

강활의 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증물질 생성에 대한 효과

김창민¹, 박용기^{1,2,*}

1: 동국대학교 한의과대학 본초학교실 2: 동국대학교 한방신약개발센터·한의학연구소

The Effects of Different Extracts of *Ostericum koreanum* on the Production of Inflammatory Mediators in LPS-stimulated RAW264.7 Cells

Chang Min Kim¹, Yong-Ki Park^{1,2,*}

1: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

2: Oriental Medicine Drug R&D Center and Oriental Medicine, Research Institute,
Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, the effects of ethylacetate extract of *Ostericum koreanum* on inflammation in RAW264.7 cells were investigated.

Methods : Dried roots of *Ostericum koreanum* was extracted with 80% methanol for 24 h, and then fractionated with n-butanol, n-hexan and ethylacetate. RAW264.7 cells, a mouse macrophage line were incubated with different concentrations of the extract for 30 min and then stimulated with LPS at indicated times. Cell toxicity was determined by MTT assay. The concentrations of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) were measured by Griess assay and enzyme immunoassay (EIA), respectively. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX) -2 mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blot.

Results : The methanol extract of *Ostericum koreanum* and its fractions were significantly inhibited the NO and PGE₂ productions in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Among the fractions of *Ostericum koreanum* the ethylacetate fraction was more strongly inhibited NO and PGE₂ productions compared with other fractions. The ethylacetate fraction was also suppressed LPS-induced mRNA expressions of iNOS and its protein levels in RAW264.7 cells.

Conclusions : This study suggests that the ethylacetate fraction of *Ostericum koreanum* may have an anti-inflammatory property through suppressing inflammatory mediator productions in activated macrophages, suggesting have a therapeutic potential for the treatment of various inflammatory diseases.

* 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한방신약개발센터·한의학연구소
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2009년 2월 20일 · 수정 : 2009년 3월 18일 · 채택 : 2009년 3월 20일

Key words : *Ostericum koreanum*, inflammation, macrophage, nitric oxide, prostaglandin E2

서론

염증반응은 인체 내 대부분의 기관에서 유발되는 기본적인 면역반응으로 급성(acute)과 만성(chronic)으로 나누어지는데¹⁾, 급성 염증반응은 물리적 자극이나 외부 감염 등에 의해 수분으로부터 수 시간 이내 즉각적으로 조직손상을 유발하게 된다. 반면 만성 염증반응은 급성보다 오래 걸리며 지속적이고, 단핵구나 대식세포, 림프구, 혈장세포 등의 浸潤을 동반하는 특징이 있으며, 조직괴괴와 치유과정을 통해 血管新生이나 纖維化를 유발하게 된다^{1,2)}.

대식세포(macrophage)는 동물체내 모든 조직에 분포하며 인체 내 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로서, 외부로부터 침입하는 이물질이나 세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 食菌作用을 하는 고전적인 기능과 함께 다양한 염증매개물질들을 분비하여 초기 염증반응에서 핵심적인 역할을 한다³⁾. 대식세포는 병원균과 같은 외부 자극원의 자극에 의해 활성화되어 혈관활성아민류(vascular amines), arachidonic acid metabolites(prostaglandins, leuko-triene, lipoxin 등), 염증사이토카인류(TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF), 혈소판활성인자(platelet activating factor), prostaglandin E₂, 산화질소(nitric oxide), 활성산소종(ROS) 등 다양한 염증매개물질들을 분비함으로써 면역조절을 통해 생체 내 방어기능과 항상성 유지 기능을 조절하는 반면, 염증을 유발하여 각종 肺疾患이나 만성 氣管支炎, 氣管支 천식, 류마티스 關節炎, 多發性硬化症, 退行性 腦疾患, 動脈硬化 등의 만성 염증질환으로의 진행에 기여하게 된다⁴⁻⁷⁾. 따라서 대식세포의 활성을 어떻게 조절되는 가를 이해하고, 활성화된 대식세포로부터 분비되는 각종 염증매개물질들을 억제시키는 것은 여러 원인에 의해 발생하는 염증질환의 진행을 막아줄 수 있는 유효한 접근방법이 될 수 있다^{7,8)}. 최근 複合處方이나 斷尾 韓藥材를 이용하여 각종 염증질환에서 대식세포의 활성조절과 항염증효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁹⁻¹⁴⁾.

강활(羌活, *Osterici Radix*, *Ostericum koreanum* Maximowicz)은 미나리과(繖形科; Umbelliferae)에 속하는 多年生 本草로서 根을 基源으로 한다¹⁵⁾. 강활은 《神農本草經》 上品의 獨活項目에 ‘一名羌活’이라 하여 獨活의 異名으로 “風寒所擊 金瘡 止痛 奔豚 癰瘻

女子疝瘕”를 치료한다고 처음으로 기재되어 강활과 독활의 구분이 없었으나^{16,17)}, 唐代의 《藥性本草》에서 처음으로 강활과 독활을 구별하였고, 우리나라 《東醫寶鑑》에서는 독활은 맛두릅의 뿌리로, 강활은 강호리로 구분하여 사용하고 있다¹⁸⁾. 현재 국내에서 사용되는 강활은 국내에서 재배되는 강활(羌活, *Ostericum koreanum* Maxi-mowicz)의 뿌리이며, 중국에서는 강활(羌活, *Notop-terygium incisium* Ting)과 寬葉羌活(*N. forbesii* Boissier)의 뿌리를 사용하고 있다¹⁹⁻²²⁾.

