

蒲公英의 염증성 사이토카인 발현 및 조절에 관한 연구

노경호 · 백정환

대구한의대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Inhibitory Effect of *Taraxaci Herba* Extract (THE) on Pro-inflammatory Mediator

Noh Kyung Ho, Baek Jung Han

Department of pediatrics, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Objectives

The purpose of this study is to find out the effect of *Taraxaci Herba Extract* (THE), LPS, on pro-inflammatory mediator

Methods

After the treatment of *Taraxaci Herba* MeOH extract dissolved in EMEM for 1 hour prior to the addition of LPS (1 μ g/ml), cell viability was measured by MTT assay, Nitric Oxide production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. And levels of cytokine and PGE2 were analyzed by sandwich immunoassays.

Results

THE inhibited the production of nitrite and nitrate (0.03 and 0.1 mg/ml), TNF- α , (0.03 and 0.1 mg/ml), IL-1 β (0.03 and 0.1 mg/ml), IL-6 (0.01, 0.03 and 0.1 mg/ml) and PGE2(0.03 and 0.1 mg/ml) activated with LPS. In Raw 264.7 cells activated with lipopolysaccharide.

Conclusions

According to the results above, *Taraxaci Herba* can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

Key words : *Taraxaci Herba*, LPS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2

I. 緒 論

NO (nitric oxide) 생성 저해제는 septic shock, 다발성 경화증, 류마티스 관절염과 같은 각종 염증성 질환의 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 최근에는 이러한 조절제를 찾기 위해 苦楝皮¹⁾, 玄蔘²⁾, 龍膽草³⁾ 등의 한약재와 鹿茸藥鍼⁴⁾, 紅花子藥鍼⁵⁾, 紫何車藥鍼⁶⁾ 등의 藥鍼 및 托裏消毒飲⁷⁾, 龍膽瀉肝湯⁸⁾, 加味清上防風湯⁹⁾ 등의 방제에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.

蒲公英 (Taraxaci Herba)은 국화과 (Compositae)에 속한 다년생 초본인 민들레의 전초를 건조한 것으로 taraxasterol, cholin, ilulin 및 pectin 등을 함유한다. 또한, 蒲公英은 性寒하며, 味苦甘하고, 入肝胃經하며, 清熱解毒 消腫散結 利尿通淋, 緩下의 효능이 있어 상기도염과 폐렴, 급성간염, 급성담낭염, 요료감염, 십이지장궤양 등에 치료효과가 있다¹⁰⁾.

최근 蒲公英에 관한 연구동향으로는 박 등¹¹⁾의 蒲公英 추출물이 자궁내막증 유발 白鼠에 미치는 영향, 임 등¹²⁾의 膣炎에 대한 蒲公英의 효과, 백¹³⁾의 포공영의 자유라디칼 소거 및 간세포 보호활성, 이 등¹⁴⁾의 蒲公英에 의한 肝芽細胞腫의 細胞自滅死誘導 효과, 손 등¹⁵⁾의 포공영약침액의 발암과정 blocking agent로서의 활성, 하¹⁶⁾의 蒲公英 藥鍼이 Rat의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響, 박 등¹⁷⁾의 蒲公英 煎湯液을 이용한 카드뮴 독성 解毒 효과연구, 이 등¹⁸⁾의 포공영의 항위염 작용, 김 등¹⁹⁾의 蒲公英 水抽出物이 鎮痛, 抗炎作用에 미치는 影響 이외에, 치면세균막 및 치은염에 미치는 영향에 관한 연구²⁰⁾ 등이 실험적으로 규명되어 왔다.

