pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 39, No. 1, pp. 44~53 (2024)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2024.39.1.44

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

RAW 264.7 대식세포에서 산지별 가시오가피 줄기 추출물의 면역 증강 효과

최예은 · 양정모 · 정채원 · 유희원 · 조현덕 · 조주현*
(주) 하람 중앙연구소

Immunomodulatory Effect of *Eleutherococcus Senticosus* Stem Extract by Cultivars in RAW 264.7 Macrophage Cells

Ye-Eun Choi, Jung-Mo Yang, Chae-Won Jeong, Hee-Won Yoo, Hyun-Duck Jo, Ju-Hyun Cho*
Haram Central Research Institute, Cheongju, Korea

(Received November 28, 2023/Revised December 24, 2023/Accepted December 29, 2023)

ABSTRACT - Global interest in natural functional materials to strengthen human immunity is increasing due to the increase in immune-related diseases associated with COVID-19 and the aging population. In this study, we determined the potential therapeutic effect of *Eleutherococcus senticosus* stems on immune enhancement according to the cultivation region. The contents of eleutheroside B and E, which are chemical components of *E. senticosus* stems, were analyzed. We showed that the eleutheroside B content of *E. senticosus* stems in different cultivation regions ranged from 2.96±0.11 to 6.24±0.05 mg/g and from 1.11±0.05 to 2.11±0.03 mg/g in 70% ethanol and hot water extracts, respectively. The eleutheroside E content ranged from 4.93±0.20 to 10.79±0.03 mg/g and 1.75±0.14 to 3.64±0.05 mg/g in 70% ethanol and hot water extracts, respectively. In addition, the immunomodulatory effect of *E. senticosus* stems was evaluated using RAW 264.7 macrophages. The 70% ethanol extract of *E. senticosus* stems showed no cytotoxicity up to 200 μg/mL, and the hot water extract showed no cytotoxicity up to 500 μg/mL. Additionally, the *E. senticosus* stem extract significantly increased the production of nitric oxide and cytokines (TNF-α, IL-6, and IL-1β) compared to their production in the control group. These results suggest that *E. senticosus* stem extracts are a potential functional food material and ingredient to enhance the immune response.

Keywords: Immunomodulation, *Eleutherococcus senticosus*, Cultivation region, RAW 264.7

COVID-19 pandemic과 같은 다양한 질병의 유행은 전 세계적으로 건강의 위협과 경제적 피해를 야기하였으며, 고령화로 인한 면역력의 감소 및 바이러스의 감염은 전신 염증 반응을 일으켜 다양한 만성질환을 유발한다[1,2]. 이에 따라 바이러스나 병원성 미생물 등의 외부 이물질에 대한 노출 및 체내 유입으로부터 신체를 보호하기 위한 면역력 강화에 대한 관심이 증가하고 있으며, 천연물을 활용한 건강기능식품은 부작용이 적어 장기적으로 섭취가 가능하기 때문에 면역력 증진을 위한 건강기능식품 소재 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[3-5].

*Correspondence to: Ju-Hyun Cho, Haram Central Research Institute. Cheongju 28160, Korea
Tel: +82-10-8840-7972, Fax: +82-43-838-7235
E-mail: dusvnd608@hanmail.net

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

면역체계는 바이러스와 질병으로부터 신체를 보호하는 역할을 수행하며, 외부 항원을 인식하여 반응하는 항체를 생성함으로서 항성성을 유지한다[6]. 면역체계는 선천 면역(innate immunity)과 적응 면역(adaptive immunity)로 분류된다. 선천 면역은 감염에 대한 1차 방어로서 외부요소(비자기, non-self)에 대해 신속한 비특이적 작용을 수행하며, 적응면역은 병원체를 특이적으로 인식하여 제시된 항원을 T 림프구가 인식하는 세포성 면역과 항체를 생성하는 B 림프구에 의한 체액성 면역 반응으로 이루어진다[7,8]. 선천 면역은 호중구, 대식세포, 자연 살해 세포(natural killer cell), cytokine 등이 관여하며, 병원체는 호중구와 대식세포같은 식세포에 의해 파괴되고 자연살해세포는 바이러스에 감염된 세포를 파괴한다[9,10]. 특히 대식세포는 대표적인 탐식세포로 바이러스나 곰팡이, 세균과 같은 병원성 항원을 포식해 산화 질소(nitric oxide, NO)와 pro-inflammatory cytokine 등의 면역 조절 인자들을 분비하고, T 세포의 활성화에 관여한다[11,12].

가시오가피(*Eleutherococcus senticosus*)는 주로 오갈피나무과(araliaceae)에 속하는 오가피 나무(acanthopanas sessiliflorum seeman)에 속하며, 한국, 일본, 중국, 러시아 등의 동북아시아 지역을 중심으로 재배되고 줄기와 뿌리 껍질 및 잎과 열매 등이 식품 원료로서 활용되고 있다[13]. 가시오가피의 생리활성에 대한 연구로는 항산화[14], 골흡수 억제[15], 피부 건강[16], 항암[17], 항당뇨[18,19] 등 다양한 약리학적 특성이 보고되고 있다. 가시오가피의 뿌리, 줄기, 잎 및 열매에 함유된 주요 성분으로는 eleutheroside A-G 화합물 및 sesamine, phenolic glycoside, chlorogenic acid, caffeic acid, β-sitosterol 등이 보고되고 있으며, 특히 가시오가피 줄기의 유효성분으로는 eleutheroside B, E 및 sterol, chiisansoide 등이 활성을 나타내는 주요 성분으로 알려져 있다[20-22]. 그 중 가시오가피 품질관리의 지표성분으로 사용되고 있는 eleutheroside B와 eleutheroside E의 함량을 분석하여 건강기능식품 소재로 활용하고자 하였다[23-26].

Syringin이라고도 불리는 eleutheroside B는 페닐프로파노이드(phenylpropanoid)에 속하는 리그난 배당체(lignan glycoside)이며, eleutheroside E는 두개의 phenylpropanoid 단위가 축합되어 형성된 구조이다[27]. 본 연구에서는 산지별 및 추출 용매별 가시오가피의 eleutheroside B 및 eleutheroside E의 분석을 위해 천연물에 함유된 화학물질의 분리 및 식별을 위해 사용되는 high-performance liquid chromatography (HPLC)와 UV 또는 가시광선 영역의 빛을 흡수하는 특정 발색단을 가지는 화합물을 검출하는 photodiode-array detector (PDA)를 사용하였다[28,29].