강활은 性味가 辛苦, 溫하고, 歸經은 肺, 膀胱, 腎經이며, 효능은 散寒, 祛風, 除濕, 止痛으로 外感風寒과 風濕에 인한 頭身疼痛과 風寒濕邪로 인한 關節疼痛을 치료하므로 感冒나 關節질환에 상용되고 있는 한약제이다^{15,23)}. 따라서 실제 임상에서는 感冒로 인한 解熱뿐 아니라 鼻塞, 咳嗽, 頭痛, 全身疼痛에 사용되고 있으며, 關節疾患으로 각종 痺證에 사용되고 皮膚瘙癢症에도 응용되고 있다²³⁾. 강활의 성분으로는 isoimperatorin, imperatorin, cnidilin, notoferol, marnesin, noda-kenetin 등의 coumarin 계열 화합물들과 p-hydro-xyphenethyl anisate, ferulic acid 등의 페놀류, β -sitosterol glucoside, β -sitosterol 등의 스테롤 화합물 등이 보고되어 있으며¹⁵⁾, 實驗研究로는 살모넬라균에 대한 抗菌效果²⁴⁾와 *N. incisium*의 cyclooxygenase와 5-Lipoxygenase 억제효과에 대한 보고가 있을 뿐²⁵⁾, 현재까지 국내에서 재배되고 있는 강활의 실험연구는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 국내에서 재배되는 강활(北羌活)의 메탄올추출물로부터 다양한 분획물(n-hexan, ethylacetate, n-butanol)을 분리하여 활성화된 대식세포로부터 유발되는 염증반응에 대한 억제효과를 조사하였으며, 이에 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

본 실험에 사용된 강활(北羌活)은 경상북도농업기술원 봉화고랭지약초시험장에서 재배한 1년생 강활의 뿌리를 10월 하순에 수확하여 물로 세척하고 열풍건

조기로 40°C에서 건조한 것을 시료를 사용하였다.

2) 시약

실험에 사용된 시약은 methanol, n-BuOH, n-Hexan, ethylacetate(Merck Co., Germany), lipopolysaccharide (LPS; E. coli B0111:B4; Sigma, St. Louis, MO), 3-(4,5-dimethyl thazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide (Sigma), TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), SuperScript® First-Strand Synthesis System(Invitrogen), Protein assay solution(BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA), 30% Acrylamide solution(BioRad Laboratories Inc.), NP-40 Cell lysis buffer(Invitrogen), UltraPure™ DEPC-Treated Water(Invitrogen), N-trityl-1,3-propanediamine acetate(Sigma), Sulfanilamide(Sigma Chemicals), anti-iNOS antibody(SantaCruz Co., Ltd, Santa Cruz, CA), anti-COX-2 antibody(Santa Cruz Co, Ltd), anti-COX-2(SantaCruz), PGE₂ EIA kit (R&D System, Inc., Minneapolis, MN) 등이다.

2. 방법

1) 강활 메탄올추출물 및 분획물 제조

건조된 강활의 뿌리(560 g)를 분쇄한 후 메탄올 2 L를 가하여 상온에서 24시간 동안 추출하였으며, 2겹 거여즈와 와트만여과지(No. 3)로 여과한 후 40°C에서 감압·농축하여 74 g의 메탄올추출물(OK-MeOH)을 얻었다(Fig. 1).

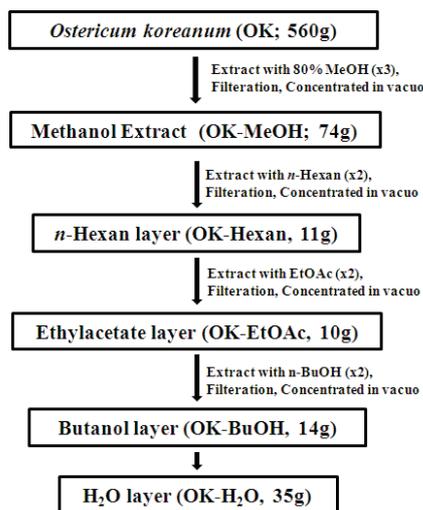


Fig. 1. Preparation of methanol extract of *Ostericum koreanum* and the fractionation by using various organic solvents

강활의 메탄올추출물 70 g을 물 1 L에 현탁하여 3 L 분액여두에 넣고, 헥산(n-hexan) 1 L를 첨가하여 24시간 실온에서 방치한 후 40°C에서 감압 농축하여 11 g의 헥산분획물(OK-Hexan)을 얻었다.

남은 물 현탁액에 에틸아세테이트(ethylacetate) 용매 1 L를 분액여두에 넣은 후 24시간 상온에서 방치하였으며, 40°C에서 감압·농축하여 10 g의 에틸아세테이트분획물(OK-EtOAc)을 얻었다. 다시 남은 물 현탁액에 부탄올(n-butanol) 용매 1 L를 넣어 24시간 경과 후 60°C에서 감압·농축하여 14 g의 부탄올분획물(OK-BuOH)을 얻었다. 마지막으로 남은 물 현탁액은 50°C에서 감압·농축하여 35 g의 물분획물(OK-H₂O)을 얻었다.

