Phosphatidic acid로 유도된 Raw cell에서 알로에 베라 및 알로에 센스의 염증 억제 효과

조영제* · 안봉전[1] · 김명욱[2] · 심창섭[2]

상주대학교 식품공학과, [1]대구한의대학교 화장품약리학과, [2](주)김정문알로에 과학연구소

Anti-inflammatory Effect of Aloe Vera and Aloe Arborescens in Phosphatidic Acid-stimulated Raw Cells

Young-Je Cho*, Bong-Jeun An[1], Myung-Uk Kim[2] and Chang-Sub Shim[2]

Department of Food Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea
[1]Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, Korea
[2]R&D Center, Kimjeongmoonaloe Co. LTD. Cheonan 330-882, Korea

Received January 16, 2006; Accepted March 6, 2006

With extracted Aloe vera and Aloe arborescens, anti-inflammatory effect was examined in phosphatidic acid-stimulated Raw 264.7 cells. Phosphatidic acid (50 μg/ml) treatment increased inflammation related 264.7 cells. The extracts of 80 μg/ml concentration from Aloe arborescens reduced the expression of iNOS. Aoe vera and Aloe arborescens also reduced the expression of COX-2, it seems that anti-inflammatory effects of Aloe extracts is partly due to the inhibition of COX-2 expression by inhibiting in Raw 264.7 cells.

Key words: Aloe vera, Aloe arborescens, anti-inflammatory effect

서 론

알로에는 백합과(Liliaceae) Aloe속의 다년생 초본 열대 식물로서 원산지는 아프리카와 그 남동쪽으로 되어 있다. 알로에는 3000년 전부터 민간약으로 사용되기 시작하였는데, 주로 고미건위, 완하제로서 이용되어 왔다.[1,2] 최근에 알로에의 약리 효능과 임상 치료 효과가 입증되면서 난치성 피부병, 화상치료, 류마티즘의 예방과 치료, 항염증 작용, 소화기 궤양, 호흡기 질환, 항암작용, 항히스타민작용, 면역기능조절작용, 방사선 조사에 의한 백혈구 감소에 대한 효과 및 암 등 난치성 성인병의 예방 및 개선치료가 탁월한 것으로 알려지고 있다. 또한 Aloe의 약리작용은 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 정균작용으로 백선증에 대한 치료효과 및 *Mycobacterium tuberculosis*에 대한 aloeresin의 ρ-coumaric acid가 정균효과 등이 있다.[2] 또한, aloe 성분 중에는 화상과 절상에서의 염증유발원인 bradykinin을 분해하는 효소가 포함되어 있으며, 이러한 성분은 유종, 창상, 열창상에 대한 치료효과를 나타내며, 위액분비에 관계가 있는 histamine 탈탄산효소와 방향성 아미노산 탈탄산 효소의 활성을 저해하는 물질을 포함하고 있는 것으로 보고 되었다.[3] 알로에는 품종이 다양하여 전 세계적으로 약 300여종에 이르나,[4] 약용으로 사용되는 알로에는 그 중 일부분으로 Cape Aloe(Aloe ferox, Aloe arborescens)와 Socotra Aloe(Aloe perryi), 그리고 Curasao Aloe(Aloe barbadensis, Aloe vera)이다. 이 중 현재는 Cape Aloe와 Curasao Aloe 두 종류만 주로 사용되고 있으며, 알로에 베라로부터 분리된 당단백인 NY 945가 히스타민 등의 매개체 분비를 억제하며 호산구의 조직 내 침윤을 억제함으로써 항 알레르기 효과를 나타낸다고 보고 되었다.[5] 알로에의 화학적 조성은 anthraquinone 유도체와 만노오즈, 글루코오즈가 주성분인 폴리사카라이드, 각종 아미노산(glutamic acid, arginine, asparagine) 지질(isoprenoids, alkane, n-alkyl alcohol, fatty acids, ester) 및 mineral 물질(K, Na, Mn, Ca) 등 100여종이 있으며,[1-3] 알로에 속 여러 가지 생리 활성 물질 중에 대표적인 것이 quinone 유도체로 aloin이라는 물질이다. Aloin은 barbaloin 이라고도 하며 알로에 삼출물 건조 중량의 10% 정도를 함유하고 있고, 쓴맛을 내는 노란색의 가루인데 하제작용을 나타내는 물질이라고 알려져 있다.[6] 최근 quinone 계 물질은 효소 상호작용에 의하여 ethanol 대사를 증가시킬 수 있다고 보고 되었다.[7] 따라서 본 연구에서는 알로에 생리활성 탐색연구의 일환으로 macrophage cell 라인인 Raw cell을 이용하여 항염증 효과를 검정하기 위하여 세포내의 단백질의 변화를 western blotting을 통하여 염증억제효과를 검토하였다.