대식세포의 활성화는 면역 조절인자인 산화질소나 TNF-α, IL-6, IL-1β 등과 같은 pro-inflammatory cytokine을 분비함으로써 선천면역 반응을 조절하여 면역반응을 유도한다고 알려져 있다[30]. 따라서 가시오가피 추출물의 면역 증강 효능을 조사하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에서 분비되는 nitric oxide (NO)와 pro-inflammatory cytokine (TNFα, IL-6 및 IL-1β)의 생성 정도를 측정함으로서 면역 활성을 위한 건강기능식품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

Materials and Methods

실험 재료

표준물질인 eleutheroside B (CAS: 39432-56-9)와 eleutheroside E (CAS: 118-34-3)는 ChromaDex (Irvine, CA, USA)에서 구입하였으며, HPLC 분석에 사용된 acetonitrile과 methanol은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. 면역증강 활성 조사에 사용된 trypsin-EDTA, penicillin/streptomycin (P/S), phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. MTT assay kit와 NO assay kit는 각각 DoGenBio (Seoul, Korea)와 IntronBio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. ELISA cytokine kit는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다.

시료 추출

본 연구에 사용한 가시오가피는 각각 태백, 철원, 삼척, 강원도 농업기술원에서 2023년 7월에 수확한 가시오가피의 줄기 부분을 사용하였다. 각각의 시료는 건조 후 분쇄하여 사용하였다. 70% 에탄올 추출물은 분쇄된 시료 150 g 당 3 L의 70% ethanol을 혼합한 뒤 95°C에서 4시간 추출하였으며, 열수 추출물은 분쇄된 시료 시료 150 g 당 5 L의 물을 혼합한 뒤 120°C에서 4시간 추출하였다. 각 추출액은 106 μm pore size의 test sieve (Chung Hye Inc., Seoul, Korea)로 여과한 후 Vaccum rotary evaporator (Eyela, Tokyo Rikakikai Co. Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 이후, Freeze-dryer (Labcono, Kansas City, MO, USA)로 동결건조하였다. 수확 지역별 가시오가피 줄기 에탄올 및 열수 추출물 분말은 일정 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Eleutheroside B 및 E 분석

지역별 가시오가피 추출물의 eleutheroside B 및 eleutheroside E의 분석을 위하여 Cho 등[31]의 분석 방법을 사용하였으며, 서로 다른 두 개의 표준물질을 동시 분석하였다. Eleutheroside B 및 eleutheroside E은 Waters e2695 separation module HPLC system과 Waters 2998 photodiode array detector (Waters Co., Milford, MA, USA)가 결합된 HPLC 기기를 통해 검출되었으며, Kromasil C18 column (4.6 mm × 250 mm × 5.0 μm, Tedia, Rio de Janeiro, Brazil)으로 분리하였다. 분석조건은 Table 1과 같으며 시료의 주입량은 10 μL, 유속은 1.0 mL/min, Column 온도는 30°C로 유지되었으며, UV 파장은 220 nm으로 설정하여 분석하였다. 이동상으로는 이동

Table 1. HPLC conditions for eleutheroside B and eleutheroside E analysis for *E. senticosus* stem extracts according to cultivated regions

Instrument	Conditions
Column	Kromasil C18 (5.0 μm, 4.6 mm×250 mm)
Column temp.	30°C
Mobile phase	(A) Water : (B) Acetonitrile = 85 : 15
Detector	PDA detector (220 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection vol.	10 μL
Run time	15 min

상 (A) Water와 이동상 (B) Acetonitrile을 sonicator로 탈기하여 사용하였고, 등용매 용리조건(isocratic system)을 이용하여 분석하였다.

표준용액 및 시험용액의 조제

Eleutheroside B 및 eleutheroside E 표준물질을 각각 2.5 mg을 취하여 증류수 2 mL로 용해하고 methanol을 가해 10 mL로 정용하여 이를 stock solution으로 하였다. Working solution은 제조된 stock solution을 이용하여 3.9, 7.8, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 μg/mL가 되도록 80% methanol로 희석하여 사용하였다. 시험용액은 동결건조된 시료를 100 mg 칭량한 뒤 10 mL 부피 플라스크에 옮긴 후 증류수 2 mL을 넣은 후 methanol을 가해 40분간 초음파 추출한 후 최종 methanol을 가해 10 mL로 정용하였다. 상층액을 취하여 PTFE 0.45 μm syringe filter (Hyundai Micro, Seoul, Korea)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

세포 배양

RAW264.7 대식세포는 American Type Culture Collection (ATCC, TIB-71, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 high-glucose DMEM 배지에 10% FBS와 100 units/mL P/S를 첨가하여 사용하였고 37°C, 5% CO_2 incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

세포독성 평가

가시오가피 추출물에 대한 RAW 264.7 대식세포의 세포 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실행하였다. MTT assay는 Cho 등[32]의 방법에 따라 EZ-cytox cell viability kit를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 1×10^5 cells/mL이 되도록 96 well-plate에 깔고 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 다음 추출물을 48시간 동안 처리하였다. MTT 시약을 첨가하여 2시간 동안 배양한 후, microplate reader (Epoch, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

NO 생성량 측정

RAW 264.7 대식세포에서 NO의 생성을 측정하기 위해 NO assay kit를 실행하였다. NO assay는 Han 등[33]의 방법에 따라 NO assay kit를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 5×10^5 cells/mL이 되도록 48 well-plate에 깔고 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 다음 추출물을 48시간 동안 처리하였다. 배양 후 세포 배양액의 NO 농도를 NO assay kit를 이용하여 측정하였으며, microplate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokine 생성량 측정

RAW 264.7 대식세포에서 cytokine (TNFα, IL-6, IL-1β)의 생성을 Chow 등[34]의 방법에 따라 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 5×10^5 cells/mL이 되도록 48 well-plate에 깔고 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 다음 추출물을 48시간 동안 처리하였다. 세포 배양 배지를 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액의 cytokine 함량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였으며, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

Eleutheroside B 및 eleutheroside E 함량, 면역증강 활성 결과 값의 통계처리는 SPSS™ (vev. 29.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 그룹 간의 유의성 분석을 위해 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였으며, Duncan multi-range test를 이용하여 각 시험군 간의 유의차를 $P<0.05$ 수준에서 사후검정하였다. 상관관계는 Pearson의 적률 상관계수(Pearson's correlation coefficient)를 이용하여 유의성을 표기하였다.

