

# 전갈 메탄올추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 nitric oxide 및 cytokine에 미치는 영향

최준혁<sup>1</sup> · 이종록<sup>1</sup> · 지선영<sup>1</sup> · 김상찬<sup>1,2\*</sup>

1: 대구한의대학교 한의과대학, 2: 한방신약개발연구팀(BK21)

## Inhibitory Effect of Scorpion MeOH Extract on Nitric Oxide and Cytokine Production in Lipopolysaccharide - Activated Raw 264.7 Cells

Jun Hyeok Choi<sup>1</sup>, Jong Rok Lee<sup>1</sup>, Seon Young Jee<sup>1</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2\*</sup>

1: College of Oriental Medicine, 2: Development Team for The New Drug of Oriental Medicine(BK21 program), Daegu Haany University

Scorpion (SCP) has been clinically used for the treatment of endogenous wind to relieve convulsion, clearing away toxins, resolving hard masses and removing obstruction in the collaterals to relieve pain. Recent studies showed that scorpion toxins that affect the activating mechanism of sodium channels and indian black scorpion venom induced anti-proliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. There is lack of studies regarding the effects of SCP on the immunological activities. The present study was conducted to evaluate the effect of SCP on the regulatory effects of cytokines and nitric oxide (NO) for the immunological activities in Raw 264.7 cells. After the treatment of SCP MeOH extract dissolved in media for 1 h prior to the addition of lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/ml), cell viability was measured by MTT assay, NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) was determined by immunoblot analysis, and levels of cytokine were analyzed by sandwich immunoassays. As results, SCP inhibited the production of nitrite and nitrate (0.3 and 1.0 mg/ml), iNOS and p-IκBα protein, tumor necrosis factor-α (0.3 and 1.0 mg/ml), interleukin-1β (0.3 and 1.0 mg/ml) and interleukin-6 (1.0mg/ml) in Raw 264.7 cells activated with LPS. These findings suggest that SCP can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

Key words : Scorpion, iNOS, LPS, cytokine

### 서론

全蝎 (Scorpion; SCP)은 전갈과 (Buthidae)에 속하는 절족동물인 全蝎 (Buthus martensi KARSCH)의 건조체로서, buthotoxin, lecithin, trimethylamine, betaine, taurine, cholesterol, stearic acid, palmitic acid 등을 함유하고 있다<sup>1,2)</sup>.

全蝎은 味辛, 性平하고 入肝經하여 熄風止癇, 解毒散結, 通絡止痛의 효능을 나타내며, 急慢驚風, 中風面癱, 破傷風, 瘡瘍腫毒, 癰癤結核, 偏正頭痛, 風濕痺痛 등을 치료하며<sup>2,3)</sup>, 腦血栓, 偏頭痛, 顏面痙攣, 骨 및 關節結核, 淋巴腺結核, 乳腺炎, 小兒厭食症,

化膿性中耳炎, 火傷, 癩癧 등의 치료에 응용된다<sup>2)</sup>.

全蝎에 대한 연구로는, 김 등<sup>4)</sup>이 全蝎약침액이 돌연변이원성을 억제함을 보고하였으며, 백 등<sup>5)</sup>은 全蝎이 혈소판 응집을 억제하며, 또한 전뇌허혈의 혼수시간을 유의하게 단축시키며, β-amyloid에 의해 유도된 세포독성을 억제함을 보고하였다. 또한 이 등<sup>6)</sup>은 全蝎이 NK cell의 세포활성 및 암세포의 손상을 증가시키는 보고하였으며, 송 등<sup>7)</sup>은 全蝎약침액이 흰쥐의 관절활막내 interleukin-1β (IL-1β), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor-α (TNF-α), prostaglandin E2 (PGE2)의 함량을 유의하게 줄임을 보고하였으며, Cho 등<sup>3)</sup>은 全蝎약침이 IL-1으로 유도된 1차성 골관절염 인체 연골세포에 대한 항염증 효과를 보고하였다.