*Corresponding author
Phone: 82-54-530-5265; Fax: 82-54-530-5269
E-mail: yjcho@sangju.ac.kr

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에서 사용한 알로에는 2005년 12월에 시중에서 (주)김정문알로에 제품인 알로에 베라와 알로에 센스를 구입하여 4°C에 냉장 보관하면서 사용하였다.

시료조제. 시료의 조제는 시판되는 현탁액의 경우 알로에 베라와 알로에 센스를 60 μg/ml와 80 μg/ml의 농도로 증류수에 현탁시켜서 사용하였으며, 청징액은 현탁액을 0.1 μm pore size의 milipore filter를 통하여 여과시켜 사용하였다.

시약 및 기기. 항염증효능 검정에 사용된 시약은 PA (phosphatidic acid), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)와 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)과 antibiotics는 Gibco/BRL(Eggenstein, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 1차와 2차 antibody는 BD Bioscience(San Diego, USA), Cayman (Ann Arbor, USA), Zymed(South San Francisco, USA)에서 각각 구입하였다. Tumor necrosis factor(TNF)-α, IL-1β와 IL-6의 ELISA kit는 Pierce endogen(Rockford, IL., USA)에서 구입하였다. 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였으며, UV/vis spectrophotometer(Hitachi, Japan), centrifuge(Hitachi, Japan), ELISA reader(Bio Rad, Japan) 등을 사용하여 측정하였다.

세포배양. Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주은행(Korean Cell Line Research Foundation)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 Gibco사의 fetal bovine serum(FBS)를 10%, 100 U/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 72시간 배양하였다. Cell 배양 dish에 cell의 밀도가 2~3×10^6 /ml 정도가 되게 계대 배양하여 5% CO_2 조건으로 cell 상태를 유지하였다. 실험을 할 때는, 80%의 confluency와 20회 이하 passages 조건을 준수하여 실험 시, 실험 전 12시간은 FBS를 제거한 배지로 cell를 배양시켰다.

Nitric Oxide 측정. NO 측정은 cell의 supernatant에서의 nitric oxide(NO)의 량을 nitrite and nitrate로서 측정을 하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent(Sigma, USA)를 사용하였으며, 6well plate에 2×10^6개의 cell을 confluence가 80% 일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양시킨 후에 PA 50 μM을 control 군을 뺀 모든 well에다 넣어서 자극시켰다. 2시간 후에 시료를 60-80 μg/ml의 농도로 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 시간별로 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 차광시켜 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다.

$$\text{저해율}(\%) = (1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가 군의 흡광도}}) \times 100$$

