대학교 의료공학과, ²건양대학교 제약생명공학과
³(주)한국흑삼공사, ⁴천지현황(주)

Black Ginseng Extract Attenuates TNF- α -Induced Inflammation via Downregulation of NF- κ B Signaling in Human Keratinocytes

Won Yeoung Choi¹, Gye Won Lee², Deuk Sang Kwon³, Hyun Joong Shin⁴, and Young Ho Cho^{1,2}

¹Department of Medical Engineering & Science, Konyang University

²Department of Pharmaceutics and Biotechnology, Konyang University

³Korea Black Ginseng Co., Ltd.

⁴Cheonjihyunhwang Co., Ltd.

ABSTRACT We evaluated the antioxidant activity and anti-inflammatory effects of black ginseng manufactured by a steaming process in a cell-based inflammatory model. Free radical (DPPH, ABTS, superoxide anion) scavenging activity, reducing power, and total polyphenol content in the extracts of ginseng and black ginseng were investigated. The total polyphenol content of the black ginseng extract was 38.83 ± 1.01 mg/g, which was 2.5 times higher than that of the ginseng extract. Also, the black ginseng extract showed higher free radical scavenging activity than the ginseng extract. The anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide (LPS, 50 ng/mL)-induced inflammatory reactions in RAW 264.7 cells demonstrated that treatment with black ginseng extract decreased nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) production in a dose-dependent manner ($P < 0.001$). The quantitative RT-PCR result indicated that the black ginseng extract markedly reduced the expression of pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL)-6, IL-1 β , and IL-8) mRNA in tumor necrosis factor (TNF)- α -treated human keratinocytes. Furthermore, the reduced mRNA expression was associated with the downregulation of iNOS, cyclooxygenase (COX)-2, and nuclear factor (NF)- κ B activity. These results suggest that black ginseng extract exhibits anti-inflammatory effects by the downregulation of NF- κ B and the consequent suppression of inflammatory mediators (iNOS and COX-2) in TNF- α -induced human keratinocytes and suppression of NO production in LPS-induced murine macrophages. Taken together, these results indicate that black ginseng extract could be a valuable anti-inflammatory agent in products used to treat skin inflammation.

Key words: black ginseng, anti-inflammation, cytokines, nuclear factor- κ B, nitric oxide

서 론

보호 기관으로서의 피부는 대식세포, 각질세포, 비만세포 및 상피세포와 같은 여러 면역세포를 포함하고 있다(Zhuang과 Lyga, 2014). 이러한 면역세포 중 대식세포는 염증 매개체의 과잉 생산과 같이 다른 병리 면역 현상을 관리하는데 중심적인 역할을 한다. 그중 피부 방어에 대한 역할로 표피 내에서 산화질소(nitric oxide), 반응 산소종(reactive oxy-

gen species), 사이토카인(cytokines), 케모카인(chemokine) 등과 같은 염증 매개체를 생산하는 것으로 알려져 있다(Kinne 등, 2000; Coleman, 2001; Harvima와 Nilsson, 2011; Kim 등, 2013; Ahn 등, 2015). 병리학적 조건에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)는 NO 생산을 증가시켜 세포독성과 조직손상을 초래하고, prostaglandin E2 (PGE2)는 염증 과정에서 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 생성되어 염증 과정에 중요한 중재자로 관여한다. 또

Received 20 July 2021; Revised 12 August 2021; Accepted 12 August 2021

Corresponding author: Young Ho Cho, Department of Medical Engineering & Science, Konyang University, 158, Gwanjeodong-ro, Seo-gu, Daejeon 35365, Korea, E-mail: mical@konyang.ac.kr

Author information: Won Yeoung Choi (Graduate student), Gye Won Lee (Professor), Young Ho Cho (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://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.

한, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-6(IL-6)는 면역세포의 신호 분자로 작용하고 염증 반응을 조절하는 친염증성(pro-inflammatory) 사이토카인으로 알려져 있다(Grossman 등, 1989; Sims 등, 1993). Toll-like receptor(TLRs)는 궁극적으로 nuclear factor-kappa B(NF- κ B)의 핵 전이를 촉진하는 신호전달 수용체이다. 특히 TLR-4는 lipopolysaccharide(LPS) 인식 수용체로(Means 등, 2000) 활성화가 되면 다양한 생리학적 과정에 있어 중요한 역할을 하는 NF- κ B 전사인자 신호전달 시스템을 활성화시킨다(Gilmore, 2006). 따라서 NF- κ B 신호전달 시스템은 염증성 사이토카인의 전사를 조절함으로써 면역 및 염증 반응을 조절하는 중심 매커니즘으로 연구되고 있다(Siddique와 Khan, 2011). 또한, 면역세포가 생산하는 염증성 사이토카인 중 하나인 TNF- α 는 다양한 염증성 질환의 발생에 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2014). 특히 피부 염증 반응에서 TNF- α 는 염증세포의 침투와 활성화 등 다양한 면역반응을 높이는 핵심 중재자로서(Croft 등, 2012) HaCaT 세포에서 NF- κ B의 활성화와 핵 전이를 유도하여 IL-8, IL-6, TNF- α 및 intercellular adhesion molecule 1(ICAM1)을 포함한 다양한 NF- κ B 표적 유전자의 활성화로 이어진다(Jung 등, 2012). 이에 따라 TNF- α 유도 신호전달의 연쇄반응(cascade) 억제제는 다양한 피부 염증 질환 조절에 중요한 전략으로 작용한다.