2) 세포배양

쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 ATCC로부터 구입하였으며, 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin·streptomycin이 포함된 Dul-becco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) 세포독성조사

RAW264.7 세포(5×10⁴ cells/well)를 96-well culture plate에 100 μl의 DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 여러 농도의 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 50 μl 씩 넣은 후 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 100 μl의 DMSO 용액을 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색정도를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성(cell toxicity)은 세포만 배양한 무처리군의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

4) Nitric oxide 측정

RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO의 양을 세포 배양액 중 존재하는 NO₂⁻의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용하여 측정하였다. 즉 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약물을 30분간 전처리한 다음, LPS(1 μg/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 100 μl에 동일한 양의 Griess 시약(0.1% NED/1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 넣은 후 15분간 암반응 하였다. 발색 정도를 microplate

reader의 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, 세포배양액 내 NO의 농도(μM)는 NaNO_2 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) Prostaglandin E_2 측정

활성화된 대식세포로부터 분리되는 염증물질인 prostaglandin E_2 (PGE_2)의 양을 세포배양액으로부터 효소면역반응법(Enzyme Immuno-Assay; EIA)을 이용하여 측정하였다. 즉 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약물을 처리하여 30분간 배양한 다음 LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 16시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 내에 존재하는 PGE_2 의 양을 측정하였으며, 세포배양액 내 존재하는 PGE_2 의 농도는 PGE_2 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

6) Reverse transcriptase(RT)-PCR

RAW264.7 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2의 유전자 발현에 대한 약물의 효과를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

먼저 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약물을 30분 동안 배양한 다음, LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 TRIzol 시약을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA와 oligo-(dT) primer, Improm-IITM reverse transcriptase를 이용하여 25°C 에서 10분, 42°C 에서 60분, 70°C 에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다.

합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA $1 \mu\text{g}$ 에 표1의 primers (sense, anti-sense) $1 \mu\text{l}$ 및 $10 \times$ buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 1U Tag polymerase를 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C 에서 30초, annealing을 위해 $55\text{--}60^\circ\text{C}$ 에서 30초 및 extension을 위해 70°C 에서 60초 조건에서 25-30 cycles을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDHs를 사용하였다.

Table 1. The Primers for PCR

Primer	Sequences
iNOS	Sense 5'-GAC CAG ATA AGG CAA GCA C-3'
	Antisense 5'-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC-3'
COX-2	Sense 5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'
	Antisense 5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'
GAPDH	Sense 5'-CTC GTG GAG TCT ACT GGT GT-3'
	Antisense 5'-GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT-3'

7) Western blot

RAW264.7 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 대한 약물의 효과를 조사하기 위해 Western blot을 수행하였다.

먼저, RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약물을 30분 동안 배양한 다음, LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 세포를 수거한 다음 HBSS 용액으로 2회 세척하고, lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) 0.1 ml로 lysis시켜 12,000 rpm에서 20분 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 protein assay solution으로 정량한 다음, 20 μg 단백질과 $2 \times$ sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)를 섞어 100°C 에서 3분 끓인 후 10-15% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 분리된 gel의 단백질을 NC membrane으로 transfer시킨 후 10% skim milk로 실온에서 1시간 blocking하였다. iNOS, COX-2 및 β -actin에 대한 일차항체를 0.05% Tween이 함유된 TBS-T로 희석하여 4°C 에서 하룻밤 반응시킨 후 TBS-T로 3회 세척하고 anti-IgG conjugated HRP 항체와 1시간 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T로 세척한 후 ECL 용액을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

8) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) \pm 표준오차 (standard deviation; SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 Graph Pad Prism program의 Student t-test를 수행하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성 검정

강활의 메탄올추출물(OK-MeOH) 및 분획물들의 세포독성을 MTT assay 방법으로 조사하였다(Fig. 2).

메탄올추출물은 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 세포생존율은 각각 $102.5 \pm 1.06\%$, $103.2 \pm 4.87\%$, $96.17 \pm 2.29\%$, $30.87 \pm 1.96\%$, $13.73 \pm$