이와 더불어, 全蝎은 강압작용, 진정작용, 항경련작용, 항종양작용, 항근작용, 항염증작용등으로 연구되고 있으나, 대식세포

\* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학  
 · E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247  
 · 접수 : 2007/04/26 · 채택 : 2007/05/15

에 대한 쏜뿔의 효능에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구는 쏜뿔 (SCP)의 메탄올 추출물이 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 nitric oxide (NO) production, inducible nitric oxide synthase (iNOS), inhibitory kappa B (IkB), phospho-IkB (p-IkB)의 발현 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 추출물의 제조

꼬리와 발을 제거한 쏜뿔 (SCP; Daewon, Daegu, Korea) 300g을 MeOH 3L에 넣고 4일간 추출한 다음 추출물을 거여즈로 1차 여과하고 3000 $\times$ g에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 0.2 $\mu$ m filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. SCP의 수율은 9.83%였으며 실험에서 SCP는 배지에 녹여 사용하였다.

### 2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

### 3. 시약

LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (USA), Cayman (USA), Zymed (USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (USA)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 분주한 다음 SCP를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1 - 3.0 mg/ml의 농도로 SCP를 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 dimethyl sulfoxide (DMSO) 에 녹여 TiterTek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존

율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

[i.e. viability (% control) = 100 $\times$ [(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

### 5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 TiterTek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

### 6. Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 $\times$ g로 10분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하였다. iNOS의 발현은 antimouse iNOS antibody를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, p-IkB와 IkBa protein은 anti p-IkB, 및 IkBa antibody를 사용하여 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 p-IkB, IkBa protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

### 7. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells (1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml)을 분주하고 SCP를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

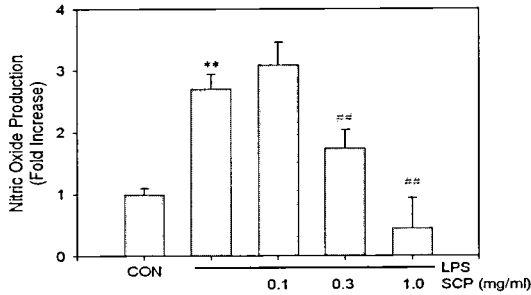
### 8. 통계적 검증

실험 결과는 mean $\pm$ S.D로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

## 결 과

1. SCP가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향  
Raw 264.7 cell에서 SCP의 NO 생성억제정도를 관찰하기

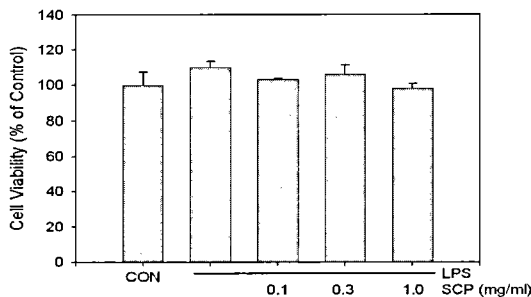
위하여 SCP를 0.1-1.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 2.7배 증가하였으며, SCP를 0.3, 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 유의성있게 NO의 생성을 억제하였다. 특히 SCP 1.0 mg/ml의 농도에서는 NO의 생성을 완벽히 억제하였다 (Fig. 1).



**Fig. 1. Inhibition of NO production by SCP in Raw 264.7 cells.** Raw 264.7 cells were treated with 0.1 - 1.0 mg/ml of SCP dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 18 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the methods section. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01).

2. SCP가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

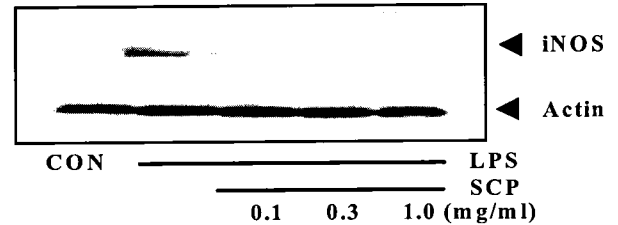
SCP가 0.3 및 1.0mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, SCP의 세포독성으로 인한 cell death에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, SCP의 농도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 SCP의 0.3 및 1.0mg/ml의 농도는 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 SCP가 NO의 생성을 억제할 수 있는 효능이 있음을 의미한다 (Fig. 2).



**Fig. 2. The cell viability was measured after indicated time.** Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments.