인삼(*Panax ginseng*)은 오가피 나무과의 인삼속(*Panax*)에 속하는 음지성 속근초로 잎, 줄기, 열매 등 오래전부터 약용으로 사용해 왔다. 인삼 제품은 가공법에 따라 수삼, 백삼, 홍삼 및 흑삼으로 구분이 되며 가공 중 열을 가하여 제조되기 때문에 화학적 구조변화가 일어난다(Kim 등, 2007). 인삼의 주요 활성 물질은 진세노사이드로 알려져 있으며, 효능은 체내 및 체외에서 항암, 항염증, 항산화, 혈관신생 등의 다양한 약리학적 특성을 가진다고 보고되고 있다(Gillis, 1997; Siddiqi 등, 2014). 이러한 장점에도 불구하고 인삼의 주요 진세노사이드는 큰 분자량과 낮은 생체 이용률로 인하여 사용에 제한적이었다(Kim 등, 2007). 이러한 단점을 보완하기 위하여 구증구폭(九蒸九曝)의 원리를 이용해 9번 찌고 말리는 과정을 거쳐 인삼의 주요 성분인 진세노사이드의 생체 이용률과 회귀 진세노사이드의 함량을 높이기 위한 다양한 증숙 공정 연구가 이루어지고 있다(Metwaly, 2019). 또한 흑삼은 기존의 백삼이나 홍삼보다 더 좋은 항산화(Kim 등, 2016a), 항암(Kim 등, 2008) 및 항비만(Park 등, 2015a) 효과에 대한 연구는 진행이 되었으나 TNF- α 로 유도된 각질 형성 세포의 염증 모델에서 흑삼 추출물의 항염증 효과에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 85°C에서 9번 찌고 말려 제조한 흑삼을 열수 추출하여 제조된 흑삼 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS 유도 대식세포(Raw 264.7)에서 NO 생성 저해 효과와 TNF- α 에 의해 유도된 각질 형성 세포(HaCaT)의 염증 반응에서 염증 관련 전사인자 및 사이토카

인의 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

시약

Dulbecco's modified eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL(Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 R&D systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), TRI reagent, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Folin&Ciocalteu's phenol reagent는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 모든 시약들은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

흑삼 제조

5년근 수삼을 깨끗이 세척하고 95°C에서 약 2시간 30분 동안 증숙(1차 증숙)을 진행한 후, 열풍건조기로 50°C에서 24시간 동안 건조하였다(1차 건조). 2차 증숙부터 9차 증숙까지는 85°C에서 2시간 증숙한 후 햇빛에서 매 증숙마다 8시간 건조를 진행하였고 9차 증숙 후 수분함량을 13% 정도로 맞춘 다음 6개월 숙성하여 흑삼을 제조한 후 사용하였다. 흑삼 제조 전의 수삼을 BG0, 1차 증숙한 흑삼을 BG1, 3차 증숙한 흑삼을 BG3, 6차 증숙한 흑삼을 BG6, 9차 증숙한 흑삼을 BG9으로 각각 명명하였다.

증숙 횟수에 따른 진세노사이드 함량 변화

제조된 흑삼의 진세노사이드 함량 변화를 측정하기 위한 분석 조건은 다음과 같다. 표준용액은 ginsenoside Rg3, Rg1, Rb1, Rh4, Rk1, Rg5(Biopurify phytochemical, Chengdu, China) 표준품을 각각 10.2 mg씩 저울에 정밀히 달아 70%(v/v) 메탄올 용액 10 mL에 녹여 각각의 표준원액(1 mg/mL)을 만들고, 70% 메탄올로 1.43 ppm, 7.14 ppm, 35.71 ppm, 71.42 ppm, 142.86 ppm의 농도로 희석하여 제조하였다. 시료는 약 2 g씩 50 mL 원심분리관에 취하여 70%(v/v) 메탄올 용액 25 mL를 넣은 다음 15분간 200 rpm으로 진탕 후 정용하였다. 그 다음 4°C에서 1,600×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 0.2 μ m 필터로 여과한 후 희석하여 시험용액으로 HPLC1260 infinity LC system(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에 2 μ L를 주입하여 결과를 분석하였다.

