

椒皮의 RAW264.7세포에서의 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide 및 전염증사이토카인 생성억제효과

박용기^{#*}

동국대학교 한의과대학 본초학교실

Inhibitory effects of *Zanthoxylum piperitum* on the LPS-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in RAW264.7 cells

Yong-Ki Park^{#*}

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

ABSTRACT

Objectives : The fresh young leaves and dried fruits of *Zanthoxylum piperitum* (Korean name: Chopi) are used as diuretics, stomachics, anthelmintic and for the treatments of disorders of the digestive organ in Asia. We investigated inhibitory effects of *Zanthoxylum piperitum* extract on lipopolysaccharide(LPS)-induced production of nitric oxide(NO) and pro-inflammatory cytokines including TNF- α and IL-1 β from RAW264.7 mouse macrophage cells.

Methods : After methanol extract of *Zanthoxylum Fructus* (*Zanthoxylum* extract) was pretreated in RAW264.7 cells, the cells were stimulated with LPS. Cell toxicity of *Zanthoxylum* extract was assayed by MTT assay. The production of NO from the cells was measured in culture medium by Griess reaction. The production of TNF- α and IL-1 β from the cells was measured in culture medium by ELISA.

Results : *Zanthoxylum Fructus* extract greatly inhibited the production of inflammatory mediators such as NO, TNF- α and IL-1 β from LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conclusion : This result suggests that *Zanthoxylum* extract may have an anti-inflammatory effect through the inhibition of inflammatory mediators.

Key words : Anti-inflammation, IL-1 β , LPS, NO, RAW264.7 cells, TNF- α , *Zanthoxylum piperitum*

#*제1저자, 교신저자: 박용기, 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 054-770-2661 · E-mail: yongki@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2006년 11월 1일 · 수정 : 2006년 11월 19일 · 채택 : 2006년 12월 20일

서 론

椒皮(*Zanthoxylum Fructus; Chopi*)는 운향과(Rutaceae)에 속하는 낙엽교목인 초피나무(*Zanthoxylum piperitum* A.P. DC.)의 성숙한 쟁을 乾燥한 것으로 한국, 일본, 중국, 필리핀 등 동북아시아에 자생하며 특유한 향기와 신맛, 각종 정유성분과 유지가 함유되어 있어서 예로부터 어린잎과 과실을 전통적인 향신료, 약용, 제유용으로 사용되어 왔다. 한방에서는 가을에椒皮의 열매를 따서 햇빛에 말려 써는 제거한 후 위한, 소염, 이뇨, 심복통, 설사, 이질, 구충제로서 사용되었으며 위장을 자극하여 신진대사를 향진시키고, 위염, 소화장애, 위하수증에 유용한 것으로 알려져 왔다^{1,2,3)}. 그 외에도椒皮는 해독살충제 및 신경통, 관절염, 폐결핵, 급만성 위장병, 냉증, 신경통, 중풍 등의 치료에 이르기까지 그 용도가 다양하며, 민간에서는 동상치료제로椒皮 나뭇가지를 삶아낸 물을 쓰기도 한다⁴⁾. 또한 최근에는椒皮의 에탄올추출물이 항균 활성을 보이는 것으로 알려져 새로운 기능성 식품소재로 부각되고 있고 있기도 하다⁵⁾.

염증반응(inflammation)은 상처부위 등을 통해 침입한 외부 미생물(항원)들에 대한 비 특이적 면역 반응으로서, 대식세포(macrophage)를 포함한 면역세포들이 항원침입이나 조직손상과 같은 자극에 의해 손상 부위로 이동하여 항원을 제거하는 일련의 과정을 염증반응이라고 부른다. 대식세포들은 조직사이를 직접 이동하거나 혈관벽을 통과하여 목표장소까지 이동하게 되는데, 이렇게 항원이 있는 곳으로 혈액 중의 면역세포를 유인하기 위하여 혈관이 확장되고, 결과적으로 조직이 불어지게 되며, 다양한 생리활성물질들이 분비되어 통증이 나타나게 된다. 염증반응이 일어나면 항원이 효과적으로 제거되지만 그 반응이 오히려 과도하게 나타나거나 지속적으로 나타나게 되면 주변조직이 손상되어 급성 또는 만성 염증질환의 발병원인이 되기도 한다. 특히 외부 항원의 자극으로 활성화된 대식세포는 염증반응을 매개하는 것으로 알려진 interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α 등의 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 및 활성산소종(reactive oxygen species; ROS), 질소종(nitric oxide; NO), prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증매개자들(inflammatory mediators)을 분비함으로써 염증반응 및 염증질환 발달에 중심적인 역할을 하게 된다^{6,7)}.