3. SCP가 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS의 발현에 미치는 영향

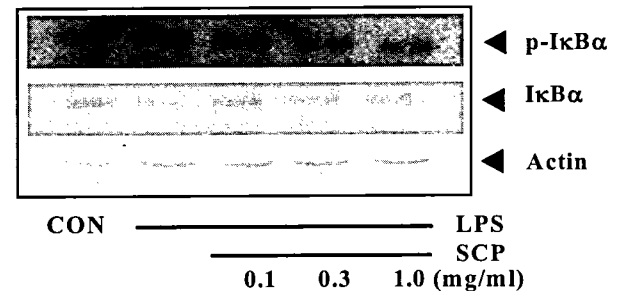
NO 생성 억제에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 유도되었으나, LPS에 SCP를 0.1, 0.3, 1.0 mg/ml을 처리한 전 실험군에서 iNOS의 양이 현저히 감소하였다 (Fig. 3).



**Fig. 3. Effect of SCP on the induction of iNOS by LPS.** The level of iNOS protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without SCP pretreatment (i.e. 1h before LPS). Actin is used as a loading control.

4. SCP가 LPS로 유도된 Raw cell의 p-IκB발현에 미치는 영향

바이러스나 박테리아의 감염에 의해 활성화되는 NFκB는 iNOS나 TNF-α유전자의 발현에 관련된다. 안정적 상황에서 NFκB는 세포질에서 inhibitory molecule인 IκBα, IκBβ, IκBε, p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NFκB signaling cascade가 활성화된다. 본 연구에서 phospho-IκBα는 LPS에 의해 발현이 증가되었으며, SCP 0.1, 0.3 및 1.0 mg/ml를 처리한 실험군에서는 p-IκBα의 양이 감소하였다. 한편, 인산화되지 않은 IκBα는 LPS에 의해 그 발현이 감소하였으며, SCP의 前處置는 IκBα의 발현량을 증가시켰다 (Fig. 4).



**Fig. 4. Effect of SCP on the induction of p-IκBα and IκBα by LPS.** The level of p-IκBα and IκBα protein were monitored 15min after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without SCP pretreatment (i.e. 1h before LPS). Actin is used as a loading control.

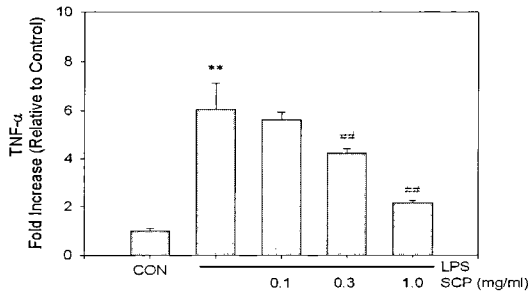
5. SCP가 LPS로 유도된 Raw cell의 TNF-α에 미치는 영향

TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 하며, 대식세포와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성 염증성 반응과 관련되어 있다. 본 실험에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SCP 0.3 및 1.0 mg/ml은 농도 의존적으로 TNF-α를 감소시켰다 (Fig. 5).

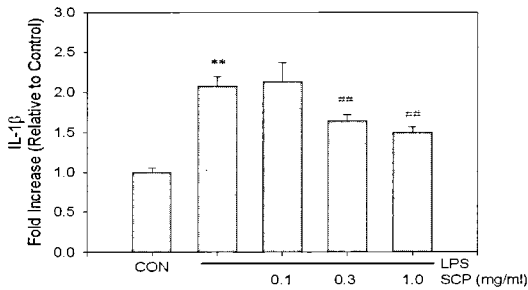
6. SCP가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1β에 미치는 영향

IL-1β는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF-α, IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1β는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation을 활성화한다. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SCP 0.3 및 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1β를 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰다 (Fig. 6).

## 고찰



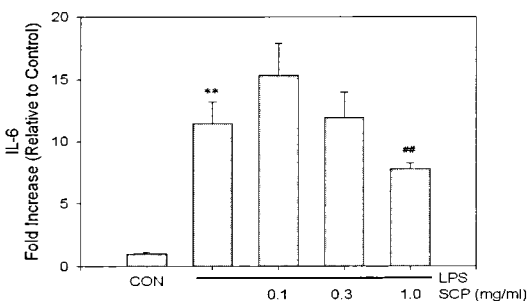
**Fig. 5. The effect of SCP on LPS-inducible TNF- $\alpha$  production.** Production of TNF- $\alpha$  was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of SCP for 18 h. The amount of TNF- $\alpha$  was measured by immunoassays as described in methods section. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01).



**Fig. 6. The effect of SCP on LPS-inducible IL-1 $\beta$  production.** Production of IL-1 $\beta$  was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of SCP for 12 h. The amount of IL-1 $\beta$  was measured by immunoassays as described in methods section. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01).