기기분석 조건에서 컬럼은 Accucore C18(2.6 μ m, 3.0×50 mm; 17126-053030, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였으며 wavelength는 203 nm, 용매는 0.8 mL/min의 유속으로, column temperature는

30°C에서 실시하였다. 검출기는 1260 infinity Diode Array Detector(Agilent Technologies)에서 분석 조건은 건강기능식품 시험법을 일부 변형하여 이동상 조건을 10% acetonitrile, 80% acetonitrile, 10% acetonitrile 순으로 실시하였다. 진세노사이드 함량(mg/g)은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{진세노사이드 함량(mg/g)} = C \times \frac{a}{S} \times b \times \frac{100}{1,000}$$

C: 시험용액 중 개별 진세노사이드 농도($\mu\text{g/mL}$)

a: 시험용액의 전량(mL)

S: 시료 채취량(g)

b: 회석배수

1/1,000: 단위 환산 계수

흑삼 추출물 제조

제조된 흑삼을 10배의 증류수를 첨가하여 85°C에서 24시간 3회 반복 추출하고 3회 추출한 액을 60°C에서 진공 농축하여 64°Brix로 맞춰 흑삼 추출물을 제조하여 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

흑삼 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin과 Denis(1915) 방법으로 측정하였으며, 시료에 80% 에탄올과 증류수를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu 시약을 넣어 8분간 방치한 후, 10% Na_2CO_3 를 가해 40분간 정지한 뒤 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 폴리페놀 함량은 tannic acid 표준곡선을 이용하여 구하였다.

항산화 활성

흑삼 추출물의 항산화 활성은 DPPH, ABTS, superoxide anion 라디칼 소거 활성 및 환원력으로 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정은 Blois(1958)법에 따라 실시하였다. 안정한 DPPH 라디칼 소거는 다른 방법에 비해 상대적으로 짧은 시간에 항산화 활성을 평가하기 위해 널리 사용된다. 96-well plate에 시료를 농도별로 20 μL 씩 각각 넣고 실험군에는 DPPH, 대조군에는 메탄올 180 μL 를 첨가하여 20분간 혼합한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거능(%)을 구하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성 측정은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 사용하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 암소에서 24시간 반응하여 라디칼을 형성시켜 ABTS stock solution을 제조하였다. 이후 흡광도 0.70 $\pm$ 0.02로 희석시켜 ABTS working solution 270 μL 와 시료 30 μL 를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS 라디칼 소거능을 구하였다.

Superoxide anion 라디칼 소거 활성은 nitro blue tetrazolium(NBT) 환원법(Gutteridge 등, 1982)으로 측정하였

다. 3 mM xanthine sodium salt와 0.6 mM NBT 용액, 15 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 용액, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 각각 혼합하고, 50 mM xanthine oxidase(0.1 units/mL)를 첨가하였다. 5분간 차광 및 37°C에서 15분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

환원력 활성 측정은 먼저 시료에 200 mM sodium phosphate buffer(pH6.6)와 1% potassium ferricyanide를 차례로 가하여 50°C에서 20분간 반응하였다. 그 후 반응액에 10% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 멈춘 후, 2,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액을 96-well plate에 농도별로 가하고 실험군에는 1% iron(II) chloride, 대조군에는 증류수를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다(Oyaizu, 1986).

세포배양

실험에 사용된 대식세포(Raw 264.7)와 각질 형성 세포(HaCaT)는 DMEM에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator(MCO-170AIC, Panasonic, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

세포 생존율

흑삼 추출물의 세포에 대한 독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 배양된 Raw 264.7 세포와 HaCaT 세포를 96-well plate에 각각 1×10^4 cells/mL의 농도로 동일하게 분주하여 배양한 후 흑삼 추출물을 농도별로(6.25~100 $\mu\text{g/mL}$) 1시간 전처리하였다. 그 후 Raw 264.7 세포는 50 ng/mL의 LPS로, HaCaT 세포는 20 ng/mL의 TNF- α 로 자극하여 CO_2 incubator에 18시간 배양하였다. 이를 MTT 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 반응시킨 뒤 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 μL 를 분주하여 생성된 formazan을 녹여낸 후 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

NO 생성 저해능

흑삼 추출물의 NO(nitric oxide) 생성 저해능을 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1×10^4 cell/mL의 농도로 동일하게 분주하여 배양한 후 흑삼 추출물을 농도별로(12.5~100 $\mu\text{g/mL}$) 1시간 전처리를 진행하였고, 50 ng/mL의 LPS로 자극하여 CO_2 incubator에 18시간 배양하였다. NO 생성 저해능은 Griess reagent system으로 측정하였으며, 상등액을 50 μL 취하여 sulfanilamide solution 50 μL 를 가하고 5분 반응 후 naphthylethylenediamine dihydrochloride(NED) solution을 가하여 5분간 반응시켜 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO_2)의 농도별 표준곡선과 비교하여 구하였다.

Table 1. The primer sequence for quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Target gene	Direction	Primer sequence
IL-6	Forward	5'-CCACTCACCTCTTCAGAACG-3'
	Reverse	5'-CATCTTTGGAAGGTTTCAGGT-3'
IL-1β	Forward	5'-GCTACGAATCTCCGACCACCA-3'
	Reverse	5'-AACCAGCATCTTCTCAGCTTG-3'
IL-8	Forward	5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3'
	Reverse	5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA-3'
GAPDH	Forward	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3'
	Reverse	5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'

염증성 사이토카인 mRNA 분석

흑삼 추출물의 염증성 사이토카인 전사에 미치는 영향을 측정하기 위해서 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 실시하였다. HaCaT 세포를 6-well plate(2×10^4 cells/mL)에서 배양하고, 흑삼 추출물을 농도별로(6.25~100 µg/mL) 1시간 동안 전처리한 후 TNF-α(20 ng/mL)를 처리하여 CO₂ incubator에 18시간 배양하였다. 그 후, 세포를 PBS로 3회 세척한 후 TRIzol 시약을 사용하여 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. PCR thermal cycler device(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하고, CFX connect Real-Time PCR detection system(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에서 SYBR green mastermix를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다(Table 1).