Gram-negative 박테리아의 세포벽 구성성분인 LPS (lipopolysaccharide)는 인지질, 다당류 및 소량의 단백질로 구성되며, 염증반응을 유발

하는 유력한 인자로 대식세포의 TLR (Toll-Like Receptor)과 결합하여 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증반응 연구에서 빈용되는 실험모델이며²¹⁾, 대식세포는 염증 반응시에 IL (interleukin), TNF- α (tumor necrosis factor- α)와 같은 cytokine을 생산하고, COX-2 (Cyclooxygenase-2)를 활성화시켜 PG (Prostaglandin)를 생산하여 감염초기의 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다²²⁻³⁾.

대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1 β (interleukin-1 β), TNF- α 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다²²⁻⁷⁾.

이러한 염증반응은 bacteria의 제거에 유리하게 작용하지만, 통제범위를 넘어선 과도한 염증반응은 TNF- α , IL-1 (interleukin-1) 및 IL-6 (interleukin-6) 등의 염증매개 cytokine을 다량 생산하게 되고, 이러한 염증매개물질들은 조직손상이나, 장기의 부전을 유발한다²⁸⁾.

이에 저자는 본 연구에서 蒲公英의 염증성 질환에 대한 효과를 실험적으로 확인하기 위해 蒲公英을 RAW 264.7 세포에 전처리한 후, LPS로 유도한 NO 생성과 세포생존율 및 TNF- α , IL-1 β (interleukin-1 β), IL-6, PGE₂ (Prostaglandin E₂) 등의 염증매개물질 생성에 미치는 영향을 살펴보았다.

II. 材料 및 方法

1. 추출물의 제조

蒲公英 추출물 (Taraxaci Herba Extracts, THE)은 蒲公英 (Taraxaci Herba) 300g을 MeOH 3L에 넣고 4일간 추출한 다음 추출물을 거여즈로 1차 여과하고 3000 \times g에서 3분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New

York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20°C에서 보관하였다. THE의 수율은 12.65%였으며 실험에서 THE는 EMEM (Eagle's minimum essential medium)에 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 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluency에서 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-α, IL-1β와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며, PGE₂의 ELISA Kit는 RnD Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

4. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻

의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µl와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H₂O) 100 µl를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

5. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5×10⁴ cells/well로 분주한 다음 THE를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.01 - 0.1 mg/ml의 농도로 THE를 처리하고 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100×/(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

6. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells (1×10⁶/ml)을 분주하고 THE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF-α, IL-1β와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

7. PGE₂의 측정

THE를 농도별로 처리하고, 1시간 후에 LPS를 처리한 후, 배양된 배지를 E-tube에 모아서 ELISA Kit (RnD Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용한 PGE₂ 측정에 사용하였다. PGE₂와 link된 acetylcholinesterase가 도포되어 있는 plate에 standard와 배양 배지를 첨가하여 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 18시간 후에 standard solution과 배지를 제거하고 Kit에 포함되어 있는 wash buffer로 5회 반복 세척하였다. 200 ul의 substrate reagent를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, stop solution을 첨가하여 반응을 종결시켰다. PGE₂의 함량은 405 nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve에 준하여 결정하였다.

8. 통계적 검증

실험 결과는 mean±SD로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman - Keuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

III. 結 果

1. THE가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향

THE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml의 농도로 Raw 264.7 cell에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다.

NO의 양은 처치를 하지 않은 control에 대한 비율로 나타내었다.

LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성($P < 0.01$) 있게 증가하였으며, THE 0.01 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성이 없었으나, THE 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성($P < 0.01$) 있게 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 1).

2. THE가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

THE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO 생성의 감소가 THE의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여 THE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 처리하고 24

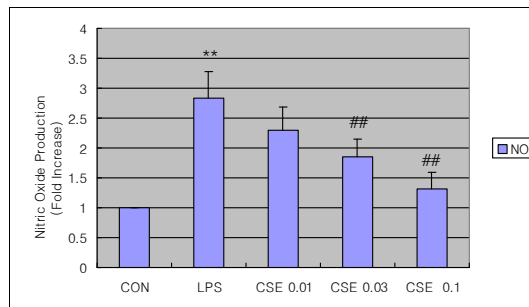


Fig. 1. Inhibition of NO production by Taraxaci Herba Extract(THE) in Raw 264.7 cells .