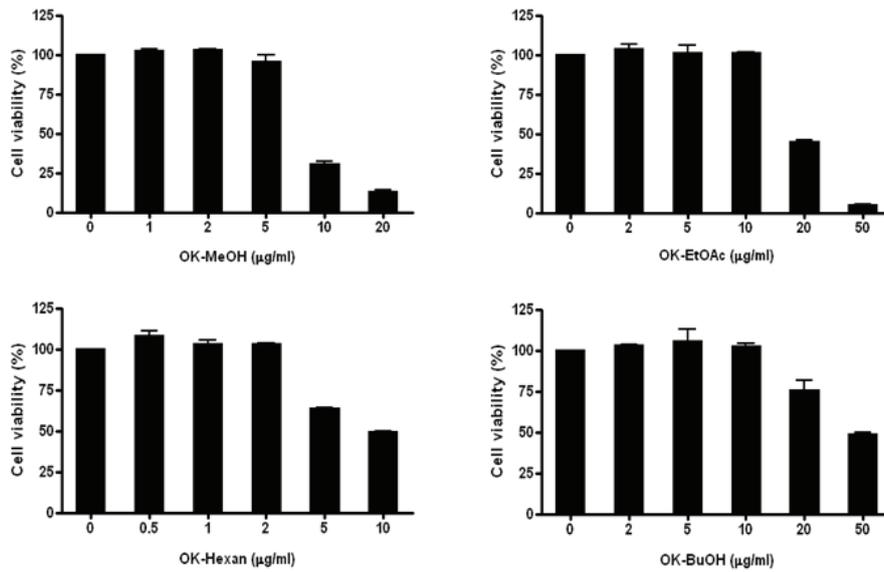


Fig. 2. Effects of the methanol extract of *Ostericum koreanum* and its fractions on the viability of RAW264.7 cells. Cells were treated with different concentrations of the methanol extract (OK-MeOH), ethylacetate fraction (OK-EtOAc), n-hexan fraction (OK-Hexan) and n-butanol fraction (OK-BuOH) for 24h, and cell viability was determined by MTT assay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars), and are shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells.

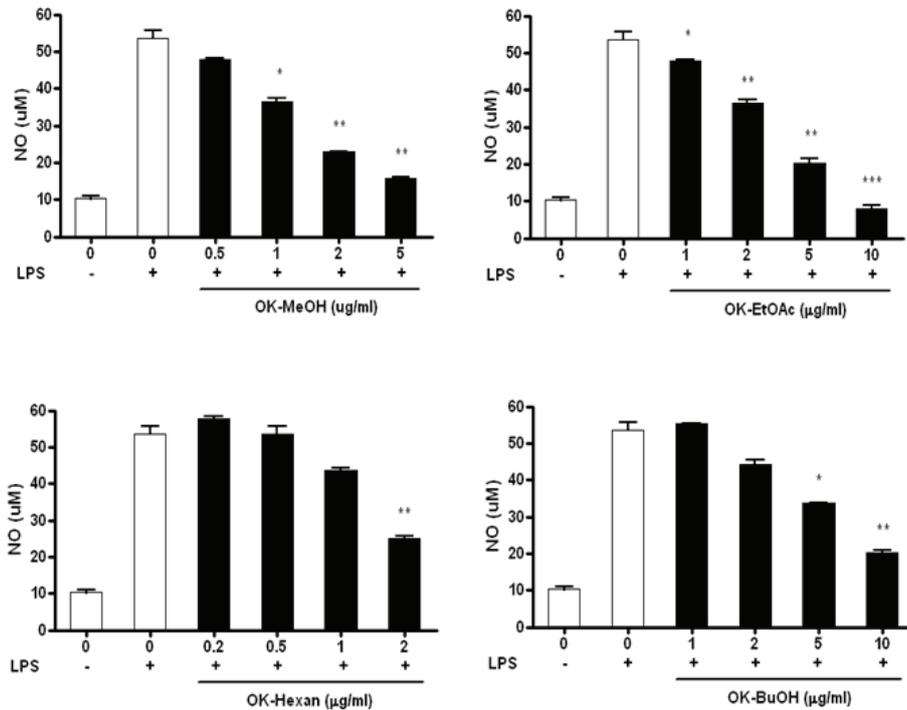


Fig. 3. Effects of the methanol extract of *Ostericum koreanum* and its fractions on NO production in LPS-stimulated of RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of the methanol extract(OK-MeOH), ethylacetate fraction (OK-EtOAc), n-hexan fraction (OK-Hexan) and n-butanol fraction (OK-BuOH) for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 µg/ml) for 24h. The nitrite concentrations in medium were determined by Griess assay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars), and asterisks indicate significantly different from treatment with LPS alone (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; and *** : $p < 0.001$).

0.73로 측정되어 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 독성이 없는 것으로 나타났다. 에틸아세테이트 분획물(OK-EtOAc)은 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 104.2 \pm 3.85%, 101.5 \pm 6.41%, 101.3 \pm 0.54%, 45.3 \pm 0.82%, 5.15 \pm 0.16%로 측정되어 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 독성이 없는 것으로 나타났으며, 헥산분획물(OK-Hexan)은 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 108.6 \pm 3.31%, 100.9 \pm 0.28%, 103.5 \pm 0.50%, 63.7 \pm 0.29%, 49.7 \pm 0.37%로 측정되어 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 독성이 없는 것으로 나타났고, 부탄올분획물(OK-BuOH)은 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 103.5 \pm 0.50%, 102.2 \pm 9.77%, 102.6 \pm 2.61%, 76.1 \pm 7.67%, 49.3 \pm 1.14%로 측정되어 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 이후 실험은 강활의 메탄올추출물 및 분획물들의 세포독성이 없는 농도범위에서 수행하였다.

2. NO 생성에 대한 효과

LPS에 의해 RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO에 대한 강활 메탄올추출물 및 분획물들의 억제효과

를 세포배양액으로부터 Griess assay 방법에 의해 측정하였다(Fig. 3).