Western blot을 이용한 염증 관련 단백질 발현량 측정

흑삼 추출물의 항염증 효과를 측정하기 위하여 전사인자인 NF-κB 및 염증 관련 단백질(iNOS, COX-2)의 발현을 western blot으로 확인하였다. HaCaT 세포를 6-well plate(2×10^4 cells/mL)에서 배양하고, 흑삼 추출물을 농도별로(6.25~100 µg/mL) 1시간 동안 전처리한 후 TNF-α(20 ng/mL)를 처리하여 CO₂ incubator에 18시간 배양하였다. 그 후 세포 내 단백질을 passive lysis buffer로 추출하여 BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific)으로 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 분리한 후, nitrocellulose membrane(0.45 µm)에 분리된 단백질을 5% skim milk로

1시간 동안 blocking 하였다. 그 후 membrane을 1차 항체와 4°C에서 12시간 동안 반응시키고, 세척한 후 HRP 컨주게이션된 2차 항체와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이때 단백질 발현은 enhanced chemiluminescence(ECL) detection system(AI680, GE healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며 각 군간의 통계적 유의성 검증은 SPSS 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's t-test로 하였으며, *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

총 진세노사이드 함량

흑삼 추출물을 제조하기 전 증숙 횟수별 진세노사이드 함량 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 총 진세노사이드 함량은 증숙 횟수에 비례하여 증가하는 것으로 나타났으며, 85°C에서 9번 증숙한 흑삼(BG9)에서 진세노사이드의 함량이 12.39 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 따라서 추가적인 실험을 위한 시료로 사용하기 위하여 진세노사이드의 함량이 가장 많이 증가한 BG9을 선택하여 흑삼 추출물(BGE9)을 제조하였다.

흑삼 추출물의 총 폴리페놀 함량

페놀 화합물은 항산화 작용과 관련하여 생체 내에서 다양한 질환의 근원인 활성산소를 소거하는 능력이 우수한 것으로

Table 2. Changes in ginsenoside content of black ginseng with different steaming times

Samples	Times	Contents of ginsenoside (mg/g)						
		Rg3 (S+R)	Rg1	Rb1	Rh4	Rk1	Rg5	Total
BG0	0	ND ¹⁾	1.74	1.6	ND	ND	ND	3.34
BG1	1	0.03	3.58	4.88	0.1	ND	ND	8.59
BG3	3	0.07	3.17	5.01	0.37	0.04	ND	8.66
BG6	6	0.69	2.02	5.81	1.25	0.28	0.34	10.39
BG9	9	1.52	1.35	5.32	2.32	0.79	1.09	12.39

¹⁾ND: Not detected.

Table 3. Total polyphenol contents of black ginseng extract

	BGE0	BGE9
Phenolics (tannic acid, mg/g)	15.29±0.97 ¹⁾	39.67±4.84

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

로 연구되어 페놀 함량과 항산화 활성이 상관관계가 있다고 알려져 있다(Boo 등, 2009). 본 연구에서는 증숙 과정이 페놀 함량에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 증숙 전 추출물(BGE0)과 9번 증숙한 흑삼 추출물(BGE9)의 총 페놀 함량을 탄닌산을 표준물질로 하여 측정하였다. 그 결과 BGE0과 BGE9의 총 폴리페놀 함량은 각각 15.29±0.97 mg/g과 39.67±4.84 mg/g으로 나타나 증숙 전에 비해 증숙 후에 약 2.5배 증가한 것으로 나타났다(Table 3). 또한, Kim 등(2016b)의 연구에서 90°C로 9번 증숙한 흑삼의 총 폴리페놀 함량이 20.12±0.04 mg/g으로 나타난 결과와 비교했을 때 본 연구에서 제조한 흑삼 추출물(BGE9)이 약 1.9배 정도 높은 페놀 함량을 나타내었다.

흑삼 추출물의 항산화 활성

증숙 전 흑삼 추출물(BGE0)과 증숙 후 흑삼 추출물(BGE9)의 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH, ABTS, superoxide anion 라디칼 소거 활성 및 환원력 평가를 진행하였다. 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 시료의 농도를 나타내는 SC₅₀ 값 및 환원력 결과를 Table 4와 Fig. 1에 각각 나타내었다. DPPH는 다양한 천연소재의 항산화 효능을 알아보기 위해 많이 이용되며, 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지고 있는 물질로 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 짙은 자주색이 탈색이 된다(Al-sereiti 등, 1999). 흑삼 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 BGE0과 BGE9의 SC₅₀ 값은 각각 1,096.80±9.83 µg/mL과 249.39±1.04 µg/mL로 나타나 증숙 전에 비해 증숙 후에 소거 활성이 약 4.3배 정도 높아지는 것으로 확인되었다. 이는 Kim 등(2016b)의 연구에서 90°C에서 9번 증숙한 흑삼의 DPPH 라디칼 소거 활성(SC₅₀=299.43 µg/mL)과 유사한 결과를 내었으며, Kim 등(2011)의 연구에서 96°C에서 9번 증숙한 흑삼의 DPPH 라디칼 소거 활성(SC₅₀=3.12 mg/mL)보다는 더 우수한 소거능을 나타내는 것으로 확인되었다.