NO는 세포내 다양한 생물학적 기능을 나타내는 intracellular messenger로 알려져 있으며⁸⁾, NO 합성효소(NO synthase; NOS)에 의해 L-arginine으로부터

합성되는데 발생장소에 따라 endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS) 및 inducible NOS(iNOS)로 나누어진다. 이들 중 iNOS는 bacterial endotoxin인 lipopolysaccharide(LPS)나 interferon-γ와 같은 사이토카인 및 amyloid β 등의 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 발현됨으로써 다량의 NO 분비를 유도하게 된다^{8,9,10)}. 이렇게 활성화된 대식세포로부터 과도하게 분비되는 NO는 염증반응이 일어나는 동안 세포독성을 유발하게 되며 급성 또는 만성 염증반응을 일으키는 주요 원인이 된다^{11,12)}.

LPS는 염증을 유발하는 주요 자극원으로서, 대식세포를 자극하면 NO, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18, TNF-α, monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage inflammatory peptide-1α(MIP-1α), 및 macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 등 세포독성물질을 유도함으로써 조직 내 염증반응을 촉진하게 된다^{6,13,14)}. TNF-α와 IL-1β는 대표적인 전염증성 사이토카인으로서 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 다량 분비되어 폐혈증(septic shock), 류마티스 관절염, 퇴행성뇌질환과 같은 염증성질환 발달에 매우 중요한 역할을 하는데, 최근 보고에 따르면 TNF-α의 증가가 당뇨나 비만과 같은 대사성질환에서 인슐린 저항성을 유도하며^{13,15)}, 류마티스 관절염의 경우 염증의 심한정도(disease severity)에 비례하여 TNF-α와 IL-1β가 증가하고¹⁶⁾, 허혈이나 알츠하이머 질환과 같은 퇴행성뇌질환에서 활성화된 대식세포로부터 다량의 TNF-α가 분비되어 병발달에 기여하는 것으로 알려지고 있다^{17,18)}. 따라서 최근 NO, TNF-α, IL-1β와 같은 염증매개물질의 생성이나 활성을 억제함으로써 염증질환을 치료할 수 있는 항염증 효과를 지닌 약제 발굴 및 치료제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{19,20,21)}.

따라서 본 연구는椒皮가 LPS 자극에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 NO 및 TNF-α와 IL-1β를 효과적으로 억제할 수 있는지 조사하여椒皮抽出物의 항염증효과를 검증하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1.椒皮抽出物의 제조

본 실험에 사용한椒皮는 영천에서 직접 채집하여 건조시킨 후 마쇄한 것(1kg)을 80% MeOH로 가열 추출하였으며 이를 2겹 거어즈로 여과한 다음, 회전식 증발기(rotary vacuum evaporator)로 농축하고

동결건조하여 -80°C에서 보관하였다(yields of 11.32%). 椒皮 抽出物을 세포에 처리할 때는 DMSO에 녹인 후 사용하였다.

2. 세포배양

쥐의 복강대식세포주(peritoneal macrophage line)인 RAW264.7 세포는 10% FBS 및 100U/mL penicillin과 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3. 세포독성검정

RAW264.7 세포를 5×10⁴cells/well로 계수하여 96-well culture plate(Nunc.)의 각 well에 100μl 배지와 함께 배양한 다음, 다양한 농도(1~1000 μg/ml)의 椒皮 抽出物을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 여기에 50μl의 MTT 용액(Roche)을 넣고 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, 100μl의 solubilization 용액 첨가하여 formazan 결정을 용해하였다. 이를 overnight 배양한 다음, microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 550~600nm에서 흡광도를 측정하였다. 椒皮 抽出物의 세포독성은 무처리구 100%를 기준으로 상대적인 세포생존도(cell viability)를 퍼센트(%)로 나타내었다.