Results and Discussion

산지별 및 추출용매별 가시오가피 추출물의 eleutheroside B 및 eleutheroside E 함량

산지별 가시오가피 줄기 추출물의 eleutheroside B 및 eleutheroside E 함량을 분석한 결과는 분석에 사용한 표준물질 eleutheroside B 및 eleutheroside E의 머무름 시간(retention time, RT)과 산지별 가시오가피 줄기 추출물의 머무름 시간이 일치하였다(Fig. 1). 산지별 가시오가피 줄기 추출물의 지표성분 함량은 Table 2와 같이 측정되었다. Eleutheroside B 함량은 70% 에탄올 추출물에서 태백, 철원, 삼척 및 강원도 농업기술원 순으로 각각 6.24±0.05, 3.57±0.05, 2.96±0.11 및 3.04±0.07 mg/g로 나타났으며, 재배 지역 가운데 태백에서 수확한 가시오가피 70% 에탄올 추출물에서 가장 높은 함량을 나타냈고 강원도 농업기술원에서 가장 낮은 함량을 나타냈다. 열수 추출물에서는 재배 지역에 따라 각각 2.11±0.03, 1.24±0.01, 1.23±0.09 및 1.11±0.05 mg/g로 나타났으며, 재배 지역 가운데 태백에서 가장 높은 함량을 나타냈고 철원에서 가장 낮은 함량을 나타냈다. Eleutheroside E 함량은 70% 에탄올 추출물에서 태백, 철원, 삼척 및 강원도 농업기술원 순으로 각각 7.46±0.05, 10.79±0.03, 4.93±0.20 및 9.07±0.19 mg/g로 나타났으며, 철원에서 가장 높은 함량을 나타냈고 삼척에서 가장 낮은 함량을 나타냈다. 열수 추출물에서는 각각 1.96±0.17, 3.51±0.11, 1.75±0.14 및 3.64±0.05 mg/g로 나타났으며, 철원과 농업기술원에서 가장 높은 함량을 나타냈고 삼척에서 가장 낮은 함량을 나타냈다. 따라서 eleutheroside B 함량은 70% 에탄올 추출물 및 열수 추출물의 경우 태백에

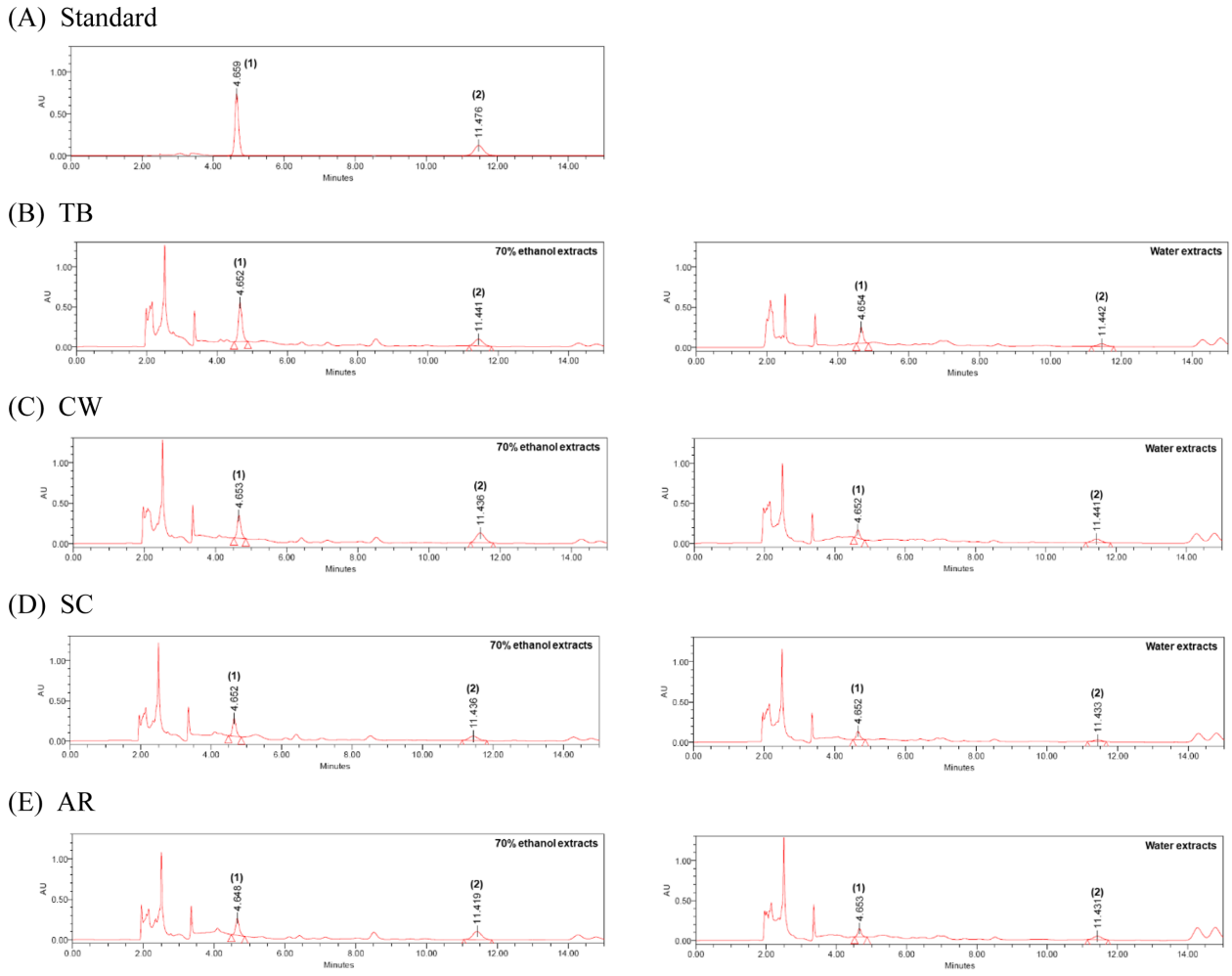

Fig. 1. HPLC chromatograms of standard mixutre and *E. senticosus* stem extracts according to cultivated regions. A, Standard mixture compound; B, Taebaek (TB); C, Cheorwon (CW); D, Samcheok (SC); E, Gangwon-do Agricultural Research & Extension services (AR). (1): Eleutheroside B, (2) Eleutheroside E.

Table 2. Comparison of eleutheroside B and eleutheroside E contents of *E. senticosus* stem extracts accroding to cultivated regions

Compounds	Extract solvents	Cultivated regions (mg/g)			
		TB	CW	SC	AR
Eleutheroside B	70% ethanol extracts	6.24±0.05^{a}	3.57±0.05^{b}	2.96±0.11^{c}	3.04±0.07^{c}
	Water extracts	2.11±0.03^{a}	1.24±0.01^{b}	1.23±0.09^{b}	1.11±0.05^{b}
Eleutheroside E	70% ethanol extracts	7.46±0.55^{c}	10.79±0.03^{a}	4.93±0.20^{d}	9.07±0.19^{b}
	Water extracts	1.96±0.17^{b}	3.51±0.11^{a}	1.75±0.14^{b}	3.64±0.05^{a}

Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Different small letters in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. Taebaek, TB; Cheorwon, CW; Samcheok, SC; Gangwon-do Agricultural Research & Extension services, AR.