먼저 세포만 배양하였을 때 세포배양액 내 NO의 농도는 5.19 \pm 0.27 $\mu\text{M/ml}$ 로 매우 낮게 측정되었으며, LPS에 의해 53.48 \pm 3.16 $\mu\text{M/ml}$ 농도로 현저히 증가되었다. 강활의 메탄올추출물(OK-MeOH)은 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서 각각 47.81 \pm 0.67 $\mu\text{M/ml}$, 36.56 \pm 1.35 $\mu\text{M/ml}$, 22.88 \pm 0.15 $\mu\text{M/ml}$, 15.71 \pm 0.68 μM 로 측정되어 농도 의존적이고 유의적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났다. 또한 에틸아세테이트분획물(OK-EtOAc)은 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리농도에서 각각 47.81 \pm 2.01 $\mu\text{M/ml}$, 36.56 \pm 1.56 $\mu\text{M/ml}$, 20.16 \pm 1.05 $\mu\text{M/ml}$ 및 7.96 \pm 1.08 μM 로 측정되어 처리 농도에 의존적이고 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. 헥산분획물(OK-Hexan)은 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 및 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서 각각 57.81 \pm 0.67 $\mu\text{M/ml}$, 53.48 \pm 3.16 $\mu\text{M/ml}$, 43.70 \pm 0.95 $\mu\text{M/ml}$ 및 24.96 \pm 1.21 $\mu\text{M/ml}$ 로 측정되었으며, 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의적으로 NO의 생성이 감소되었다. 부탄올분획물(OK-BuOH)은 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서 각각 55.31 \pm 0.02 $\mu\text{M/ml}$,

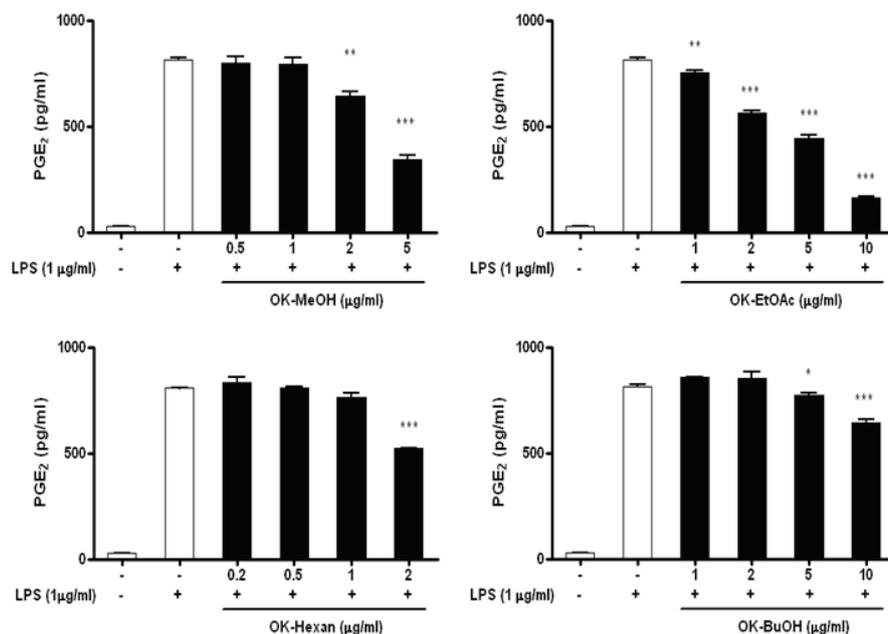


Fig. 4. Effects of the methanol extract of *Ostericum koreanum* and its fractions on PGE2 production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of the methanol extract (OK-MeOH), ethylacetate fraction (OK-EtOAc), n-hexan fraction (OK-Hexan) and n-butanol fraction (OK-BuOH) for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 18h. The PGE2 concentrations in medium were determined by enzyme-immunoassay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars), and asterisks indicate significantly different from treatment with LPS alone (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; and *** : $p < 0.001$).

44.14±1.80 μM/ml, 33.67±0.36 μM/ml 및 20.35±0.73 μM/ml로 측정됨으로써 5 μg/ml과 10 μg/ml농도에서 유의적으로 NO의 생성이 감소되는 것으로 나타났다.

이와 같이 강활의 메탄올추출물과 분획물들은 독성이 없는 농도범위 내에서 모두 유의적으로 NO 생성을 감소시키는 것으로 나타났으며, 특히 에틸아세테이트분획물이 NO 생성을 가장 많이 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

3. PGE₂ 생성에 대한 효과

LPS에 의해 RAW264.7 세포로부터 생성되는 PGE₂에 대한 강활 메탄올추출물 및 분획물들의 억제효과를 세포배양액으로부터 효소면역반응법에 의해 측정하였다(Fig. 4).

먼저 세포만 배양하였을 때 세포배양액 내 PGE₂의 농도는 28.4±1.35 pg/ml로 매우 낮게 측정되었으며, LPS에 의해 813.2±13.9 pg/ml 농도로 현저히 증가되었다. 강활의 메탄올추출물(OK-MeOH)은 0.5 μg/ml, 1 μg/ml, 2 μg/ml 및 5 μg/ml의 처리농도에서 각각 799.9±13.7 pg/ml, 791.5 ±52.3 pg/ml, 642.2±52.5 pg/ml, 342.2±32.7 pg로 측정되어 농도 의존적이고 유의적으로 PGE₂ 생성이 억제되는 것으로 나타났다. 에틸아세테이트 분획물(OK-EtOAc)은 1 μg/ml, 2 μg/ml, 5 μg/ml 및 10 μg/ml 처리농도에서 각각 751.9±16.2 pg/ml, 560.2±26.3 pg/ml, 443.7±27.4 pg/ml 및 160.6±14.2 pg/ml로 측정되어 처리 농도에 의존적이고 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. 헥산분획물(OK-Hexan)은 0.2 μg/ml, 0.5 μg/ml, 1 μg/ml 및 2μg/ml의 처리농도에서 각각 832.8±34.7 pg/ml, 808.5±10.2 pg/ml, 763.7±29.3 pg/ml 및 525.1±10.1 pg/ml로 측정되었으며, 2 μg/ml 농도에서 유의적으로 PGE₂의 생성이 감소되었다. 부탄올분획물(OK-BuOH)은 1 μg/ml, 2 μg/ml, 5 μg/ml 및 10 μg/ml의 처리농도에서 각각 846.2±10.94 pg/ml, 853.3±46.6 pg/ml, 773.3±15.8 pg/ml 및 641.4±30.7 pg/ml로 측정됨으로써 5 μg/ml과 10 μg/ml농도에서 유의적으로 PGE₂의 생성이 감소되는 것으로 나타났다.