### 7. SCP가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-6에 미치는 영향

주로 대식세포의 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 역할을 한다. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SCP는 1.0 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 IL-6를 유의하게 감소시켰다 (Fig. 7).



**Fig. 7. The effect of SCP on LPS-inducible IL-6 production.** Production of IL-6 was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of SCP for 6 h. The amount of IL-6 was measured by immunoassays as described in methods section. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01).

全蝎은 전갈과 (Buthidae)에 속하는 절족동물인 全蝎 (Buthus martensi KARSCH)의 건조체로서, buthotoxin, lecithin, trimethylamine, betaine, taurine, cholesterol, stearic acid, palmitic acid 등을 함유하고 있으며, 蝎尾의 毒은 독성단백질인 buthotoxin이 주성분이며 毒腺中에는 hydroxylamine을 함유하고 있다<sup>1)</sup>. 또한 全蝎은 As, Ba, Bi, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ph, Sn, Sr, Zn, Ca, Mg, K, Na, Al, Si, P 등의 무기물을 함유한다<sup>2)</sup>.

全蝎은 味辛, 性平하고 入肝經하여 熄風止癢, 解毒散結, 通絡止痛의 효능을 나타내며, 急慢驚風, 中風面癱, 破傷風, 瘡瘍腫毒, 癩癧結核, 偏正頭痛, 風濕痺痛 등을 치료하며<sup>2,3)</sup>, 腦血栓, 偏頭痛, 顏面痙攣, 骨 및 關節結核, 淋巴腺結核, 乳腺炎, 小兒厭食症, 化膿性中耳炎, 火傷, 癩癧 등의 치료에 응용된다<sup>2)</sup>. 약리작용으로는 혈관확장작용, 강압작용, 진정작용, 항경련작용, 항간간작용, 항종양작용, 항균작용등이 알려져 있다<sup>9)</sup>.

현재까지 全蝎에 대한 연구로는, 김 등<sup>4)</sup>은 全蝎약침액이 2-AF 및 B[a]P, 2-AA에 의해 야기되는 돌연변이원성을 억제함을 보고하였으며, 백 등<sup>5)</sup>은 全蝎이  $\beta$ -amyloid에 의해 유도된 PC12 cell의 세포독성을 억제함을 보고하였다. 또한 이 등<sup>6)</sup>은 全蝎물추출액이 마우스의 NK cell의 세포활성 및 비장세포의 증대, splenocyte의 증가를 유도하고 이로 말미암아 K562암세포의 손상을 증가시킴을 보고하였으며, 송 등<sup>7)</sup>은 全蝎약침액의 朮三里 (ST36)자침이 adjuvant 유발 흰쥐의 관절활막내 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , PGE2의 함량을 유의하게 줄임을 보고하였고, Cho<sup>8)</sup> 등은 全蝎약침이 IL-1으로 유도된 1차성 골관절염 인체 연골세포에 대한 항염증 효과 및 골 기능 효과에 대해 연구하였으며, IL-1 단독처리된 연골세포에 비해 全蝎약침액이 함께 처리된 연골세포에서 연골세포의 손실과 퇴화의 중요한 요소인 NO의 생산량이 의미있게 저하되었으며, IL-1 단독으로 처리된 연골세포보다 IL-1과 全蝎약침액이 함께 처리된 연골세포에서 iNOS mRNA의 단백질 합성이 의미있게 감소하였으며, 또한, 전사인자로서의 NF $\kappa$ B의 활성화가 IL-1 단독으로 처리된 연골세포에 비하여 全蝎약침액이 함께 처리된 군에서 상대적으로 의미있게 억제됨을 보고하였다.

본 연구는 全蝎 (SCP)의 메탄올 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 NO production, iNOS 발현 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

LPS에 의해 활성화된 macrophage cell모델은 여러 물질의 항염증효과를 평가하는 데에 널리 이용된다. LPS는 Gram-negative bacteria 외막의 주요 성분으로서, septic shock을 유도하고, NO, TNF- $\alpha$ , interleukin, prostanoid, leukotriene 등의 염증매개물질의 생산을 자극한다<sup>10-12)</sup>. 이러한 염증반응은 bacteria의 제거에 유리하게 작용하지만, 통제범위를 넘어선 과도한 염증반응은 TNF- $\alpha$ , IL-1 및 IL-6 등의 염증매개 cytokine을 다량 생산하게 되고, 이러한 염증매개물질들은 조직손상이나, 장기의 부전을 유발한다<sup>13)</sup>.