Raw 264.7 cells were treated with various concentrations of THE dissolved in EMEM for 1hr prior to the addition of LPS(1μg/ml), and the cells were further incubated for 18hr.

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±SD with three separate experiments(*: significant as compared to control, ** $P < 0.01$, #: significant as compared to LPS alone, ## $P < 0.01$).

시간 후 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. LPS 단독 처리군과 THE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml 군에서는 control군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

3. THE가 LPS로 유도된 Raw cell의 TNF-α에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 TNF-α 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 TNF-α 생성 정도를 측정하였다.

LPS는 전염증성 cytokine인 TNF-α의 생성을 유의성 있게 증가시켰고, THE 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS로 유도된 TNF-α를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성(P<0.05 또는 P<0.01) 있게 감소시켰다(Fig. 3).

4. THE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1β에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 IL-1β 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-1β 생

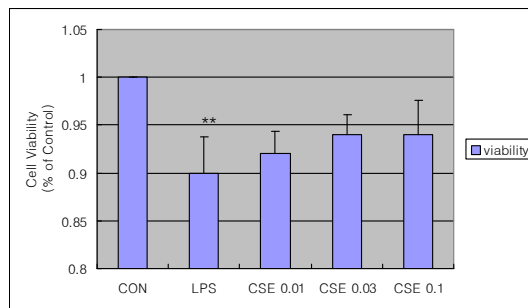


Fig. 2. Effects of Taraxaci Herba Extract(THE) on the cell viability in LPS stimulated Raw 264.7 cells.

The cell viability was measured after indicated time.

Data represent the mean±SD with three separate experiments.

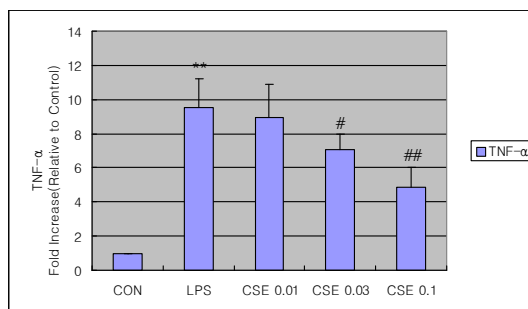


Fig. 3. The effect of Taraxaci Herba Extract(THE) on LPS-inducible TNF-α production.

Production of TNF-α was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS(1μg/ml) in the presence or absence of THE for 18hr.

The amount of TNF-α was measured by immunoassays as described in Section 2.

Data represent the mean±SD with three separate experiments(*: significant as compared to control, **P<0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P<0.01).

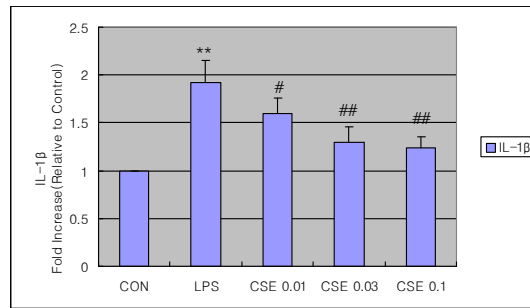


Fig. 4. The effect of Taraxaci Herba Extract(THE) on LPS-inducible IL-1 β production. Production of IL-1 β was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS(1 μ g/ml) in the presence or absence of THE for 12hr. The amount of IL-1 β was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean \pm SD with three separate experiments(*: significant as compared to control, **P<0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P<0.01).