Western blotting에 의한 iNOS 발현 측정. NO 측정은 cell의 s Raw cell 농도에 따라서 처리한 sample을 준비한 다음 Raw cell의 confluence가 80% 때에 DMEM배지를 거두어내고 무혈청 배지인 EMEM배지로 교환한 후에 약물을 처치하여 위와 같은 조건으로 배양한 후에 적정시간에 상징액은 제거한 후 PBS로 2회 세척하고 scrapper로 cell을 수확한 후에 lysis buffer를 넣어서 세포를 용출시켰다. 수확된 protein은 BSA (bovine serum albumin)으로 작성한 standard curve에 OD값을 대입시켜서 protein량을 보정하였다. 그 후에 coomassie blue로 염색하여 재보정한 후에 western sample로 사용하였다.[8] SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 electrophoresis한 후에 gel를 떼어내어서 transfer buffer에 10~15분 정도 담근 후 transfer buffer에 스펀지 2장을 깔고 그 위에 filter paper 1장 올려놓고 3 mm paper와 nitrocellulose filter도 buffer에 살짝 담근 후 양쪽 스펀지와 2 mm paper 사이에 nitrocellulose paper 그리고 gel를 잘 밀착시킨 후에 전극을 꽂아서 transfer시켰으며, 190 mA에서 1시간 이상 transfer한 후에 ponceau S에 2분 정도 담근 후에 band를 확인하였다. PBS로 2회 씻은 후 꺼내서 blocking buffer로 overnight시켜 background는 제거시켰다. 2번 씻은 후에 1 : 1,000으로 1차 antibody를 붙인 후 2차 antibody를 1 : 1,000 동안 붙인 후, PBS tween으로 수차례 세척한 후에 ECL kit(Amersham Pharmacia, England)를 사용하여 film에 옮겼다.

결과 및 고찰

알로에 추출물이 Raw cell의 Nitric Oxide production에 미치는 영향. NO는 free radical 중의 하나로서, 매우 불안정한 분자이다. NO는 산소나 superoxide에 의하여 NO_2, N_2O_3, N_2O_4, nitrite(NO_2-) 및 nitrate(NO_3-)와 같은 안정한 nitrogen oxide로 바뀌어진다[9]. NO는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 만들어지며, NOS는 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 endothelial NOS(eNOS) 및 neuronal NOS (nNOS)와 염증성 인자 등에 의해 유도되는 inducible NOS (iNOS)로 분류할 수 있다.[10] Fig. 1은 알로에 자체가 염증 유발에 관여하는지 여부를 판단하기 위하여 PA로 염증을 유도시키지 않은 Raw 264.7 cell에 알로에 추출물을 60 및 80 μg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO량을 측정한 결과이다. 그 결과 현탁액 처리군과 청징액 처리군 모두 알로에 추출물을 첨가하지 않은 Raw 264.7 cell 배양액인 control군에 비해 NO양의 증가가 관찰되지 않아 알로에 자체가 염증유발 반응에 직접적으로 관여 하지 않는 것으로 나타났다.

알로에 추출물이 PA로 염증이 유도된 Raw cell의 Nitric Oxide production에 미치는 영향. PA로 염증이 유도된 Raw 264.7 cell의 NO production에 대한 알로에 추출물의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 알로에를 60 및 80 μg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO량을 측정한 결과 Fig. 2에서와 같이 알로에 현탁액 처리군의 경우 베라 처리군에서는 PA 처리군에 비해 NO의 양이 증가하였으나, 센스 처리군에서 80 μg/ml의 농도 처리에 의해 PA 처리군보다 상대적으로 낮은 NO 생성량을 나타내었다. Byun 등[11]은 현삼 메탄올 추출물에서, Kim 등[12]은 상황 물추출물에서 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향을 관찰한 결과 NO 생성량이 억제된 결과를 나타내었다고 보고하였으며, 본 실험의 결과 알로에도 NO 억제활성을 나타냄으로 인해 염증억제제로 활용할 수 있을 것이라 판단되었다.