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치할 때 생성

Fig. 1. Effects of BGE0 and BGE9 on reducing power. ****P*<0.001 represent significant difference compared to control.

되는 ABTS⁺ 라디칼이 추출물의 항산화력에 의해 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 원리인 ABTS 라디칼 소거 활성은 화학반응을 통한 자유라디칼 유발 용액에 시료를 넣어 항산화 효과를 측정한다는 점에서 DPPH 라디칼 소거 활성과는 다르다(Kim 등, 2015). BGE9의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 SC₅₀ 값이 46.25±0.45 µg/mL로 나타나 BGE0(SC₅₀=185.37±0.89 µg/mL)에 비해 4배 정도 높은 소거 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 Kim 등(2016b)의 연구에서 90°C로 9번 증숙한 시료의 SC₅₀ 값이 144.64 µg/mL인 점과 비교하여 우수한 소거 활성을 가짐을 알 수 있었다.

ROS의 일종인 superoxide anion(O₂⁻)은 hydrogen peroxide, hydroxyl radical을 유도하여 산화적 스트레스 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kwon과 Yoon, 2009). 따라서 흑삼 추출물의 superoxide anion 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, BGE0과 BGE9의 SC₅₀ 값은 각각 >10,000, 675.79±8.25 µg/mL였으며, 특히 추출물의 농도 1,250 µg/L에서 BGE0은 2.69%, BGE9는 68.07%로 증숙 전에 비해 증숙 후에 소거 활성이 약 25배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 90°C에서 9번 증숙한 흑삼 에탄올 추출물이 1,000 µg/mL에서 약 60%의 소거 활성을 보인 Lee 등(2011)의 결과와 비슷한 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

환원력 측정은 Fe³⁺가 Fe²⁺로 환원될 때 발생하는 청색 파장을 700 nm에서 측정하여 시료의 환원력을 계산하는

Table 4. DPPH, ABTS, and superoxide anion radical scavenging effect of black ginseng extract

Sample ¹⁾	Antioxidant activity (SC ₅₀ , µg/mL)		
	DPPH radical	ABTS radical	Superoxide anion radical
L-ascorbic acid	2.93±0.01 ²⁾	1.16±0.00	—
Quercetin	—	—	2.61±0.02
BGE0	1,096.80±9.83	185.37±0.89	>10,000
BGE9	249.39±1.04	46.25±0.45	675.98±8.25

¹⁾BGE0: Dried *Panax ginseng* without processing, BGE9: Black ginseng by steaming-drying 9 times at 85°C.

²⁾Mean±SD (n=3).

방법으로 라디칼 소거 활성 측정 방법과는 다른 메커니즘의 항산화 효과를 측정하는 방법이다(Yoo 등, 2007). BGE0과 BGE9의 환원력은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 농도 의존적으로 유의적으로 증가하였으며, 특히 시료의 농도가 500 µg/mL에서는 증속 전에 비해 증속 후에 약 2배 정도 환원력이 증가하는 것으로 나타났다. Park 등(2015b)의 연구에서 큰 잎모자반 뿌리 및 줄기 추출물의 환원력을 측정한 결과 총 폴리페놀 함량이 높은 에탄올 추출물이 물 추출물보다 높다고 보고하였으며, Chung(2015)의 결과에서도 환원력은 총 폴리페놀 함량과 상관관계가 있는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 총 폴리페놀 함량이 높은 BGE9가 BGE0보다 환원력이 높게 나타난 것으로 보아 환원력은 총 폴리페놀 함량과 상관관계가 높은 것으로 사료된다.

따라서 흑삼의 항산화 활성이 증속 전에 비해 증속 후에 높아지는 것으로 보아 증속 공정과 증속 온도가 항산화 활성 증진에 있어 중요한 인자인 것으로 사료된다.

LPS 유도 대식세포에서 NO 생성 저해 효과

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성 박테리아의 외부 세포막을 구성하는 성분으로 대식세포의 활성화 인자이다. LPS 자극 시 대식세포에서 생성되는 nitric oxide(NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다(Nathan과 Xie, 1994). NO는 신경전달, 혈관 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다(Kawamata 등, 2000; Lee 등, 2000; Seo 등, 2000; Chiou 등, 2001). 이렇게 생성된 NO는 염증 반응을 매개하는 역할을 하게 된다.

대식세포를 이용한 BGE9의 효능을 평가하기 위해 앞서 세포 생존에 영향을 미치는지 여부를 MTT 분석으로 확인하였다. 그 결과 Fig. 2A에 나타난 바와 같이 Raw 264.7 세포에 BGE9를 농도별로(12.5~100 µg/mL) 18시간 처리하였을 때 모든 농도에서 95% 이상의 생존율을 나타내어 세포에

Fig. 2. Anti-inflammatory effect of BGE9 in Raw 264.7 cells with LPS. Cells were treated with BGE9 and then LPS (50 ng/mL) for 18 hr. (A) Cell viability was determined using MTT assay. (B) NO production was determined using griess reagent system. iNOS expression was determined by western blot analysis. HSC70 was used as an internal control. All data are the mean±SD of three independent experiments. *** $P<0.001$ represent significant difference compared to control and ## $P<0.01$ and ### $P<0.001$ compared to LPS-treated group.