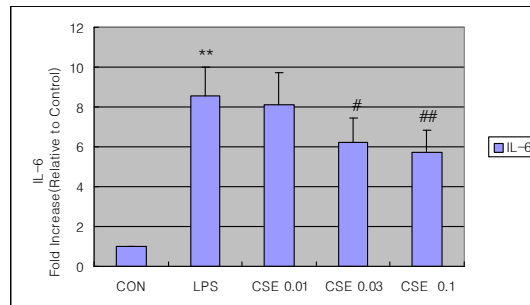


Fig. 5. The effect of Taraxaci Herba Extract(THE) on LPS-inducible IL-6 production. Production of IL-6 was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS(1 μ g/ml) in the presence or absence of THE for 6hr. The amount of IL-6 was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean \pm SD with three separate experiments(*: significant as compared to control, **P<0.01).

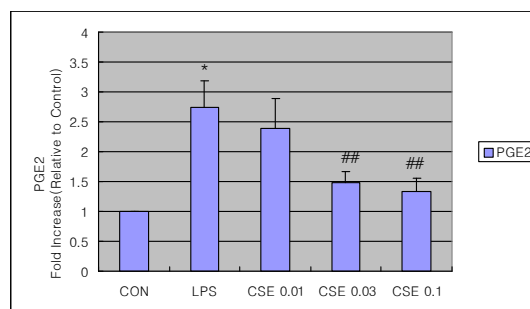


Fig. 6. The effect of Taraxaci Herba Extract(THE) on LPS-inducible PGE2 production. Inhibition of LPS-activated PGE2 production by THE. Raw 264.7 cells were cultured with LPS(1mg/ml) in the presence or absence of THE for 24hr to determine the level of PGE2. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE2. Data represent the mean \pm SD with three separate experiments(*: significant as compared to control, **P<0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P<0.01).

성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine 인 IL-1 β 의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, THE 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml를 처치한 실험군에서는 LPS로 유도된 IL-1 β 를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성(P<0.05 또는 P<0.01) 있게 감소시켰다(Fig. 4).

5. THE LPS로 유도된 Raw cell의 IL-6에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 IL-6 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-6 생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine 인 IL-6의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, THE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된 IL-6를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성(P<0.05 또는 P<0.01) 있게 감소시켰다 (Fig. 5).

6. THE가 LPS로 유도된 Raw cell의 PGE2에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 PGE₂ 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 PGE₂ 생성 정도를 측정하였다. LPS는 염증반응 매개물질인 PGE₂의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, THE 0.03, 0.10 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된 PGE₂를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성(P<0.01) 있게 감소시켰다(Fig. 6).

IV. 考 察

蒲公英 (Taraxaci Herba) 은 국화과 (Compositae) 에 속한 다년생 초본인 민들레의 전초를 건조

한 것으로 taraxasterol, cholin, inulin 및 pectin 등을 함유한다. 또한, 蒲公英은 性寒하며, 味苦甘하고, 入肝胃經하며, 清熱解毒 消腫散結 利尿通淋의 효능을 가지고 있으며, 최근 清熱解毒作用 이외에 利尿作用과 緩下 시키는 효능이 있는 것으로 밝혀져 상기도염과 폐렴, 급성간염, 급성담낭염, 요로감염, 십이지장궤양 등에 치료효과가 있다¹⁰.

최근 蒲公英에 관한 연구동향으로는 박 등¹¹의 蒲公英 추출물이 자궁내막증 유발 白鼠에 미치는 영향, 임 등¹²의 膻炎에 대한 蒲公英의 효과, 백¹³의 포공영의 자유라디칼 소거 및 간세포 보호활성, 이 등¹⁴의 蒲公英에 의한 肝芽細胞腫의 細胞 自滅死 誘導 效果, 손 등¹⁵의 포공영약침액의 발암과정 blocking agent로서의 활성, 하¹⁶의 蒲公英 藥鍼이 Rat의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響, 박 등¹⁷의 蒲公英 煎湯液을 이용한 카드뮴 독성 解毒 效果연구, 이 등¹⁸의 포공영의 항위염 작용, 김 등¹⁹의 蒲公英 水抽出物이 鎮痛, 抗炎作用에 미치는 影響 이외에, 치면세균막 및 치은염에 미치는 영향에 관한 연구²⁰ 등이 실험적으로 규명되어 왔다. 清熱解毒作用이 강한 蒲公英의 효능에 비해 면역반응 및 염증반응에 미치는 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에, 본 연구에서는 蒲公英 추출물 (THE) 이 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극으로 분비되는 염증매개물질 억제를 통해 항염증 효과를 평가함으로써, THE가 면역체계에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