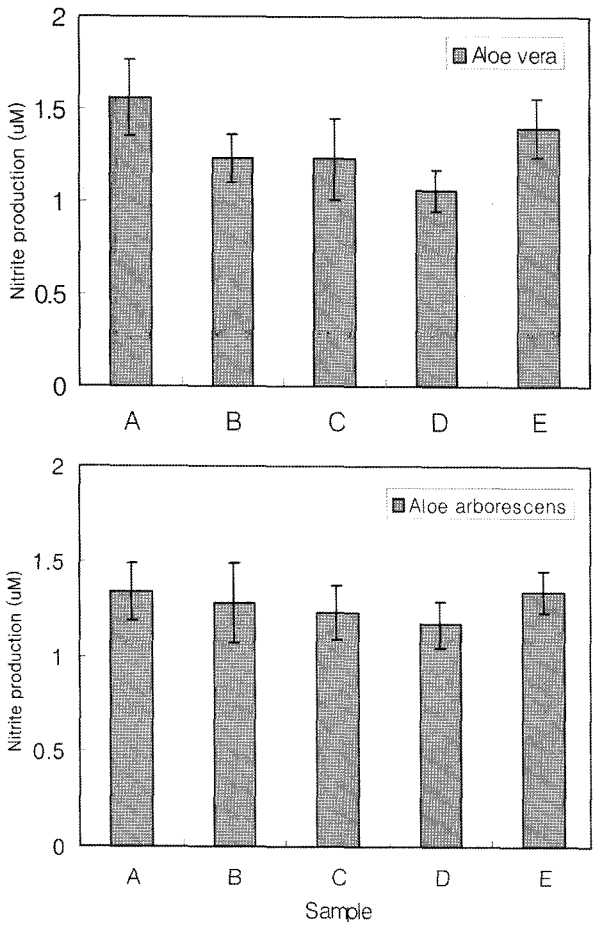

Fig. 1. Effects of Aloe vera and Aloe arborescens on the production of NO in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 60 and 80 μg/m*l* concentrations of Aloe dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of PA (50 μg/m*l*), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with nine separate experimets. A: Control, B: 60 μg/m*l* suspension extracts treatment, C: 80 μg/m*l* suspension extracts treatment, D: 60 μg/m*l* clearing extracts treatment, E: 80 μg/m*l* clearing extracts treatment.

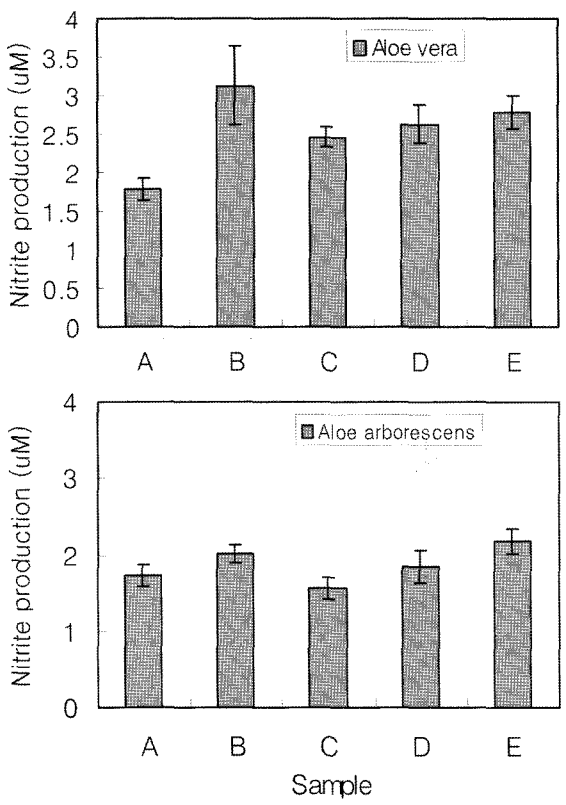

Fig. 2. Effects of Aloe vera and Aloe arborescens the production of NO in PA stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 60 and 80 μg/m*l* concentrations of Aloe dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of PA (50 μg/m*l*), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with nine separate experimets. A: 50 μM phosphatidic aid (PA) treatment, B: 60 μg/m*l* suspension extracts treatment, C: 80 μg/m*l* suspension extracts treatment, D: 60 μg/m*l* clearing extracts treatment, E: 80 μg/m*l* clearing extracts treatment.