Fig. 3. Effect of BGE9 on cell viability in HaCaT cells. (A) Cells were treated with BGE9. (B) Cells were treated with BGE9 and then TNF- α (20 ng/mL) for 24 hr. Cell viability was determined using MTT assay. All data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. * P <0.05 represent significant difference compared to control and # P <0.05 compared to TNF- α treated group.

독성이 없는 것으로 확인되었다. 또한, LPS를 처리한 세포에서는 LPS 단독 처리군에서 세포 생존율이 감소하는 경향을 보였지만 BGE9 처리 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 따라서 BGE9의 NO 생성 저해 효과는 LPS로 유도된 대식세포에 시료의 농도를 12.5~100 µg/mL 범위로 처리하여 평가하였다. NO 생성량은 Fig. 2B에 나타난 바와 같이 LPS 단독 처리군에 비해 BGE9 처리 시 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하는 것으로 확인하였다. 또한, BGE9의 NO 생성 저해 효과를 규명하기 위하여 western blot으로 iNOS 발현량을 측정된 결과 시료 처리 농도 의존적으로 iNOS의 발현량이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 따라서 BGE9의 NO 생성 저해효과는 iNOS 발현을 저해하여 나타난 것으로 사료된다.

염증성 사이토카인 발현 저해 효과

HaCaT 세포에서 BGE9의 염증성 사이토카인의 발현 저해 효과를 확인하기 위해 앞서 BGE9를 6.25~100 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3A에 나타난 바와 같이 BGE9는 모든 농도에서 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았다. 이후 TNF- α 로 감소된 세포 생존율을 BGE9가 회복시키는지 알아보기 위해 BGE9를 12.5~100 µg/mL 농도로 1시간 전처리 후 TNF- α 와 함께 24시간 반응시킨 뒤 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3B에 나타난 바와 같이 TNF- α 에 의해 유의적으로 감소된 세포 생존율이 BGE9 처리 시 농도와는 관계없이 유의적으로 세포 생존율이 회복되는 것으로 확인되었다.

BGE9가 LPS로 자극된 대식세포에서 iNOS 발현 저해를 통한 NO 생성을 감소시키는 것으로 나타났기 때문에 BGE9가 TNF- α 로 자극된 피부 각질 형성 세포에서 염증성 사이토카인의 발현에도 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이

TNF- α 처리 시 증가된 친염증성 사이토카인(IL-6, IL-1 β 및 IL-8)의 mRNA 발현이 BGE9 처리 시 TNF- α 처리군에 비해 감소하는 것으로 확인되었다. 즉, IL-6의 발현은 BGE9 처리 농도 50 µg/mL에서 약 20% 정도 감소되었으며, IL-1 β 와 IL-8의 발현은 TNF- α 처리군에 비해 농도 의존적으로 발현량이 감소하였다. 친염증성 사이토카인은 염증성 피부 질환에서 다량 발현되기 때문에 친염증성 사이토카인 조절은 피부질환의 조절에 중요한 지표로 알려져 있다(Kwon 등, 2011). 따라서 BGE9는 TNF- α 로 유도된 피부 각질 형성 세포에서 농도 의존적으로 피부 염증 반응을 일으키는 친염증성 사이토카인의 유전자 발현을 감소시키는 것으로 보아 피부 염증 반응을 완화시키는 소재로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

피부세포 내 TNF- α 유도 NF- κ B 및 iNOS, COX-2 단백질 발현 저해 효과

염증 반응이 시작되면 염증성 매개물질들의 발현을 유도하는 염증신호전달 단백질 전사인자로서 NF- κ B가 활성화된다. NF- κ B는 염증 반응에 관여하는 전사인자로 평상시 세포질에서 inhibitor kappa B(I κ B)와 복합체를 이루어 비활성 상태로 존재하지만 LPS나 TNF- α 와 같은 염증 유도 인자에 의해 I κ B는 빠르게 인산화 되어 분해된다(Mazière 등, 1999). NF- κ B는 I κ B로부터 분리되어 활성화되면 핵 내로 이동하여 IL-8, COX-2, TNF- α 및 IL-6 등과 같은 염증 반응을 유도하는 단백질의 발현을 촉진시킨다(Hirohashi와 Morrison, 1996). 특히, IL-6나 IL-1 β 와 같은 친염증성 사이토카인은 iNOS, COX-2의 발현량을 증가시켜 염증 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Yayeh 등, 2012).

따라서 본 연구에서는 BGE9가 친염증성 사이토카인의 유전자 발현을 감소시키는 것으로 나타났기 때문에 BGE9의 항염증 작용을 규명하기 위하여 염증신호전달에 관여하

Fig. 4. Effect of BGE9 on expression of pro-inflammatory cytokines in TNF- α -induced HaCaT cells. Cells were treated with BGE9 (25, 50, 100 μ g/mL) for 1 hr then treated with TNF- α (20 ng/mL) for 18 hr. mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , and IL-8) are measured by qRT-PCR in HaCaT cells. GAPDH was used as an internal control. All data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. *** P <0.001 represent significant difference compared to control and # P <0.05 and ## P <0.01 compared to TNF- α treated group.