수많은 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이 변화는 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체 내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 한다. 이러한 화학적 매개체로

는 활성산소, NO, PG, 염증을 유발시키는 여러 cytokine 등이 있다²⁹⁾.

NO는 염증반응을 조절할 수 있는 인자 중 하나로 알려져 있으며 다른 free radical이나 중금속과 쉽게 반응하고 혈관확장, 신경전달체제, 항균물질, 면역조절 등의 생체 내 작용에 관여한다. L-arginine으로부터 NOS를 경유하여 생성되는 radical로 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다. NOS는 크게 cNOS와 iNOS 두 가지로 분류되는데 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체 내 항상성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 iNOS는 LPS, IFN- γ , IL-1 및 TNF- α 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포, 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다³¹⁻²⁾. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 다발성 경화증, 류마티스 관절염과 같은 각종 염증성 질환의 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 THE의 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 THE를 0.01 - 0.1 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성($P < 0.01$) 있게 증가하였으며, THE 0.01 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성이 없었으나, THE 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성($P < 0.01$) 있게 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 1).

THE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도에서 LPS

로 유도된 NO 생성의 감소가 THE의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여 THE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 처리하고 24 시간 후 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. LPS 단독 처리군과 THE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml 군에서는 control군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다³³⁾. 또한 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등은 전염증성 cytokine으로 염증반응을 조절하며 서로 간에 상호작용을 하는 것으로 알려져 있는데 염증반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다³⁴⁻⁵⁾. 특히 염증반응에 관여하는 세포 중에서 대식세포는 각종 cytokine을 분비하여 대식세포의 유주, T 세포의 활성화와 증식억제, 혈관신생작용 등을 나타내어 염증반응을 조절한다고 인식되고 있다³³⁾.

한편, 대식세포는 LPS에 의해 다양한 cytokine, chemokine의 발현을 증가시킨다. cytokine으로는 TNF- α , IL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF 등이, chemokine으로서 IL-8, MCP-1 등의 발현이 증가된다³⁶⁾. 이 중 TNF- α 는 pro-inflammatory cytokine으로서 monocytes, macrophages, mast cells 등으로부터 분비된다. 근래 TNF- α 는 많은 자가면역질환에 있어서 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁷⁻⁸⁾.

TNF- α 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다³⁸⁾. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- α 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다³⁷⁾.

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 TNF- α 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를

0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 TNF- α 생성 정도를 측정하였다.

LPS는 전염증성 cytokine인 TNF- α 의 생성을 유의성 있게 증가시켰고, THE 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS로 유도된 TNF- α 를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성($P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$) 있게 감소시켰다(Fig. 3).

또한 IL-1은 septic shock³⁹⁾, burn⁴⁰⁾, 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury⁴¹⁾의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide 등의 매개물질 합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다⁴²⁾.

한편, IL-1 β 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF- α , IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 β 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화하며³⁷⁾, hypothalamus에 작용하여 발열을 유도한다³⁷⁾.

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 IL-1 β 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-1 β 생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine인 IL-1 β 의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, THE 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS로 유도된 IL-1 β 를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성($P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$) 있게 감소시켰다(Fig. 4).

IL-6는 단핵세포와 대식세포에 의해 분비되는데 분화된 B 세포가 형질세포로 분화되도록 촉진시키고 antibody의 분비를 자극한다. IL-6는 또한 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다³⁷⁻⁸⁾.