4. Nitric oxide 생성량의 측정

RAW264.7 세포로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양은 세포배양액 중 존재하는 NO₂ 형태를 Griess 시약반응을 이용하여 측정하였다. 즉, RAW264.7 세포를 5×10⁵cells/ml로 계수하여 24-well plate에 배양하고 여기에 椒皮 抽出物을 다양한 농도로 처리하여 30분간 배양하였다. 이후 1μg/ml LPS를 처리하여 세포를 활성화시켰으며 24시간 배양 후 세포 배양액을 수거하였다. 50μl의 수거된 배양액에 100μl의 Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 넣고 15분간 암반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도(pM)는 NaNO₂ 표준액을 기준으로 측정된 농도를 기준으로 환산하여 계산하였다.

5. 사이토카인의 측정

RAW267 세포로부터 분비된 TNF-α와 IL-1β의 양은 세포배양액으로부터 Ready-Set-Go mouse TNF-α CytoSetsTM Biosource ELISA kit(eBioscience)와 Ready- Set-Go mouse IL-1β ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 먼저, 1× coating solution에 회색한 capture Ab(×250) 100μl를 96-well plate(Nunc ELISA plate)의 각 well에 넣은 후 40°C에서 overnight 반응을 시켰다. Plate를 0.05% Tween-20이 포함된 PBS-T로 3회 세척한 다음, 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 assay solution을 넣어 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. Assay 용액을 제거한 다음 세포 배양액과 TNF-α 표준액을 100μl씩 넣어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 5회 PBS-T로 세척한 후 detection antibody(×250) 100μl를 넣고 1시간 실온에서 반응시켰다. Plate를 PBS-T로 3회 세척하고 Avidin-HRP solution을 넣은 다음 30분간 실온에서 암반응 시켰다. 이후 각 well을 3회 세척하였다. 여기에 substrate solution을 넣고 15분간 암반응 시킨 후 반응정지액 50μl를 첨가하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF-α와 IL-1β의 농도(pg/ml)는 표준액(recombinant protein)의 표준정량곡선을 기준으로 계산하였다.

6. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균±평균표준오차 (standard deviation; SD)로 나타내었으며 통계학적 분석은 ABI prism의 Student t-test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과

1. 椒皮 抽出物의 독성검정

椒皮 抽出物의 세포독성을 조사하기 위해서 RAW264.7 세포에 1~1000μg/ml 농도의 椒皮 抽出物을 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. RAW264.7 세포에 椒皮 抽出物의 1μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml, 200μg/ml 및 500μg/ml 농도를 처리하였을 때, 세포생존도는 무처리구와 비교하여 각각 96.8± 3.1%, 101.0± 3.3%, 91.5± 2.7%, 91.1± 2.9%, 90.3± 2.8%, 80.6± 2.3%, 24.7± 1.6%, 및 10.9± 7.5%로 측정되었다(fig. 1). 따라서 椒皮 抽出物은 250

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 RAW264.7 세포의 생존도를 급격히 감소시켜 강한 독성을 나타내었으며, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하 농도에서는 독성이 없는 것으로 조사되었다.

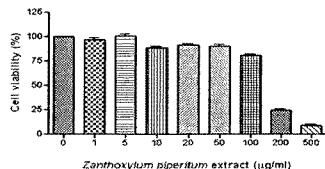


Fig. 1. Cell cytotoxicity of *Zanthoxylum piperitum* extract in RAW264.7 cells. After cells(5×10^4 cells/well) were cultured with various concentrations of *Zanthoxylum* extract with LPS for 24h, cell viability was measured in the culture supernatants by MTT assay. The results show mean value of three independent experiments(SD - bars).