서 가장 높은 함량을 나타냈고, eleutheroside E 함량은 70% 에탄올 추출물은 삼척에서 열수 추출물은 철원 및 농업기술원에서 가장 높은 함량을 나타냈다. Guo 등[35]에 따르면 가시오가피에 함유된 eleutheroside B 및 E의 함량은 재배 지역에 따라 차이를 나타냈으며, 이는 지리적 특성, 강수량, 기온 등의 영향에 따라 차이를 보인 것으로 사료된다. 또한, 추출 용매별 eleutheroside B 및 E 함량은 열수 추출물보다 70% 에탄올 추출물에서 높은 함량을 나타냈으며, 이는 에탄올 농도가 높아질수록 eleutheroside B와 E 함량이 증가한다고 보고한 Jwa 등[36], Lim 등[37]의 연구와 유사한 경향을 나

타내었다. 따라서 가시오가피 줄기의 추출은 에탄올을 사용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

산지별 및 추출용매별 가시오가피 추출물의 세포 독성에 미치는 영향

RAW 264.7 대식세포에 대한 산지별 가시오가피 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 가시오가피 70% 에탄올 추출물을 50, 100, 200 μg/mL, 열수 추출물을 100, 250, 500 μg/mL의 농도로 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 가시오가피 에탄올 및 열수 추출물 처리 시 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 RAW 264.7 대식세포에 대한 독성이 없는 것을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 산지별 가시오가피 줄기 추출물의 면역 증강활성을 평가하기 위한 처리 농도는 70% 에탄올 추출물의 경우 50, 100, 200 μg/mL, 열수 추출물의 경우 100, 250, 500 μg/mL로 실험을 진행하였다.

산지별 및 추출용매별 가시오가피 추출물의 NO 생성에 미치는 영향

대식세포는 선천면역에 관여하는 대표적인 면역세포이며, 외부의 병원체(pathogen)을 인지하여 처리할 뿐만 아니라 이들에 대한 적응면역을 활성화시키는 역할을 한다[38]. 활성화된 대식세포에서 분비되는 NO는 면역조절 작용에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[39]. 산지별 가시오

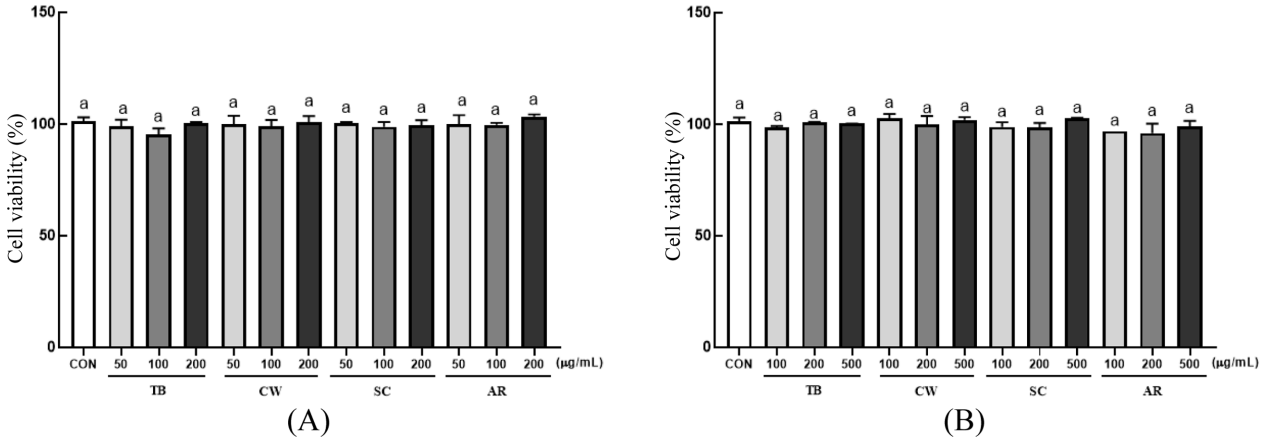

Fig. 2. Effects of *E. senticosus* stem extracts according to cultivated regions on the cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with (A) *E. senticosus* stem 70% ethanol extracts and (B) *E. senticosus* stem water extracts according to cultivated regions for 48 h. Cell viability was measured by MTT assay. Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. Taebaek, TB; Cheorwon, CW; Samcheok, SC; Gangwon-do Agricultural Research & Extension services, AR.

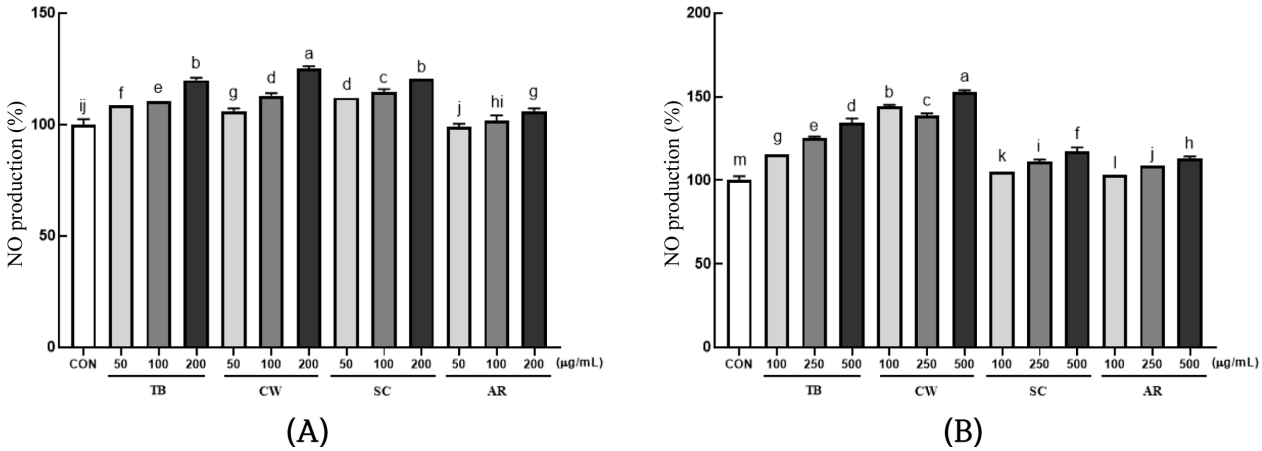

Fig. 3. Effects of *E. senticosus* stem extracts according to cultivated regions on the NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with (A) *E. senticosus* stem 70% ethanol extracts and (B) *E. senticosus* stem water extracts according to cultivated regions for 48 h. NO production was measured by Griess reagent assay. Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. Taebaek, TB; Cheorwon, CW; Samcheok, SC; Gangwon-do Agricultural Research & Extension services, AR.