대식세포는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주

반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 reactive oxygen species (ROS) 와 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-6와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>17-19</sup>. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 靑黛<sup>20</sup>, 苦楝皮<sup>21</sup>, 香附子<sup>22,23</sup>, 當歸<sup>24</sup> 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

NO는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다<sup>25</sup>. Inducible NOS (iNOS)는 염증시 대량으로 생성되고, constitutively expressed NOS (cNOS)는 저농도에서 생리적으로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>26</sup>. NOSs는 cNOS와 iNOS로 나눌 수 있는데, cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 iNOS는 LPS, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1 및 TNF- $\alpha$ 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>20,21,27-29</sup>. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 SCP의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 SCP를 0.1-1.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성있게 증가하였으며, SCP를 0.3 및 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 유의성있게 NO의 생성을 억제하였다. SCP가 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, SCP의 세포독성으로 인한 cell 수의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, SCP의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 SCP의 0.1, 0.3 및 1.0 mg/ml의 농도는 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

NO 생성 억제에 관한 iNOS단백질은 immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 SCP 0.1, 0.3 및 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 현저히 줄어들었으며, SCP 농도 의존적으로 iNOS단백질의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

iNOS나 COX-2의 발현에 관여하는 전사조절인자로는 NF $\kappa$ B, AP-1, C/EBP등이 알려져 있으며<sup>30</sup>, 이들 중 대표적인 전사조

절인자는 NF $\kappa$ B이다<sup>31</sup>. NF $\kappa$ B는 세포자멸사의 억제, 세포주기조절 등과도 관련이 있으며<sup>32</sup>, virus나 bacteria 감염시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF- $\alpha$ 유전자의 발현에 관련된다<sup>30</sup>. Resting cell에서 NF $\kappa$ B는 세포질에서 inhibitory molecule인 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p105, p100등과 결합하여 비활성 형태로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NF $\kappa$ B signaling cascade가 활성화되면 I $\kappa$ B, p105, p100이 degradation되면서 NF $\kappa$ B가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. I $\kappa$ B protein의 종류는 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ 등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NF $\kappa$ B의 inhibitory protein은 I $\kappa$ B $\alpha$ 이다<sup>32</sup>. 본 실험에서 본 연구에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 phosphorylated form은 LPS에 의해 p-I $\kappa$ B $\alpha$  단백질의 증가가 유도되었으며, SCP를 처리한 실험군에서는 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 양이 농도 의존적으로 감소하였다. 한편, 인산화되지 않은 I $\kappa$ B $\alpha$ 는 LPS에 의해 발현이 감소하였으며, SCP의 전처리는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현량을 증가시켰다. 이러한 결과는 SCP가 LPS에 의해 유도되는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제함을 보여주고 있다. 이는 SCP에 의해 iNOS가 감소되는 기전에, NF $\kappa$ B의 translocation이 SCP에 의해 억제됨을 간접적으로 시사하는 것이라 할 수 있다.

TNF- $\alpha$ 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>30</sup>. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>33</sup>. 본 실험에서 LPS는 TNF- $\alpha$ 의 양을 유의하게 증가시켰으며, SCP는 0.3 및 1.0 mg/ml은 유의하게 감소시켰다. 한편, IL-1 $\beta$ 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 $\beta$ 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>33</sup>. 또한 IL-1은 septic shock, burn, 간식수술 후의 ischemia-reperfusion injury<sup>34</sup>의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다<sup>35</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SCP 0.3 및 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$ 를 유의성있게 감소시켰다. Monocyte나 macrophage에서 분비되는 또 다른 cytokine인 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>33</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SCP 0.3 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 유의하게 감소시켰다.

이러한 연구결과는 SCP가 LPS에 의해 활성화되는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제하고, 이러한 결과로 NO, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 감소를 유도함을 의미한다.