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 IL-6 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-6 생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine인 IL-6의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, THE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된 IL-6를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성($P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$) 있게 감소시켰다(Fig. 5).

일반적으로 혈관확장, 발열, 염증 및 통증에 관여하는 것으로 알려진 PG의 생성은 세포막의 인지질의 구성성분인 arachidonic acid가 phospholipase A₂(PLA₂)와 다른 acyl hydrolases의 작용에 의해 조직의 인지질로부터 유리되어 COX에 의해 PG로 변환된다⁴³⁾. PGE₂는 COX-2 활성화 후에 생성되며 주로 비만세포나 대식세포에 의해 분비된다. 또한 염증부위의 부종, 통증, 감각과민을 초래하는 histamine, bradykinin, NO 등과 더불어 혈관 투과성을 증가시킨⁴⁴⁾, PGE₂는 통증자극에 대한 반응의 상승작용, 혈관확장, 발열, 염증세포의 활성을 유도한다⁴³⁾.

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 THE의 PGE₂ 생성 저해능을 관찰하기 위하여 THE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 PGE₂ 생성 정도를 측정하였다. LPS는 염증반응 매개물질인 PGE₂의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, THE 0.03, 0.10 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된 PGE₂를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성($P < 0.01$) 있게 감소시켰다(Fig. 6).

이상의 결과는 THE가 NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂의 생성을 저해함으로써 유의한 항염증 효과가 있음을 보여주며, 향후 기전적 연구를 통해 THE를 활용한 염증반응 조절제 개발과 임상에서의 활용가치를 높일수 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

蒲公英 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 nitric oxide의 생성과, 세포생존률, TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂에 미치는 영향을 조사하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. NO의 생성량을 THE 0.03, 0.1 mg/ml에서 유의성 있게 억제하였으며, 모든 농도의 THE에서 세포독성을 유발하지 않았다.
2. TNF- α 를 THE 0.03, 0.1 mg/ml 에서 유의성 있게 억제하였다.
3. IL-1 β 를 모든 농도의 THE mg/ml 에서 유의성 있게 억제하였다.
4. IL-6를 THE 0.03, 0.1 mg/ml 에서 유의성 있게 억제하였다.
5. PGE₂를 THE 0.03, 0.1 mg/ml에서 유의성 있게 억제하였다.

이러한 결과는 蒲公英 추출물이 Nitric Oxide 및 pro-inflammatory cytokine의 생성과, gram-negative bacterial infection에 의한 염증과 연관된 면역질환의 치료에 효과가 있음을 알 수 있다.

參 考 文 獻

1. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*. 2000; 06(3):301-9.
2. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. *大韓本草學會誌*. 2005;20(2):7-16.

3. 김미선, 조원준, 황순이, 이종록, 박숙자, 김상찬, 지선영. 龍膽草 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 pro-inflammatory mediator에 미치는 영향. *韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌*. 2008;21(2):28-38.
4. 정용래, 이승덕, 변 혁, 박인식, 정찬영, 이창환, 김갑성. 鹿茸藥鍼이 LPS 誘發 關節炎의 潤滑關節膜內 過多炎症反應 調節에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2007;24(4): 167-81.
5. 박 원, 김경호, 이창환, 이동건, 이현진, 황지혜, 김갑성. 홍화자약침의 윤활관절막내에서의 MIF활성 억제를 통한 LPS 유발 관절염의 치료 효과. *大韓鍼灸學會誌*. 2007; 24(4):157-66.
6. 박기범, 백승태, 이승덕, 김경호, 김갑성. 紫何車藥針의 亢炎症能이 LPS 유발 關節炎治療에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2006; 23(6):103-15.
7. 이상문, 홍승욱. Mouse cell에서 托裏消毒飲의 항산화작용과 항염증효과. *한방안이비인후피부과학회지*. 2007;20(3):43-50.
8. Lim JH, Lee JR, Kim SC, Jee SY. Inhibitory effect of *Yongdansagantang* water extract on IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2007;7(3):321-9.
9. 서은성, 황충연, 김남권. 加味清上防風湯의 항염증 효과에 대한 실험적 연구. *한방안이비인후피부과학회지*. 2008;21(2):54-70.
10. 전국한 의과대학 본초학교수. 본초학. 서울: 영림사. 1995: 201-2.
11. 박준식, 임은미, 이은. 蒲公英 추출물이 자궁내막증 유발 白鼠에 미치는 영향. *大韓韓方婦人科學會誌*. 2006;19(3):69-82.