따라서 강활의 메탄올추출물과 분획물들은 독성이 없는 농도범위 내에서 유의적으로 PGE₂ 생성을 감소시키는 것으로 나타났으며, NO에서와 마찬가지로 에틸아세테이트분획물이 PGE₂ 생성을 가장 많이 억제하는 것으로 나타났다.

4. iNOS 발현에 대한 효과

LPS에 의해 RAW264.7 세포로부터 발현되는 NO 합성효소인 iNOS에 대한 강활 메탄올추출물 및 분획물들의 억제효과를 RT-PCR 방법(Fig. 5A)과 Western blot 방법으로 조사하였다(Fig. 5B).

iNOS와 COX-2의 유전자 발현은 RAW264.7 세포만 배양하였을 때는 관찰되지 않았으며, LPS 처리 후 발현이 증가되었다. LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 유전자의 발현은 강활의 메탄올추출물(5 μg/ml)과 에틸아세테이트분획물(10 μg/ml)에 의해 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5A).

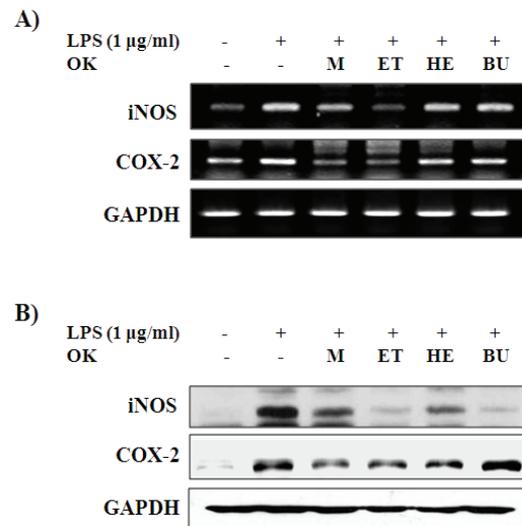


Fig. 5. Effects of the methanol extract of *Ostericum koreanum* and its fractions on the expressions of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated of RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of the methanol extract (OK-M; 5 μg/ml), ethylacetate fraction (OK-ET; 10 μg/ml), n-hexan fraction (OK-HE; 2 μg/ml) and n-butanol fraction (OK-BU; 10 μg/ml) for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 μg/ml) for 6h(for PCR) and 24 h (for Western blot). The mRNA expressions of iNOS and COX-2 were determined by RT-PCR, and their protein levels were determined Western blot, respectively.

또한 iNOS와 COX-2의 단백질 발현은 세포만 배양하였을 때는 거의 관찰되지 않은 반면, LPS 처리 후 발현이 현저히 증가하였다. 또한 강활의 메탄올추출물(5 μg/ml)과 에틸아세테이트분획물(10 μg/ml) 및 헥산분획물(2 μg/ml) 처리에 의해 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5B).

따라서 강활의 메탄올추출물과 분획물들 중 에틸아세테이트분획물이 LPS에 의해 유도되는 염증효소들인 iNOS와 COX-2의 유전자 및 단백질의 발현을

가장 효과적으로 억제시켜 NO와 PGE₂의 분비를 억제시킬 수 있는 것으로 나타났다.

고찰

염증반응은 어떤 자극에 대한 생체 조직의 비특이적 면역반응으로 조직의 變性, 순환장애와 滲出, 조직 增殖의 세 가지를 유발하는 복잡한 병변이다^{1,2)}. 대식세포는 초기 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로서 동물체 내 모든 조직에 존재하며 외부 이물질을 탐지하고 포식하여 죽은 세포를 제거하는 飽食作用과 TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)을 비롯하여 eicosanoids, ROS, NO, PGE₂, superoxide(O₂⁻) 등의 다양한 염증매개물질들을 분비하는 면역세포이다⁴⁻⁷⁾. 즉 외부자극으로부터 활성화된 대식세포는 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유발함으로써 천식, 기관지염, 관절염, 다발성경화증, 동맥경화증, 뇌졸중, 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성뇌질환 및 바이러스 감염으로 인한 염증질환 등을 유발하고, 질환을 악화시키는 데 기여하게 된다^{26,27)}. 따라서 최근에는 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가되는 각종 염증물질들을 효과적으로 감소시킬 수 있는 항염증제 및 치료보조제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 한약재로부터 유래되는 생리활성성분이나 화합물이 치료를 위한 표적물질들이 되고 있다⁹⁻¹⁴⁾.