알로에 추출물이 PA로 염증이 유도된 Raw cell의 iNOS 발현에 미치는 영향. iNOS는 바이러스를 포함하는 전염성의 병원체에 대하여 방어하는 역할을 하며, 여러 염증 질환, 순환계 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려지고 있다.[13,14] NO 생성 억제기작에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사한 결과 Fig. 3에서와 같이 Raw cell에서 PA처치에 의해 iNOS 발현이 현저히 증가하였으며, 알로에 베라 및 센스 추출물 처리에 의해 iNOS 발현은 모든 실험군에서 PA에 비해 상대적으로 증가함을 나타내었으나, clearing extract 처리의 농도가 60 μg/m*l*에서 80 μg/m*l*로 높아질수록 density가 감소하는 억제현상이 관찰되어 적절한 처리 농도만 제시 된다면 염증억제 효과도 나타낼 수 있을 것이라 추측되었다. So 등[15]은 대식세포에서 산더덕에 의해 iNOS 발현이 억제되었다는 결과를 보고하였으며, Byun 등[11]은 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS 발현에 미치는 영향을 조사한 결과에서도 처치군에서 iNOS 발현이 감소한 결과를 나타내었다고 보고하였다.

알로에 추출물이 PA로 염증이 유도된 Raw cell의 COX-2 발현에 미치는 영향. Prooxidant나 proinflammatory stimuli(i.e. TPA, LPS, TNFα, ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NFκB의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다.[16,17] 또 monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1β, TNF-α와 LPS, fibroblast growth factor 등에 의해서 증식하고 glucocorticioid와 IL-4, IL-13에 의해 발현 억제가 유도된다. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료 target molecule이 되고 있다. 본 실험에서 PA 처리시 COX-2 단백질이 유도되었으며, 알로에 베라를 처리한 실험군에서는 PA 처리군에 비해 상대적으로 높은 값을 나타내었으나 처리 농도가 높아질수록 농도의존적인 억제 양상이 나타났으며, 알로에 센스 처리구의 경우 Fig. 4에서와 같이 현탁액처리 및 청징액 처리구 모두 PA 처리구에 비해 매우 낮은 COX-2

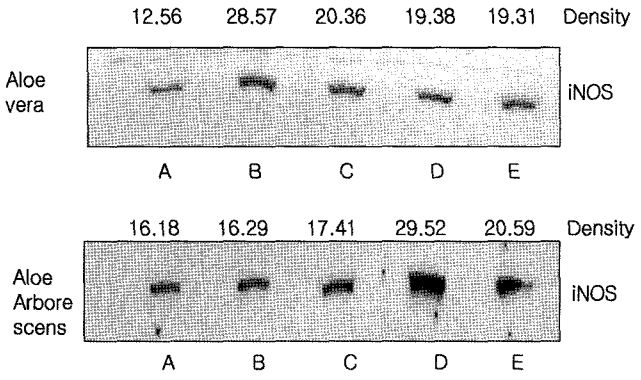

Fig. 3. Effects of Aloe vera and Aloe arborescens the production of iNOS in PA stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 60 and 80 μg/m*l* concentrations of Aloe dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of PA (50 μg/m*l*), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with nine separate experimets. A: 50 μM phosphatidic aid (PA) treatment, B: 60 μg/m*l* suspension extracts treatment, C: 80 μg/m*l* suspension extracts treatment, D: 60 μg/m*l* clearing extracts treatment, E: 80 μg/m*l* clearing extracts treatment.

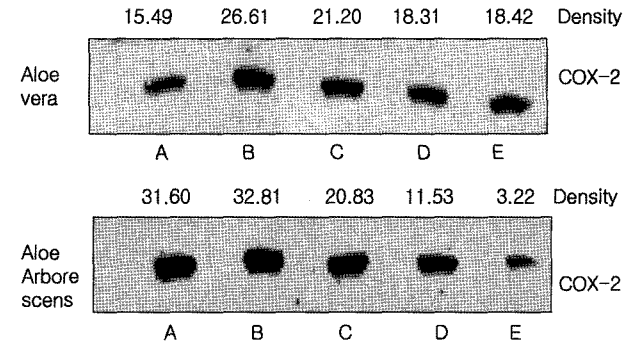

Fig. 4. Effects of Aloe vera and Aloe arborescens the production of COX-2 in PA stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 60 and 80 μg/m*l* concentrations of Aloe dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of PA (50 μg/m*l*), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with nine separate experimets. A: 50 μM phosphatidic aid (PA) treatment, B: 60 μg/m*l* suspension extracts treatment, C: 80 μg/m*l* suspension extracts treatment, D: 60 μg/m*l* clearing extracts treatment, E: 80 μg/m*l* clearing extracts treatment.