## 결론

全蝎 물추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 nitric

oxide, cytokine의 level, iNOS의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 쏜뿔은 IkB $\alpha$ 의 인산화를 억제하고, iNOS의 발현 및 NO의 생성량을 억제하였다. 또한 쏜뿔은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6등의 pro-inflammatory cytokine을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 쏜뿔 MeOH추출물이 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 nitric oxide 및 과량의 pro-inflammatory cytokine생성과 관련된 면역질환의 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

### 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

### 참고문헌

1. 서부일, 변성희, 김선희. 전갈에 관한 고찰. 제한동의학술원논문집. 1(1):146-160, 1999.
2. 鄭虎占, 董澤宏, 余靖 主編. 中藥現代研究與應用 (第五卷). 北京, 學苑出版社, pp 4898-4919, 1998.
3. 서부일, 최호영. 임상한방본초학. 서울, 永林社, p 724, 2004.
4. 김소형, 김갑성. 전갈 약침액의 항돌연변이 및 항암 효과. 대한침구학회지 17(3):151-167, 2000.
5. 백명현, 황영근, 정지천, 강정준, 김성훈. 전갈 유출물이 혈전증, 전뇌허혈 및 뇌세포독성에 미치는 영향. 동국한의학연구소논문집 8(1):171-190, 1999.
6. 이원훈, 정지천, 김종대, 윤철호, 서운교, 신현철, 이동목, 송해법, 이항우, 남경수. 전갈(*Buthus martensi Karsch*)이 마우스 Natural Killer 세포활성에 미치는 영향. 생약학회지 29(4):293-299, 1998.
7. 송인광, 최우식, 박준성, 이승덕, 김갑성. 전갈약침이 adjuvant 유발 흰쥐의 관절활액막내 cytokine 과 prostaglandin E2 에 미치는 영향. 대한침구학회지 19(2):177-188, 2002.
8. Cho Hyun-seok, Kim Kap-sung. Anti-arthritis Effects of *Buthus martensi KARSCH* Herbal Acupuncture, Inhibiting Interleukin-1-induced Expression of Nitric Oxide synthase and Production of Nitric Oxide in Human Chondrocytes. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibution Society 20(1):104-119, 2003.
9. 李尙仁, 安德均, 辛民教. 한약임상응용, 서울, 成輔社, p 490, 491, 1982.
10. Hewett, J.A., Roth, R.A. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. Pharmacol Rev. 45(4):382-411, 1993.
11. Kubes, P., McCafferty, D.M. Nitric oxide and intestinal inflammation. Am J Med. 109(2):150-158, 2000.
12. Watson, W.H., Zhao, Y., Chawla, R.K. S-adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for tumour necrosis factor alpha. Biochem J. 342(1):21-25, 1999.
13. Miyake, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. Trends Microbiol. 12(4):186-192, 2004.
14. Lee, Y.S., Kim, H.S., Kim, S.K., Kim, S.D. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 10(1):8-15, 2000.
15. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 144(4):1425-1431, 1990.
16. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med. 211(1):24-32, 1996.
17. Corbett, J.A., Mac Daniel, M.L. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. J. Exp. Med. 181(2):559-568, 1995.
18. Cetkovic-Cvrlje, M., Eizirik, D.L. TNF and IFN $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 6(4):399-406, 1994.
19. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39(10):52-58, 1999.
20. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated Raw 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 28(2):217-226, 2000.
21. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. Eur J Pharmacol. 406(3):301-309, 2000.
22. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Kwon, T.O., Yun, Y.G., Kim, N.Y., Chung, H.T. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol. 76(1):59-64, 2001.
23. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 항부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(3):771-776, 2003.
24. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. 대한한의학방제학회지 10(2):189-197, 2002.
25. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature.

- 333(6174):664-666, 1988.
26. Kubes, P. Inducible nitric oxide synthase; a little bit of good in all of us. *Gut*. 47(1):6-9, 2000.
  27. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. 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- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol*. 35(1):21-28, 2000.
  28. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 69(6):625-635, 2001.
  29. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in Raw 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 76(1):119-123, 2001.
  30. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by sauchinone effects on I- $\kappa$ B phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology*. 139(1):11-20, 2003.
  31. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 오미소독음이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 16(2):921-927, 2002.
  32. Chen, F., Castranova, V., Shi, X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 159(2):387-397, 2001.
  33. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 37(6):355-361, 2003.
  34. Casey, L.C., Balk, R.A., Bone, R.C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, 119(8):771-778, 1993.
  35. Takabayashi, T., Shimizu, S., Clark, B.D., Beinborn, M., Burke, J.F., Gelfand, J.A. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery*. 135(5):544-554, 2004.