2. 椒皮抽出物의 NO 생성 억제효과

椒皮抽出物이 LPS로 자극받은 대식세포로부터 분비되는 NO의 양을 조절할 수 있는지 조사하기 위해서椒皮抽出物을 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $5\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$, $25\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 세포에 처리한 후 세포 배양액의 NO 양을 Griess reagent로 측정하였다. RAW264.7 세포에서 LPS 단독처리에 의해 생성되는 NO의 양은 $21.6 \pm 0.96\mu\text{M}$ 였으며, 무처리구에서는 $3.1 \pm 0.2\mu\text{M}$ 로 거의 NO가 검출되지 않았다. LPS에 의해 RAW264.7 세포로부터 생성된 NO는椒皮抽出物 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $5\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$, $25\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 처리하였을 때, $21.6 \pm 0.3\mu\text{M}$, $22.7 \pm 0.4\mu\text{M}$, $22.1 \pm 0.06\mu\text{M}$, $21.1 \pm 0.4\mu\text{M}$, $16.3 \pm 0.6\mu\text{M}$ 및 $10.8 \pm 0.2\mu\text{M}$ 농도로 측정되었으며, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의椒皮抽出物 처리농도에서 LPS에 의해 유도된 NO의 양이 각각 1.3배, 2배씩 감소된 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 LPS 자극으로 활성화된 RAW264.7 세포로부터 분비되는 NO가椒皮抽出物 처리에 의해 유의적으로 억제되어지는 것을 알 수 있었다.

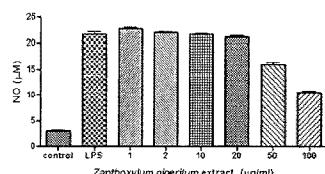


Fig. 2. Inhibitory effect of *Zanthoxylum piperitum* extract on LPS-induced nitric oxide production from RAW264.7 cells. The cells(5×10^5 cells/ml) were incubated with various concentrations of *Zanthoxylum* extract in the presence of LPS($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24h. NO production from the cells was determined in culture supernatant by Griess reagent. * $p < 0.05$ vs. LPS-treated group, n=3.

3. 椒皮抽出物에 의한 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성억제효과

椒皮抽出物이 LPS에 의해 유도되는 염증사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성을 억제시키는지 조사하기 위해서 다양한 농도의椒皮抽出物을 RAW264.7 세포에 각각 처리한 다음, 24시간 배양하여 LPS에 의해 활성화된 세포로부터 분비되는 TNF- α 의 양을 세포배양액으로부터 ELISA로 측정하였다.

먼저 TNF- α 생성(Fig. 3)은 무처리구에서 $0.54 \pm 0.34\text{pg}/\text{ml}$ 로 측정되었으며, LPS 자극 후 $26.9 \pm 0.84\text{pg}/\text{ml}$ 로 증가하였다. RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 TNF- α 의 양은椒皮抽出物을 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $5\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$, $25\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였을 때, 각각 $24.4 \pm 3.1\text{pg}/\text{ml}$, $26.1 \pm 0.4\text{pg}/\text{ml}$, $25.8 \pm 0.3\text{pg}/\text{ml}$, $24.5 \pm 0.6\text{pg}/\text{ml}$, $20.7 \pm 3.1\text{pg}/\text{ml}$ 및 $14.5 \pm 4.7\text{pg}/\text{ml}$ 로 검출되었다. RAW264.7 세포에서 LPS 자극으로 유도된 TNF- α 생성은椒皮抽出物 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리에서 유의적으로 감소되어椒皮抽出物이 세포로부터 TNF- α 의 생성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 한편, IL-1 β 의 생성(Fig. 4)은 무처리구에서 $0.85 \pm 0.46\text{pg}/\text{ml}$ 로 거의 측정되지 않은 반면, LPS 단독처리 후 $2.89 \pm 0.23\text{pg}/\text{ml}$ 로 증가하였다. LPS 처리에 의해 RAW264.7 세포로부터 생성된 IL-1 β 는椒皮抽出物 농도 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $5\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$, $25\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 후, 각각 $3.02 \pm 0.05\text{pg}/\text{ml}$, $2.89 \pm 0.19\text{pg}/\text{ml}$, $2.57 \pm 0.03\text{pg}/\text{ml}$, $2.47 \pm 0.11\text{pg}/\text{ml}$, $2.31 \pm 0.04\text{pg}/\text{ml}$ 및 $2.19 \pm 0.02\text{pg}/\text{ml}$ 로 다소 감소되었다.