가피 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에 산지별 가시오가피 추출물을 처리한 후 세포 배양액 내 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 음성대조군(CON)에 비해 산지별 가시오가피 에탄올 추출물을 200 μg/mL 처리한 군에서 태백, 철원, 삼척, 강원도 농업기술원 순으로 각각 119.83±1.22, 125.00±1.22, 120.69±1.22 및 101.72±2.44%의 유의적인 증가를 나타내었으며, 철원에서 가장 높은 NO 생성능을 나타냈다. 열수 추출물을 500 μg/mL 처리한 군에서는 134.48±2.44, 152.59±1.22, 117.24±2.44 및 112.93±1.22%의 유의적인 증가를 나타내었으며, 철원에서 가장 높은 NO 생성능을 나타냈다.

산지별 및 추출용매별 가시오가피 추출물의 cytokine 생성에 미치는 영향

사이토카인은 염증 자극에 노출된 대식세포에서 분비되며, 적절한 양으로 생성된 사이토카인의 염증반응은 숙주에게 유익한 역할을 한다[40]. TNF-α는 염증반응 동안 상향조절되는 면역반응의 급성기 반응물질(acute phase reactants)이며, 병원체의 침입에 처음으로 반응하여 방출되는 인자이다[41]. IL-6은 B 세포의 형질세포로의 분화를 촉진하고, 세포독성 T세포를 활성화시키며[42], IL-1β는 감염과 같은 자극에 의한 면역반응의 초기단계에서 생성된다[43]. 따라서 산지별 가시오가피 추출물을 RAW 264.7 대식세포에 처리하였을 때 면역체계를 활성화시켜 면역반응을 유도하는 사이토카인 생성에 미치는 영향을 평가하였다. RAW 264.7 대식세포에 산지별 가시오가피 추출물을 처리한 후 세포 배양액 내 TNF-α, IL-6, IL-1β의 분비량을 측정하였다. 그 결과 산지별 가시오가피 70% 에탄올 추출물을 200 μg/mL 처리한 군에서 TNFα 분비량은 음성대조군에서 81.15±6.13 pg/mL으로 측정되었으며, 태백, 철원, 삼척, 강원도 농업기술원 순으로 각각 396.95±11.60, 427.90±4.60, 388.44±0.44 및

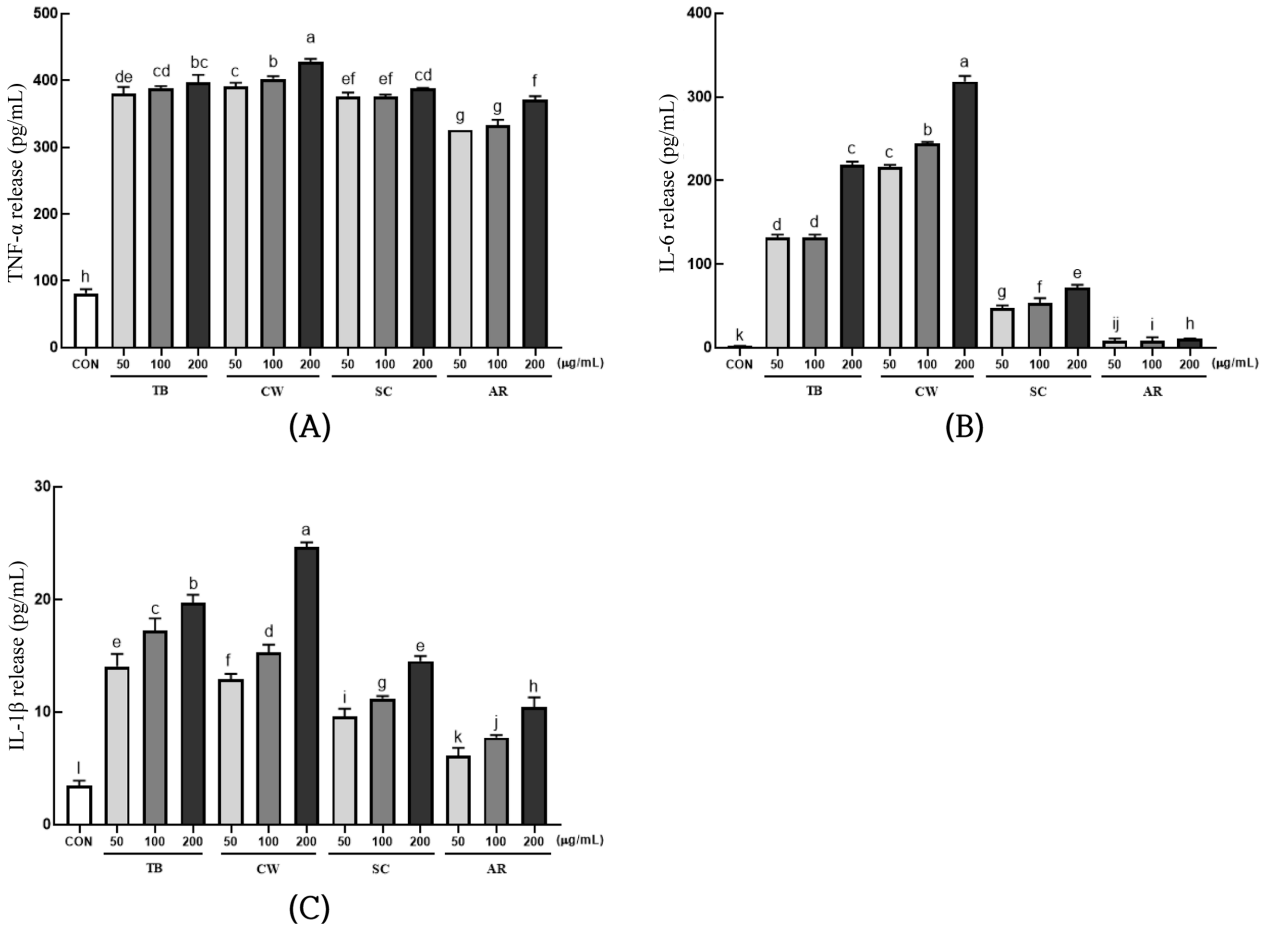

Fig. 4. Effects of *E. senticosus* stem 70% ethanol extracts according to cultivated regions on cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β) release in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with *E. senticosus* stem 70% ethanol extracts according to cultivated regions for 48 h. (A) TNF-α, (B) IL-6 and (C) IL-1β secretion in RAW 264.7 cell culture supernatant was determined using an ELISA kit. Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. Taebaek, TB; Cheorwon, CW; Samcheok, SC; Gangwon-do Agricultural Research & Extension services, AR, tumor necrosis factor, TNF; interleukin, IL.