의 양이 확인되어 염증억제 효과가 우수한 것으로 판단되었다 ($p<0.01$). Byun 등[11]은 현삼 메탄올 추출물 처리에 의해 COX-2의 량이 현저히 줄어들었으며, Kim 등[12]은 상황 물 추출물에 의해 COX-2 발현에는 변화가 없었다는 결과와 비교해 보아, PA에 의한 iNOS와 COX-2의 발현은 둘 다 염증반응에 관련된 분자이지만 처리하는 약제에 의한 결과는 서로 다른 기전을 가지고 있는 것으로 판단되며 이에 대한 연구는 차후 지속적으로 이루어져야 한다고 생각된다.

초 록

알로에 베라와 알로에 센스 추출물에 의한 phosphatidic acid (PA)로 염증을 유발한 Raw 264.7 세포에서 항염증 효과를 측정하였다. 알로에 자체는 염증반응에 관여하지 않았으며, 알로에 추출물들이 PA 처리에 의해 증가된 염증관련 COX-2의 발현을 억제함으로서 항염증 효과가 있음이 확인되었다.

Key words: 알로에 베라, 알로에 센스, 항염증

참고문헌

1. John, S. H. (1990) A drug for all seasins medical and pharmacological history of aloe. Bull. N.Y. *Acad. Med.* **66**, 647-659.
2. Fujita, K., Teraira, R. and Nagatsu, T. (1976) Bradykininase acitivity of aloe extracts. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 205-209.
3. Yagi, A., Harada, N., Yamada, H., Iwadare, S. and Nishioka, I. (1982) Antibradykinin active material in *Aloe saponaria*. *J. Pharm. Sci.* **71**, 1172-1175.
4. Grindlay, D. and Reynolds, T. (1986) The *Aloe Vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parencyma gel. *J. Ehnopharmacol.* **16**, 117-151 .
5. Jung, M. H. (1998) Usefulness of aloe food. Symposium on health foods, pp. 15-25.
6. Chung, J. H., Rubin, R. J. and Cha, Y. N. (1993) Effect of vitamin K_1 and menadione on rthanol metabolism and toxicity. *Drug Chem. Toxicol.* **16**, 383-394.
7. Chung, J. H., Cha, Y. N. and Rubin, R. J. (1994) Role of quinone reductase in ethanol metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **124**, 123-130.
8. Minter, M., Towbin, J., Harter, J. and McCabe, E. R. (1989) Enzyme product blot for nondestructive assay of protein catalytic function in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* **178**, 22-26.
9. Gross, S. S. and Wolin, M. S. (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 737-769.
10. Stuehr, D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Acta* **411**, 217-230.
11. Byun, S. H., Yang, C. H. and Kim, S. C. (2005) Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF-α, IL-1β, IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 164.7 cells. *Kor. J. Herbol.* **20**, 7-16.
12. Kim, S. C., Jung, Y. S., Lee, J. R., Kim, Y. W., Byun, B. H., Kwon, T. K., Suh, S. I., Byun, S. H. and Kwon, Y. K. (2004) Inhibition effect of Phellinus lgniarius water extract on TNF-α, IL-1β, IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 164.7 cells. *Korean J. Ori. Phy. Pathol.* **18**, 880-886.
13. Kroncke, K. D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 147-156.
14. Oshima, H. and Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253-264.
15. So, M. S., Lee, J. S. and Yi, S. Y. (2004) Inhibition of nitric oxide and cytokines in Macrophages by *Codonopsis lanceolata*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 986-990.

16. Suh, Y. J. (2002) Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* **40**, 1091-1097.
17. Suh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* **480**, 243-268.