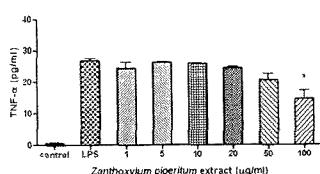


Fig. 3. Inhibitory effect of *Zanthoxylum piperitum* extract on LPS-induced TNF- α production from RAW264.7(B) cells. The cells(5×10^5 cells/ml) were incubated with various concentrations of *Zanthoxylum* extract in the presence of LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24h. TNF- α production from the cells was determined in culture supernatant by ELISA. * $p<0.05$ vs. LPS-treated group, n=3.

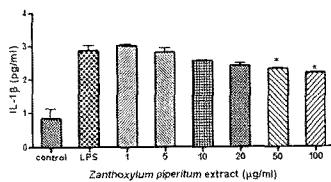


Fig. 4. Inhibitory effect of *Zanthoxylum piperitum* extract on LPS-induced IL-1 β production from RAW264.7(B) cells. The cells(5×10^5 cells/ml) were incubated with various concentrations of *Zanthoxylum* extract in the presence of LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24h. IL-1 β production from the cells was determined in culture supernatant by ELISA. * $p<0.05$ vs. LPS-treated group, n=3.

고 칠

염증반응은 외부항원에 의해 활성화된 다양한 면역세포들에 의해 매개되는 복잡한 과정이며, 대식세포는 TNF- α , IL-1 등의 전염증사이토카인이나 eicosanoids, ROS, NO, superoxide(O₂⁻)와 같은 염증매개자들을 과도하게 분비함으로써 다양한 면역병태적(immunopathological) 현상들을 조절하는데 중심적인 역할을 한다²²⁾. 대식세포는 LPS, IFN- γ , TNF- α 또는 β -amyloid 등의 자극에 의해 활성화된 후 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하게 되는데, 이러한 NO의 과도한 생성은 표적 세포와 조직에 강력한 독성과 염증을 유발함으로써 염증성질환으로 발달하게 한다^{22,23,24)}. 따라서 염증반응이 이루어지는 동안 유의적으로 증가하는 NO의 생성을 효과적으로 차단할 수 있는 친연물 재료에 대한 연구가 최근 한방 약제를 중심으로 많이 이루어지고 있으며, 다양한 염증질환의 유용한 치료도구로 기대를 모으고 있다^{25,26)}.

椒皮는 예로부터 독특한 향과 신맛으로 식욕을 촉진하는 향신료로 사용되어 왔으며, 항균활성이 있어 원인균의 생장과 번식을 억제시킬 수 있고, 채소

나 저장과실에 처리하면 부패되는 것을 막을 수 있다 고 알려져 있다^{1,2,3,4,5)}. 또한椒皮는 limonene, citronellal, phellandrene, sanshoool 및 flavonoid 계열의 성분이 함유되어 있어서 방향성, 건위, 소염, 이뇨, 구충제로서도 사용되어 왔고, 위장을 자극하여 신진대사를 향진시키거나 위하수증, 위확장 등에 유용하게 사용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한椒皮는 기타 식욕증진이나 치통, 신경통, 저혈압증, 냉증, 감기, 지사체, 중풍 등의 치료에도 사용하고 있는 것으로 보고되고 있다³⁾. 따라서椒皮는 새로운 기능성 식품소재로서의 활용 가능성이 최근 검토되고 있으며, 나아가 위염, 퇴행성 뇌질환, 류마티스 관절염, 혈관성 부종 등 주요 염증질환들을 대상으로 기존에 사용하고 있던 부작용이 많던 치료제의 대안소재로서 그 개발 가능성이 검토되고 있다. 본 연구에서도 LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포가 과도하게 생성하는 NO 및 염증사이토카인을椒皮抽出物이 효과적으로 억제시킴으로서 항염증효과를 나타내는 것을 확인되었으며椒皮의 염증질환치료제로서의 개발 가능성이 있는 것으로 나타났다. 즉,椒皮抽出物은 세포독성이 나타나지 않는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리 시 RAW264.7 세포로부터 LPS에 의해 유도되어지는 NO의 생성을 약 2배 이상 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 활성산소종의 일종인 NO는 short-lived free radical로서 혈관 내 항상성을 유지시키고 뇌에서 신호전달 및 항암, 세포독성 등에 관여하는 세포신호전달자이며, LPS 자극에 의해 대식세포로부터 L-arginine으로부터 iNOS에 의해 NO free radical이 생성되면, 산소와 쉽게 결합하여 peroxynitrite(ONOO⁻)를 형성하고 pro-oxidant molecule인 NO가 다량 생성되는데 이들은 손상된 조직이나 세포에 세포독성을 통해 염증반응을 나타내게 된다^{8,12,22,25)}. 특정약물의 NO 및 iNOS 생성에 대한 cellular mechanism이 아직 밝혀져 있지는 않지만, NO 생성을 억제하는 약물의 경우 전처리에 의해 iNOS promoter activity가 억제되거나, iNOS 유전자의 전사(transcription)를 억제하는 것으로 알려져 있다^{27,28)}. 본 연구에서椒皮抽出物 처리는 대식세포에서의 과도한 NO 생성을 효과적으로 억제하였기 때문에椒皮抽出物이 iNOS 유전자 발현 역시 억제시키는 것으로 보여진다. 나아가 특정약물에 의한 NO 생성 억제효과는 ROS 제거와 연관되는데, ROS는 MAPKs 및 nuclear transcription factors c-Jun 및 NF- κ B 등을 활성화시키는 것으로 알려져 있기 때문에,椒皮抽出物의 NO 생성 억제 효과도 ROS 제거