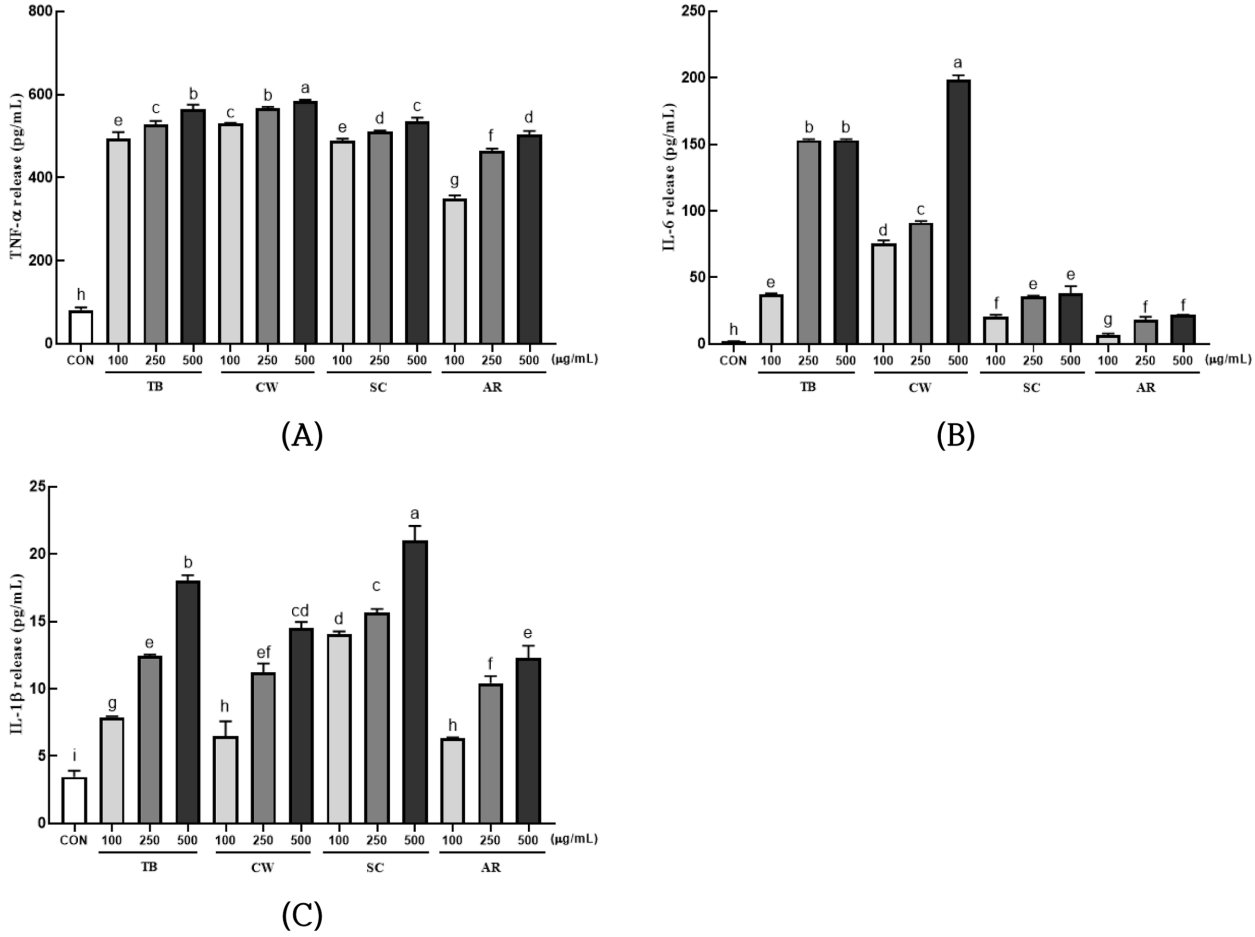

Fig. 5. Effects of *E. senticosus* stem water extracts according to cultivated regions on cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β) release in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with *E. senticosus* stem water extracts according to cultivated regions for 48 h. (A) TNF-α, (B) IL-6 and (C) IL-1β secretion in RAW 264.7 cell culture supernatant was determined using an ELISA kit. Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. Taebaek, TB; Cheorwon, CW; Samcheok, SC; Gangwon-do Agricultural Research & Extension services, AR.

370.96±5.47 pg/mL로 측정되었으며, IL-6 분비량은 음성대조군에서 1.75±0.42 pg/mL, 가시오가피 에탄올 추출물에서 각각 218.24±4.46, 318.44±6.70, 72.27±2.79 및 10.73±0.28 pg/mL로 측정되었다. IL-1β 분비량은 음성대조군에서 3.46±0.45 pg/mL, 가시오가피 에탄올 추출물에서 각각 19.73±0.67, 24.63±0.45, 14.52±0.45 및 10.41±0.89 pg/mL로 측정되었으며, 철원에서 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 4). 또한, 산지별 가시오가피 열수 추출물을 500 μg/mL 처리한 군에서 TNF-α 분비량은 음성대조군에서 81.15±6.13 pg/mL로 측정되었으며, 가시오가피 열수 추출물에서 각각 564.53±10.94, 584.49±2.84, 535.28 ±8.97 및 502.95±9.19 pg/mL로 측정되었으며, IL-6 분비량은 음성대조군에서 2.48±0.42 pg/mL으로 측정되었으며, 가시오가피 열수 추출물에서 각각 153.14±0.84, 198.41±3.49, 37.95±12.55 및 21.77±0.28 pg/mL로 측정되었다. IL-1β 분비량은 음성대조군에서 4.04±0.75 pg/mL, 가시오가피 에탄올 추출물에서 각각 17.99±0.45, 14.52±0.57, 20.99±1.12 및 12.31±0.89 pg/mL로 측정되었으며, 철원과 삼척에서 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 5). 이는 복합 추출물 형태인 가시오가피 추출물의 수확지역 및 추출 용매에 따른 유효성분의 차이에 따른 결과인 것으로 사료되며, 가시오가피 추출물의 면역증강 효능을 나타내는 유효성분에 대한 연구 및 가시오가피 추출물의 면역증강 기전에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Eleutheroside B 및 eleutheroside E 함량과 면역증강 활성과의 상관관계 분석