12. 임성민, 이동녕, 김형준. 膾炎에 대한 訶子, 車前子, 川芎, 蒲公英, 黃芩의 效果. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004;17(4):34-45.
13. 백흠영. 포공영의 자유라디칼 소거 및 간세포 보호활성. 생약학회지. 2003;34(4):324-6.
14. 이병호, 문구, 원진희, 김태균. 蒲公英에 의한 肝芽細胞腫의 細胞 自滅死 誘導 效果. 동의생리병리학회지. 2001;15(2):350-5.
15. 손윤희, 김소연, 임종국, 남경수. 포공영약 침액의 발암과정 blocking agent로서의 활성. 생명과학회지. 2002;12(5):549-54.
16. 하지용. 蒲公英 藥鍼이 Rat의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 大韓藥鍼學會誌. 1999;2(1):135-52.
17. 박재수, 이종수, 이기남. 蒲公英 煎湯液을 이용한 카드뮴 독성 解毒 效果연구. 대한예방의학회지. 1997;1(1):76-84.
18. 이은방, 김정근, 김옥경. 포공영의 항위염 작용. 생약학회지. 1993;95:313-8.
19. 김석근, 송호준. 蒲公英 水抽出物이 鎮痛, 抗炎作用에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1992;23:152-61.
20. 홍석진, 최유진, 임희순, 손재범. 금은화와 포공영추출물이 첨가된 치약의 치면세균막 및 치은염에 미치는 영향. 大韓口腔保健學會誌. 2001;25(4):347-55.
21. 국윤범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 2002;10(1):113-29.
22. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to Candida albicans. *J Microbiol Biotechnol*. 2000;10:8-15.
23. 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 cytolitic mechanism of activated macrophages. *J Immunol*. 1990;144:1425-31.
24. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Bio Med*. 1996;211:24-32.
25. Corbett JA, and Mac Daniel ML. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J Exp Med*. 1995;181:559-68.
26. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*. 1994;6:399-406.
27. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지. 1999;39:52-63.
28. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. 2004;12:186-92.
29. 대한병리학회. 병리학. 서울. 고문사. 1995:71-104.
30. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*. 2000;47(1):6-9.
31. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69(6):625-35.
32. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The

- aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(1): 119-23.
33. 정해영역. Toshio Hirano편저. 생명과학과 분자의학을 위한 분자생물학. 서울. 월드 사이언스. 2002:73-85.
34. 신경민, 박영미, 김인태, 홍신표, 홍정표, 이경태. Amygdalin의 Murine Macrophage RAW 264.7 세포에서 *in vitro* 항염효과. *생약학회지.* 2003;34(3): 223-7.
35. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:397-440.
36. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001;13(2):85-94.
37. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 2003;37(6):355-61.
38. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British Journal of Pharmacology.* 2003;139:11-20.
39. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 1993;119:771-8.
40. Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1 β in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest.* 1993; 23:311-9.
41. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation.* 1997;63:143-8.
42. Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery.* 2004;135(5):544-54.
43. Cha YI, Solnica-Krezel L, DuBois RN. Fishing for prostanoids:deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev Biol.* 2006;289 (2):263-72.
44. Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Yang HL. Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol.* 2005;5:1914-25.