및 ROS와 연관된 신호전달경로에 영향을 줄 것으로 예상된다. 즉, ROS 신호전달경로가 대식세포 활성화의 일반적인 경로이며 세포독성의 매개 및 신호전달자로서의 기능을 모두 나타내게 된다²⁹⁾. 한편, LPS에 의해 자극을 받은 대식세포는 ERK1/2, JNK, p38 등의 mitogen -activation protein kinase(MAPK)와 NF-κB의 활성화로 이어지는 LPS 신호전달경로를 거치게 되어 TNF-α, IL-1 등의 염증사이토카인을 다량으로 분비하게 되며, iNOS mRNA 발현을 유도하여 iNOS 합성경로에 의존적으로 NO를 생성하게 된다^{21,27,28)}. 이렇게 생성된 NO 및 염증사이토카인들은 결국 염증질환의 병태생리와 연결되어 병발달에 기여하게 된다. 특히 TNF-α는 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 다량 분비되어 폐혈증(septic shock)이나 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에서 병 발달에 매우 중요한 역할을 하는 사이토카인이며, TNF-α의 증가는 암, 악액질(cachexia), 당뇨, 비만 등 대사성질환에서 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 보고되어 있다^{14,15)}. 또한 최근에는 대식세포의 LPS 인식기전의 이해 및 염증유발 관련 유전자의 발굴, 나아가 이들의 조절을 통한 염증질환 치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 과도하게 분비되는 TNF-α를 효과적으로 억제시킬 수 있는 약제 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다^{19,21)}. 본 연구에서 椒皮 抽出物은 LPS 신호전달 경로를 거쳐 활성화된 대식세포로부터 생성되는 TNF-α 및 IL-1β의 생성을 유의적으로 감소시킨 것으로 나타났다. 따라서 전염증사이토카인 생성을 감소시킬 수 있는 椒皮 抽出物이 다양한 염증성 질환의 치료에 적용할 수 있음을 알 수 있었다. TNF-α 억제효과를 지니는 특정약물의 분자생물학적 작용기전은 일반적으로 TLRs(toll-like receptors)를 통한 LPS 인식과 PI3-kinase/Akt, ERK1/2, JNK, p38 등의 MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 및 NF-κB 활성화와 연관되는 것으로 알려져 있다^{14,15,20)}. 따라서 TNF-α 및 NO 생성을 억제하는 椒皮 抽出物의 항염증 효과 역시 대식세포에서 LPS 자극과 연관되는 MAPK, NF-κB 및 ROS 등의 신호전달경로를 차단함으로써 TNF-α 및 iNOS 유전자 발현을 억제시키는 것과 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구를 통해 椒皮 抽出物이 TNF-α, IL-1β와 같은 전염증사이토카인 및 NO의 과도한 생성을 효과적으로 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타내며, 이런 椒皮 抽出物은 단독 또는 기타

약재와의 혼합을 통해 다양한 염증성 질환 개선을 위한 치료제로 활용할 수 있을 것이다.