가시오가피 줄기 추출물의 지표성분인 eleutheroside B 및 eleutheroside E 함량과 면역증강 활성 간의 상관계수를 나타낸 결과는 Table 3, 4와 같다. Eleutheroside B 및 eleutheroside E 함량은 면역 증강효과를 측정하기 위해 수행한 NO와 cytokine 생성 결과와 낮은 상관성을 나타냈

Table 3. Correlation coefficient between eleutheroside B content, eleutheroside E content, nitric oxide production and cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β) release of *E. senticosus* stem 70% ethanol extracts

	EB	EE	NO	TNF-α	IL-6	IL-1β
EB	1	-	-	-	-	-
EE	-0.020	1	-	-	-	-
NO	0.286	-0.089	1	-	-	-
TNF-α	0.184	0.477	0.831	1	-	-
IL-6	0.457	0.500	0.785	0.954*	1	-
IL-1β	0.411	0.439	0.839	0.972*	0.995**	1

P-value tested by person correlation at **P*<0.05 ***P*<0.01.

Table 4. Correlation coefficient between eleutheroside B content, eleutheroside E content, nitric oxide production and cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β) release of *E. senticosus* stem water extracts

	EB	EE	NO	TNF-α	IL-6	IL-1β
EB	1	-	-	-	-	-
EE	-0.555	1	-	-	-	-
NO	0.269	0.205	1	-	-	-
TNF-α	0.431	-0.121	0.946	1	-	-
IL-6	0.458	0.099	0.979*	0.954*	1	-
IL-1β	0.345	-0.953	-0.115	0.206	-0.066	1

P-value tested by person correlation at **P*<0.05.

다. 식물 추출물은 다양한 개별 성분(화합물)을 함유하는 복합 혼합물이며, 식물 추출물의 다양한 성분은 하나의 성분으로서 단독으로 작용하거나 여러 성분의 상호작용으로 인해 시너지효과 및 길항효과를 나타낸다고 알려져 있다[44,45]. 따라서 가시오가피 추출물의 면역활성은 추출물에 함유된 수많은 성분의 영향으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2022년 농촌진흥청 지원과제(RS-2022-RD010345)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 국내산 가시오가피의 건강기능식품 소재로서의 가능성을 확인하기 위해 산지별 채취한 가시오가피의 유효물질 함량 및 면역 증강 효과을 평가하였다. 태백, 철원, 삼척, 강원도 농업기술원에서 수확한 가시오가피의 지표성분인 eleutheroside B 및 eleutheroside E의 분석을 수행하였으며, 면역 증강에 대한 효과를 관찰하기 위하여 MTT 세포독성 평가, NO 생성량과 cytokine 생성량을 측정하였다. 지표성분 eleutheroside B의 함량은 채취 지역별로 70% 에탄올 추출물에서는 2.96±0.11-6.24±0.05 mg/g로 태백에서 가장 높은 함량을 나타냈으며, 열수 추출물에서는 1.11±0.05-2.11±0.03 mg/g로 태백에서 가장 높은 함량을 나타냈다. Eleutheroside E 함량은 채취 지역별로 70% 에탄올 추출물에서는 4.93±0.20-10.79±0.03 mg/g을 나타냈으며 철원에서 가장 높은 함량을 나타냈고, 열수 추출물에서는 1.75±0.14-3.64±0.05 mg/g로 철원과 농업기술원에서 가장 높은 함량을 나타냈다. 또한, eleutheroside B 및 E 함량은 열수 추출물보다 70% 에탄올 추출물에서 더 높은 함량을 나타냈다. 채취 지역별 가시오가피의 70% 에탄올 추출물은 50-200 μg/mL 농도에서, 열수 추출물은 100-500 μg/mL 농도에서 RAW 264.7 대식세포에 대한 세포독성을 나타내지 않았으며, 대식세포의 활성화로 방출되는 NO 성성량을 측정한 결과, 가시오가피 줄기 추출물에서 NO 생성량이 증가하는 것을 확인하였으며, TNF-α, IL-6, IL-1β을 포함하는 cytokine의 방출을 측정한 결과 유의적인 증가를 나타냈다. 따라서 가시오가피 줄기는 면역 관련 질환의 개선을 위한 건강기능식품 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Ye-Eun Choi https://orcid.org/0000-0001-8298-248X

Jung-Mo Yang https://orcid.org/0000-0002-1984-7311
Chae-Won Jeong https://orcid.org/0009-0004-5776-2150
Hee-Won Yoo https://orcid.org/0000-0003-2683-0638
Hyun-Duck Jo https://orcid.org/0000-0003-1867-4049
Ju-Hyun Cho https://orcid.org/0000-0003-2901-2489