Fig. 5. Effect of BGE9 on NF- κ B and inflammatory mediators (iNOS and COX-2) expression in TNF- α -induced HaCaT cells. (A) Cells were treated with BGE9 and then TNF- α (20 ng/mL) for 18 hr. NF- κ B and inflammatory mediators were determined by western blot analysis HSC70 was used as an internal control. (B) Densitometry analysis were performed for the mean $\pm$ SD of three independent experiments. *** P <0.001 represent significant difference compared to control and # P <0.05 and ### P <0.001 compared to TNF- α treated group.

는 전사인자인 NF- κ B와 염증 반응을 유도하는 단백질 중 하나인 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5A에 나타난 바와 같이 BGE9 처리 시 TNF- α 처리에 의해 증가된 NF- κ B의 인산화와 염증 반응 매개물질인 iNOS 및 COX-2의 발현을 유의적으로 감소시키는 것으로 확인되었다. 즉, NF- κ B의 인산화(p-p65)는 처리 농도

50, 100 μ g/mL에서 각각 30.37%, 29.14% 감소되었으며, COX-2는 25 μ g/mL 농도에서 24.97%, 50 μ g/mL 농도에서 23.35%, 100 μ g/mL 농도에서 46.43% 감소되었다. 특히, iNOS의 발현량은 100 μ g/mL 농도에서 64.78% 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 이러한 결과로부터 BGE9는 TNF- α 유도 피부 각질 형성 세포에서 NF- κ B의 인산화

억제를 통해 염증 반응 매개물질인 iNOS와 COX의 발현량과 친염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로써 항염증 효과를 가지는 것으로 사료된다. 따라서 흑삼 추출물은 피부 염증 개선을 위한 식의약 및 화장품 소재로 개발 가능성이 있으며, 향후 항염증 메커니즘을 규명하기 위하여 NF- κ B의 핵내 전이(nuclear translocation) 등의 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 85°C에서 9번 증숙한 흑삼 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성을 측정하고, TNF- α 유도 피부 각질 형성 세포에서 항염증 효과와 LPS로 유도된 대식세포에서 NO 생성 억제능을 확인하였다. 그 결과 총 폴리페놀 함량은 증숙 전에 비해 증숙 후에 약 2.5배 증가하는 것으로 나타났다. 흑삼 추출물의 항산화 활성을 DPPH, ABTS, superoxide anion 라디칼 소거 활성 및 환원력으로 평가한 결과 증숙 후 흑삼 추출물이 증숙 전에 비해 항산화 활성이 높아지는 것으로 나타났다. Mouse 대식세포인 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리한 후 NO 생성량을 확인한 결과 증숙 후 흑삼 추출물의 경우 LPS 단독 처리군에 비해 NO 생성량을 농도 의존적으로 감소시켰다($P < 0.001$). NO 생성량 감소에 따라 TNF- α 로 자극된 피부 각질 형성 세포에서 친염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 β 및 IL-8의 mRNA 발현량을 확인한 결과, 흑삼 추출물의 농도 50과 100 μ g/mL에서 IL-6의 mRNA 발현을 TNF- α 처리군 대비 약 20% 감소시켰으며 IL-1 β 와 IL-8의 발현은 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 흑삼 추출물이 친염증성 사이토카인의 유전자 발현을 감소시키는 것으로 나타났기 때문에 흑삼 추출물의 항염증 작용을 규명하기 위하여 염증신호전달에 관여하는 전사인자인 NF- κ B와 염증 반응을 유도하는 단백질 중 하나인 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 흑삼 추출물 처리 시 TNF- α 처리에 의해 증가된 NF- κ B의 인산화와 염증 반응매개물질인 iNOS 및 COX-2의 발현을 유의적으로 감소시키는 것으로 확인되었다($P < 0.001$). 이러한 흑삼 추출물의 항염증 효과는 NF- κ B의 인산화 억제를 통해 염증 매개 분자의 발현을 감소시켜 친염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 나타나는 것으로 확인되었다. 따라서 흑삼 추출물은 피부 염증 개선을 위한 관련 제품의 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 이루어졌으며, 이에 감사드립니다(11913-01).