결 론

항염증 효과가 탁월한 전통 한방약재를 발굴하고 효능을 검사하기 위해 椒皮 抽出物을 제조하고 RAW264.7 쥐 대식세포주를 이용하여 항염증효과를 검증하였다. 椒皮 抽出物에 의한 세포독성은 100μg/ml 농도에서 없는 것으로 나타났다. LPS 처리에 의해 RAW264.7 세포로부터 생성된 NO는 100μg/ml의 椒皮 抽出物을 처리했을 때, 2배 이상 감소되었다. 또한 RAW264.7 세포로부터 LPS에 의해 유도된 TNF-α와 IL-1β의 생성은 椒皮 抽出物 처리 후 유의적으로 감소하였다. 따라서 椒皮 抽出物이 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 생성되는 NO 및 염증사이토카인 생성을 감소시킴으로써 항염증효과를 보이는 것으로 검증되었다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Masakazu A. Chemical studies on the constituents of sdible plants(part 2): Flavonoid compounds in leaves of *Xanthocylum piperitum* DC. J. Home Econ. Jpn., 1983;34:223-236.
- Jing L and Kubota K. Formation by mechanical stimulus of the compounds in young leaves of Japanese pepper(*Xanthocylum piperitum* DC.). J. Agric. Food Chem. 2001;49:1353-1357.
- Park JH, Park SS and Kim JM. Pharmacognostical studies on the "Cho Pi Na Mu'. Kor. J. Pharmacogn. 2002;33:75-80.
- 김주덕. 초피 추출액을 이용한 항균성 물질의 산업화에 관한 연구. 한국미용학회지 133.
- Kim J, Cho YS, Sdae KI, Joo OS and Shim KH. Antimicrobial activities of *Xanthocylum schinifolium* and *Zanthoxylum* extractleaves. Kor. J. Postharvest Sci. Technol. 2000;7:195-200.
- Lundberg IE. The role of cytokines,

- chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Report.* 2000;2:216-224.
7. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 2003;14:188-198.
8. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
9. Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide from microglial cells. *J. Neurochem.* 1992;59:897-905.
10. Moilanen E, Whittle B, Moncada S. Nitric oxide as a factor in inflammation. In: Gallin JL, Snyderman R, editor. *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* Philadelphia: Williams and Wilkins; 1999, p787-800.
11. Kharitonov S, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-135.
12. Epe B, Ballmaier D, Roussyn I, Brivida K, Sies H. DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzyme. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:4105-4110.
13. Meme W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J.* 2006;20:494-6.
14. Guha M and Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 2001;13:85-94.
15. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 1998;273:974-80.
16. Altomonte L, Zoli A, Mirone L, Scolieri P, Magaro M. Serum levels of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and interleukin-2 in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity. *Clin Rheumatol.* 1992;11:202-5.
17. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke.* 1997;28:1233-44.
18. Merrill JE. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev Neurosci.* 1992;14:1-10.
19. L. Sautebin, Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy, *Fitoterapia.* 2000;71:S48 - S57.
20. A. Hobbs, A. Higgs and S. Moncada, Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191 - 220.
21. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q.* 2000;22:11-6.
22. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
23. G.C. Brown, Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase, *FEBS Lett* 1995;693:136 - 139.
24. E. Moilanen, B. Whittle and S. Moncada, Nitric oxide as a factor in inflammation. In: J.I. Gallin and R. Snyderman, Editors, *Inflammation: basic principles and clinical correlates,* Williams and Wilkins, Philadelphia. 1999:787 - 800.
25. A. Hobbs, A. Higgs and S. Moncada, Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191 - 220.
26. L. Sautebin, Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy, *Fitoterapia.* 2000;71:S48 - S57.
27. S. Moncada, R.M. Palmer and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol Rev.* 1991;43:109 - 142.
28. H. Kleinert, C. Euchnerhofer, I. Ihrig-Biedert and U. Forstermann, Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B, *Mol*

- Pharmacol. 1996;49:15 - 21.
29. Jhun BS, Jin Q, Oh YT, Kim SS, Kong Y, Cho YH, Ha J, Baik HH, and Kang I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses LPS-induced TNF-alpha production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/A γ activation in RAW264.7 murine macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004;318:372-380.