References

1. Rothan, H.A., Byrareddy, S.N., The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J. Autoimmun.*, **109**, 102433 (2020).
2. Campos, C., Pera, A., Lopez-Fernandez, I., Alonso, C., Tarazona, R., Solana, R., Proinflammatory status influences NK cells subsets in the elderly. *Immunol. Lett.*, **162**, 298-302 (2014).
3. Hwang, K.A., Functional food for immune regulation focusing on Korean native materials. *Food Ind. Nutr.*, **25**, 11-18 (2020).
4. García, L.F., Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Front. Immunol.*, **11**, 1441 (2020).
5. Sindhu, R.K., Goyal, A., Das, J., Neha, Choden, S., Kumar, P., Immunomodulatory potential of polysaccharides derived from plants and microbes: A narrative review. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, **2**, 100044 (2021).
6. Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., Jameson, S.C., Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 772-782 (2005).
7. Lamkanfi, M., Dixit, V.M., Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 137-161 (2012).
8. Vance, R.E., Isberg, R.R., Portnoy, D.A., Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*, **6**, 10-21 (2009).
9. Medzhitov, R., Janeway Jr, C., Innate immunity. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 338-344 (2000).
10. Solana, R., Pawelec, G., Tarazona, R., Aging and innate immunity. *Immunity*, **24**, 491-494 (2006).
11. Mantovani, A., Sica, A., Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.*, **22**, 231-237 (2010).
12. Kelly, B., O'neill, L.A., Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.*, **25**, 771-784 (2015).
13. Kim, S., Kim, K.Y., Park, M.S., Choi, S.Y., Yun, S.J., Intraspecific relationship of *Eleutherococcus senticosus* Max. by RAPD markers. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **6** , 165-169 (1998).
14. Lim, S.Y., Leem, J.Y., Lee, C.S., Jang, Y.J., Park, J.W., Yoon, S., Antioxidant and cell proliferation effects of Acanthopanax senticosus for extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**, 694-700 (2007).
15. Kim, J.K., Kim, S.W., Ko, S.Y., Kim, S.N., Kwon, J.S., Hwang, H.H., The effect of combined Rehmannia glutinosa Libosch and Eleutherococcus senticosus Max (OPB) extracts on bone mineral density in ovariectomized rats. *Int. J. Oral Biol.*, **32**, 143-151 (2007).
16. Park, K.J., Park, S.H., Kim, J.K., Anti-wrinkle activity of Acanthopanax senticosus extract in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**, 42-46 (2010).
17. Hwang, J.H., Kim. S.M., Hwang. G.S., Jeon. C.Y., Kang. K.S., Effect of extract of *Acanthopanax senticosus* fruit on breast cancer cells. *J. Int. Korean Med.*, **43**, 529-541 (2022).
18. Lee, K.K., Choi, D.Y., Kang, S.K., The effect of AS aqua-acupuncture on the diabetic rats induced by Streptozotocin. *J. Acupunct. Res.*, **19**, 1-13 (2002).
19. Kwon, H.O., Lee, M., Kim, Y.J., Kim, E., Kim, O.K., Beneficial effects of *Acanthopanax senticosus* extract in type II diabetes animal model via down-regulation of advanced glycated hemoglobin and glycosylation end products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **45**, 929-937 (2016).
20. Awang, D.V., Siberian ginseng toxicity may be case of mistaken identity. *CMAJ*, **155**, 1237 (1996).
21. Takasugi, N., Effect of *Eleutherococcus senticosus* and its components on rectal temperature, body and grip tones, motor coordination, and exploratory and spontaneous movements in acute stressed mice. *Japanese J. Pharmacogn.*, **39**, 232-237 (1985).
22. Shin, K.H., Lee, S.H., The chemistry of secondary products from *Acanthopanax* species and their pharmacological activities. *Nat. Prod. Sci.*, **8**, 111-126 (2002).
23. Kim, Y.H., Bae, D.B., Lee, J.S., Park, S.O., Lee, S.J., Cho, O.H., Lee, O.H., Determination of eleutherosides and β-glucan content from different parts and cultivating areas of *A. senticosus* and *A. koreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42**, 2082-2087 (2013).
24. Choi, Y.H., Kim, J.W., (Quantitative analysis of eleutherosides B and E using HPLC-ESI/MS. *Korean J. Pharmacogn.*, **33**, 88-91 (2002).
25. Lee, S.H., Kang, S.S., Cho, S.H., Ryu, S.N., Lee, B.J., Determination of eleutherosides B and E in various parts of *Acanthopanax* species. *Korean J. Pharmacogn.*, **36**, 70-74 (2005).
26. Park, H.R., Park, E., Rim, A.R., Jeon, K.I., Hwang, J.H., Lee, S.C., Antioxidant activity of extracts from *Acanthopanax senticosus*. *African J. Biotechnol.,* **5**, 2388-2396 (2006).
27. Yang, X., Liu, T., Qi, S., Gu, H., Li, J., Yang, L., Tea saponin additive to extract eleutheroside B and E from *Eleutherococcus senticosus* by ultrasonic mediation and its application in a semi-pilot scale. *Ultrason. Sonochem.*, **86**, 106039 (2022).
28. Wolfender, J.L., HPLC in natural product analysis: the detection issue. *Planta med.*, **75**, 719-734 (2009).
29. Larsen, T.O., Hansen, M.A., Dereplication and discovery of natural products by UV spectroscopy, 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 235-258 (2007).
30. Schaper, F., Rose-John, S., Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **26**, 475-487 (2015).

31. Cho, J.H., Choi, G.H., Park, I.J., Baik, S.O., Kim, H.H., Kim, C.S., Development of functional food materials from *Acanthopanax senticosus*-fermented mushroom mycelia. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **43**, 411-418 (2014).
32. Cho, B.O., Che, D.N., Kim, J.S., Kim, J.H., Shin, J.Y., Kang, H.J., Jang, S.I., In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative stress activities of kushenol C isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Molecules*, **25**, 1768 (2020).
33. Han, N.R., Kim, K.C., Kim, J.S., Park, H.J., Ko, S.G., Moon, P.D., SBT (composed of panax ginseng and aconitum carmichaeli) and stigmasterol enhances nitric oxide production and exerts curative properties as a potential anti-oxidant and immunity-enhancing agent. *Antioxidants*, **11**, 199 (2022).
34. Chow, S.K.H., Cui, C., Cheng, K.Y.K., Chim, Y.N., Wang, J., Wong, C.H.W., Ng, K.W., Wong, R.M.Y., Cheung, W.H., Acute inflammatory response in osteoporotic fracture healing augmented with mechanical stimulation is regulated *in vivo* through the p38-MAPK pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8720 (2021).
35. Guo, S., Wei, H., Li, J., Fan, R., Xu, M., Chen, X., Wang, Z., Geographical distribution and environmental correlates of eleutherosides and isofraxidin in *Eleutherococcus senticosus* from natural populations in forests at Northeast China. *Forests*, **10**, 872 (2019).
36. Jwa, C.S., Yang, Y.T., Koh, J.S., Preparation of extract from *Acanthopanax koreanum* by extraction conditions and its chemical compositions. *Appl. Biol. Chem.*, **44**, 24-29 (2001).
37. Lim, J.H., Yang, Y.T., Ko, J.S. Extraction of major constituents from *Acanthopanax koreanum* stems with water and ethanol solutions. *Korean J. Food Preserv.*, **14**, 67-72 (2007).
38. Sieweke, M.H., Allen, J.E., Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Sci.*, **342**, 1242974 (2013).
39. Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L., Singh, V., The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **51**, 443-452 (2007).
40. Beutler, B.A., The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J. Rheumatol. Suppl.*, **57**, 16-21 (1999).
41. Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3666-3670 (1975).
42. Nishimoto, N., Kishimoto, T., Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Opin. pharmacol.,* **4**, 386-391 (2004).
43. Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., Paul, W.E., IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7119-7124 (2009).
44. Enke, C.G., Nagels, L.J., Undetected components in natural mixtures: how many? What concentrations? Do they account for chemical noise? What is needed to detect them? *Anal. Chem.*, **83**, 2539-2546 (2011).
45. Ulrich-Merzenich, G., Panek, D., Zeitler, H., Vetter, H., Wagner, H., Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian J. Exp. Biol*., **48**, 208-219 (2010).