REFERENCES

- Ahn S, Siddiqi MH, Noh HY, Kim YJ, Kim YJ, Jin CG, et al. Anti-inflammatory activity of ginsenosides in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Sci Bull*. 2015. 60:773-784.
- Al-sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol*. 1999. 37:124-130.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958. 181:1199-1200.
- Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J Med Crop Sci*. 2009. 17:15-20.
- Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001. 69:625-635.
- Chung HJ. Comparative study of antioxidant activity of imported tropical and subtropical fruits. *Korean J Food Preserv*. 2015. 22:577-584.
- Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2001. 1:1397-1406.
- Croft M, Duan W, Choi H, Eun SY, Madireddi S, Mehta A. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol*. 2012. 33(3):144-152.
- Folin O, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *J Biol*. 1915. 22:305-308.
- Gillis CN. Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link?. *Biochem Pharmacol*. 1997. 54:1-8.
- Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006. 25:6680-6684.
- Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, Mary LT, et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989. 86:6367-6371.
- Gutteridge JMC, Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. *Biochem J*. 1982. 206:605-609.
- Harvima IT, Nilsson G. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. *Acta Derm Venereol*. 2011. 91:640-650.
- Hirohashi N, Morrison DC. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun*. 1996. 64:1011-1015.
- Jung MR, Lee TH, Bang MH, Kim H, Son Y, Chung DK, et al. Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 3-O- β -D-glucopyranosyl-spinasterol via blocking NF- κ B and STAT1 signaling pathways in TNF- α and IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012. 427:236-241.
- Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med*. 2000. 28:217-226.
- Kim DH, Chung JH, Yoon JS, Ha YM, Bae S, Lee EK, et al. Ginsenoside Rd inhibits the expressions of iNOS and COX-2 by suppressing NF- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 cells and mouse liver. *J Ginseng Res*. 2013. 37:54-63.
- Kim E, Jin Y, Kim KT, Lim TG, Jang M, Cho CW, et al. Effect of high temperature and high pressure on physicochemical properties and antioxidant activity of Korean red ginseng. *Korean J Food Nutr*. 2016a. 29:438-447.

- Kim EK, Lee JH, Cho SH, Shen GN, Jin LG, Myung CS, et al. Preparation of black panax ginseng by new methods and its antitumor activity. *Kor J Herbology*. 2008. 23:85-92.
- Kim KY, Shin JK, Lee SW, Yoon SR, Chung HS, Jeong YJ, et al. Quality and functional preparations of red ginseng prepared with different steaming time and drying methods. *Korean J Food Sci Technol*. 2007. 39:494-499.
- Kim MY, Kwon OJ, Noh JS, Noh SS. Inhibitory activities of water extracts of black ginseng on HCL/ethanol-induced acute gastritis through anti-oxidant effect. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016b. 45:1249-1256.
- Kim SN, Ha YW, Shin H, Son SH, Wu JS, Kim YS. Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J Pharm Biomed Anal*. 2007. 45:164-170.
- Kim YS, Suh HJ, Park S. Antioxidant activity of hot-water extracts and floral waters from natural plant pigments. *Korean J Food Preserv*. 2015. 22:129-133.
- Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester G. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000. 2:189-202.
- Kwon BG, Yoon J. Superoxide anion radical: principle and application. *J Korean Ind Eng Chem*. 2009. 20:593-602.
- Kwon DJ, Bae YS, Ju SM, Goh AR, Choi SY, Park J. Casuarinin suppresses TNF- α -induced ICAM-1 expression via blockade of NF- κ B activation in HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011. 409:780-785.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two β -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*. 2000. 406:301-309.
- Lee CS, Bae IH, Han J, Choi G, Hwang KH, Kim DH, et al. Compound K inhibits MMP-1 expression through suppression of c-Src-dependent ERK activation in TNF- α -stimulated dermal fibroblast. *Exp Dermatol*. 2014. 23:819-824.
- Lee SY, Kim DH, Woo WH. Antioxidant activity of black *Panax ginseng*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2011. 25:115-121.
- Mazière C, Conte MA, Degonville J, Ali D, Mazière JC. Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NF κ B. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999. 265:116-122.
- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000. 11:219-232.
- Metwaly AM, Lianlian Z, Luqi H, Deqiang D. Black ginseng and its saponins: preparation, phytochemistry and pharmacological effects. *Molecules*. 2019. 24:1856. <https://doi.org/10.3390/molecules24101856>
- Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994. 78:915-918.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction—Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine—. *J Nutr Diet*. 1986. 44:307-315.
- Park HJ, Kim AJ, Cheon YP, Lee M. Anti-obesity effects of water and ethanol extracts of black ginseng. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2015a. 44:314-323.
- Park JH, Bae NY, Park SH, Kim MJ, Kim KBWR, Choi JS, et al. Antioxidant effect of *Sargassum coreanum* root and stem extracts. *KSBB Journal*. 2015b. 30:155-160.
- 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*. 1999. 26:1231-1237.
- Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, et al. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol*. 2000. 35:21-28.
- Siddiqi MH, Siddiqi MZ, Ahn S, Kang S, Kim YJ, Veerappan K, et al. Stimulative effect of ginsenosides Rg5: Rk1 on murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytother Res*. 2014. 28:1447-1455.
- Siddique I, Khan I. Mechanism of regulation of Na-H exchanger in inflammatory bowel disease: role of TLR-4 signaling mechanism. *Dig Dis Sci*. 2011. 56:1656-1662.
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, et al. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 1993. 90:6155-6159.
- Yayeh T, Oh WJ, Park SC, Kim TH, Cho JY, Park HJ, et al. *Phellinus baumii* ethyl acetate extract inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokine expression in RAW264.7 cells. *J Nat Med*. 2012. 66:49-54.
- Yoo KM, Kim DO, Lee CY. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci Biotechnol*. 2007. 16:177-182.
- Zhuang Y, Lyga J. Inflammaging in skin and other tissues—The roles of complement system and macrophage. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2014. 13:153-161.