강활은 性味가 辛苦, 溫하여 散寒, 祛風, 除濕, 止痛 작용이 있으므로 感冒나 관절질환에 응용하는데 실제 임상에서 感冒나 관절질환 이외에도 鼻塞, 咳嗽, 頭痛 및 피부소양증에 사용되고 있다¹⁵⁾. 羌活의 기원식물을 보면, 국내에서는 재배되는 羌活(*Ostericum koreanum* Maximowicz)의 뿌리와 중국에서 재배되는 羌活(*Notopterygium incisum* Ting; 寬葉羌活 *N. forbesii* Boissier)의 뿌리로 나누어지는데^{15,20-23)}, 이들 중에서 국내 유통되는 강활은 남강활과 북강활로 유통되고 있지만, 그 효능에 대해서는 질환별 약리적 실험연구가 미비하여 정확하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 국내에서 사용되는 두 종류의 강활 중 북강활의 메탄올추출물과 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올분획물들에 대한 약리효과를 조사하기 위하여 대식세포에서의 항염증효과를 검증하였다.

NO는 free radical로서 심혈관계와 신경계 및 면역계의 전달물질로서 세포 내 항상성의 유지, 신경전달

물질의 운반, 항암 작용 및 세포독성 등 매우 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다²⁷⁾. NO는 NADPH의존적 효소인 세 가지 형태의 NO 합성경로(NO synthase pathway; NOS)를 통해 L-arginine이 산화되어 citrullin으로 변환되는 과정에서 형성되는 중간생성물이다. 이들 NOS 중 endothelial NOS(eNOS)와 neuronal NOS (nNOS)는 칼슘농도에 의존적이고 자극에 대한 반응이 아닌 구성성분으로서 일시적으로 소량 발현된다. 반면 inducible NOS(iNOS)는 칼슘의 농도에 상관없이 염증자극에 의해 지속적으로 다량 생성이 유도됨으로써 염증반응에 기여하게 된다^{5,27)}. iNOS는 일반적으로 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 와 같은 염증성 자극에 의해 유도되는 것으로 알려져 있으며, 특히 LPS 또는 세균의 lipopeptide를 처리하였을 때 급격히 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 한편 NO는 원래 염증성 또는 항염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 통해 세포를 파괴하고 shock에 의한 혈관 확장 및 염증반응을 촉진하여 조직 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다^{5,27)}. 따라서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO와 iNOS의 생성을 효과적으로 억제하는 억제제 개발에 대한 연구가 최근 이루어지고 있으며 다양한 염증질환의 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다. 본 연구결과에서 북강활의 메탄올추출물과 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올분획물들은 독성이 없는 농도범위에서 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 NO의 양을 농도 의존적이고 유의적으로 억제시킴으로써 항염증효과를 나타내었다. 특히 북강활의 에틸아세테이트분획은 메탄올추출물이나 기타 분획물에 비해 가장 우수하게 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 현재까지 한약물에 의한 iNOS 생성에 대한 세포기전이 정확히 밝혀져 있지는 않지만, NO 생성을 억제하는 약물의 경우, 약물의 전처리에 의해 NO 합성효소인 iNOS의 promoter activity가 억제되거나, iNOS 유전자의 전사(transcription)를 억제하는 경우 외에 세포 밖으로 분비된 NO를 소거(scavenging)하는 것과 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{9-14,27)}.

Prostaglandins은 국소적으로 활성화되는 물질로서 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase (COX) 효소의 작용에 의해 합성된다²⁶⁾. COX에는 두 가지 isoform인 COX-1과 COX-2가 있는데 COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준히 만들어져 housekeeping 효소의 역할을 하는 반면, COX-2는 염증과 같은 병적인

환경에서 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, mitogens, growth factors 등에 대식세포, 단핵구, 혈관내피세포, 연골세포, 조골세포, 활막세포 등에서 분비된다. 따라서 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물들은 COX-2 유도에 의한 염증을 줄이고 COX-1을 억제하기 때문에 발생하는 위, 신장, 혈소판에 대한 부작용을 예방할 수 있다는 가정에서 선택적 COX-2 억제제가 개발되었으며 현재 celecoxib, rofecoxib 등이 알려져 있다^{6,26)}.

조직이 손상되면 물리적인 손상뿐 아니라 염증을 매개하는 물질들이 다량 생성되기 때문에 통증이 유발되게 되는데, 이 중 PGE₂는 조직손상이 일어나는 부위에서 생성되어 말초신경 말단부위에 작용하여 통증에 대한 역치를 감소시키게 된다²⁹⁾. 본 연구결과에서 북강활의 메탄올추출물과 에틸아세테이트분획물은 독성이 없는 농도범위에서 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 PGE₂의 양을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 북강활의 에틸아세테이트분획은 메탄올추출물이나 기타 분획물들과 비교하여 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 최근 연구결과에 따르면 만성염증질환에 사용하는 비스테로이드성 소염제에 의한 PGE₂의 억제는 단기적으로는 염증에 의한 증상을 조절하는데 도움이 되지만, 한편으로는 Th1 반응의 편향을 초래함으로써 병의 지속을 가져올 수 있다는 보고가 있다. 따라서 PGE₂가 중요한 역할을 하는 염증질환에서 강활의 PGE₂ 작용에 대한 선택적 조절에 대한 연구가 추후 필요할 것으로 생각되어진다.

결 론

현재 국내에서 재배되고 있는 북강활의 항염증효과를 조사하기 위하여 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 생성되는 염증물질인 NO와 PGE₂에 대한 억제효과를 조사하였다.

1. 북강활의 메탄올추출물은 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지, 에틸아세테이트와 부탄올 분획물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 까지, 핵산분획물은 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다.
2. 북강활의 메탄올추출물과 분획물들은 모두 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO와 PGE₂의 생성을 유의적으로 억제하였다.
3. 북강활의 메탄올추출물과 에틸아세테이트분획물은

RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하였다.

따라서 북강활의 에틸아세테이트분획물이 활성화된 대식세포로부터 유발되는 염증반응을 효과적으로 억제함으로써 각종 염증질환 치료를 위한 약물로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Morson BC. Pathology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Jpn.* 1980 ; 15(2) : 184-7.
2. Cline MJ. Leukocyte function in inflammation: the ingestion, killing, and digestion of microorganisms. *Ser Haematol.* 1970 ; 3(2) : 3-16.
3. Guo LY, Hung TM, Bae KH, Shin EM, Zhou HY, Hong YN, Kang SS, Kim HP, Kim YS. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Eur J Pharmacol.* 2008 ; 591(1-3) : 293-9.
4. Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* 2005 ; 208(2) : 249-58
5. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 ; 6(12) : 3051-64.
6. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med.* 2002 ; 53 : 35-57.
7. Wei W, Li XY, Zhang HQ, Wu SG. Anti-inflammatory and immuno pharmacology. 1st ed. Beijing : Renmin weisheng chubanshe. 2004. 10-17.
8. Andreakos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to

- modulating cytokine-driven inflammation. *Immunol Rev.* 2004 ; 202 : 250-65.
9. Cao H, Urban JF Jr, Anderson RA. Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti- and pro inflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. *J Nutr.* 2008 ; 138(5) : 833-40.
 10. Tao JY, Zhao L, Huang ZJ, Zhang XY, Zhang SL, Zhang QG, Fei-Xiao, Zhang BH, Feng QL, Zheng GH. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl on LPS-stimulated RAW 264.7 cell. *Inflammation.* 2008 ; 31(3) : 154-66.
 11. Zhao L, Zhang SL, Tao JY, Jin F, Pang R, Guo YJ, Ye P, Dong JH, Zheng GH. Anti-inflammatory mechanism of a folk herbal medicine, *Duchesnea indica* (Andr) Focke at RAW264.7 cell line. *Immunol Invest.* 2008 ; 37(4) : 339-57.
 12. Jung HW, Yoon CH, Kim YH, Boo YC, Park KM, Park YK. Wen-Pi-Tang-Hab-Wu- Ling-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 114(3) : 439-45.
 13. Rhule A, Navarro S, Smith JR, Shepherd DM. *Panax notoginseng* attenuates LPS -induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2006 ; 106(1) : 121-8.
 14. Jin HZ, Lee JH, Lee D, Hong YS, Kim YH, Lee JJ. Inhibitors of the LPS-induced NF- κ B activation from *Artemisia sylvatica*. *Phytochemistry.* 2004 ; 65(15) : 2247-53.
 15. 全國韓醫科大學 共同教材編輯委員會 編著. 本草學. 永林社. 2007 : 159-61.
 16. 馬繼興. 神農本草經輯注. 北京 : 人民衛生出版社. 1995 : 64-5
 17. 中國醫學科學院 藥物研究所. 中藥志(第2冊). 北京 : 人民衛生出版社. 1975 : 397-401.
 18. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 대성문화사. 1986 : 721-2.
 19. 한국약학대학협의회 약전분과회. 대한약전 제8개정 해설서. 서울 : 신일상사. 2003 : 141.
 20. 全國中草藥匯編寫組. 全局中草藥匯編. 北京 : 人民衛生出版社. 1983 : 301.
 21. 中國醫學科學院 藥物研究所. 中藥志(第2冊). 北京 : 人民衛生出版社. 1975 : 397-401.
 22. 國家藥典委員會. 中華人民共和國藥典(一部). 北京 : 化學工業出版社. 2000 : 144-5.
 23. 雷載權, 張廷模. 中華臨床中藥學(上卷). 北京: 人民衛生出版社. 1998 : 204-9
 24. Shin S. *In vitro* effects of essential oils from *Ostericum koreanum* against antibiotic-resistant *Salmonella* spp. *Arch Pharm Res.* 2005 ; 28(7) : 765-9.
 25. Zschocke S, Lehner M, Bauer R. 5- Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitory active constituents from *Qianghuo* (*Notop terygium incisum*). *Planta Med.* 1997 ; 63(3) : 203-6.
 26. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* 2002 ; 2(5) : 603-30.
 27. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* 1992 ; 70(5) : 705-7.
 28. Sunyer T, Rothe L, Jiang X, Anderson F, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Ca²⁺ or phorbol ester but not inflammatory stimuli elevate inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid and nitric oxide (NO) release in avian osteoclasts: autocrine NO mediates Ca²⁺-inhibited bone resorption. *Endocrinology.* 1997 ; 138(5) : 2148-62.
 29. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clin Immunol.* 2006 ; 119(3) : 229-40.