

地骨皮가 H₂O₂에 의한 LLC-PK₁ 세포의 Redox Status 및 NF-κB Signaling에 미치는 영향

최규호, 신현철

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

The Effects of *Lycium Chinense Milie* on the H₂O₂-treated LLC-PK₁ Cell's Redox Status and NF-κB Signaling

Gyu-ho Choi, Hyeon-cheol Shin

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : This study was aimed to verify the cytoprotective function, antioxidative effect and inflammation genes inhibitory effects of *Lycium chinense Milie*. Therefore the generation of superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), peroxynitrite (ONOO⁻), nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) was investigated in the renal epithelial cells of mouse. Effects of *Lycium chinense Milie* on the expression of inflammation-related proteins, IKK-α, p-IKK-αβ, p-IκB-α, NF-κB (p50, p65), COX-2 and iNOS, were examined by western blotting.

Methods : For this study, the fluorescent probes were used, namely dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA). Western blotting was performed using anti-IKK-α, anti-phospho IKK-αβ, anti-phospho IκB-α, anti-NF-κB (p50, p65), anti-COX-2 and anti-iNOS, respectively.

Results : *Lycium chinense Milie* reduced H₂O₂-induced cell death dose-dependently. It inhibited the generation of $\cdot O_2^-$, ONOO⁻, NO and PGE₂ in the H₂O₂-treated renal epithelial cells of mouse *in vitro*. *Lycium chinense Milie* inhibited the expression of IKK-α, p-IKK-αβ, p-IκB-α, COX-2 and iNOS genes by means of decreasing activation of NF-κB.

Conclusions : According to above results, *Lycium chinense Milie* recommended to be applied in treatment for the inflammatory process and inflammation-related diseases.

Key words : *Lycium chinense Milie*, LLC-PK₁ cell, H₂O₂, $\cdot O_2^-$, ONOO⁻, NO, PGE₂, NF-κB, COX-2, iNOS

1. 서론

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 고혈압, 동맥경화, 심부전, 류머티스 관절염, 알레르기, 암 등의 질병 및 노화의 진행에 직접적인 원인

으로 작용하며, 또한 활성산소종과 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS) 간의 상호작용은 free radical theory, oxidative stress theory, molecular inflammation theory 등 노화 관련 병리의 공통 요인임과 동시에 여러 가지 병리적 현상을 일으킨다. ROS는 atherosclerosis와 다른 혈관 질환의 병리적 매개 물질로 작용하는데, 특히 상피 내 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)의 생성은 정상 혈관에서 내피 의존형 이완을 감소시켜 내피 세포의 손상에

· 교신저자: 신현철 경북 포항시 남구 대잠동 907-8
대구한의대학교포항한방병원 3내과
TEL: 054-281-0055 FAX: 054-281-7464
E-mail: ungaeshin@naver.com

영향을 미치게 된다. RNS 중 nitric oxide (NO)는 필요 이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응이 유발되어 조직 손상 등의 유해한 작용을 나타내고, NO와 $\cdot O_2^-$ 의 반응에 의해 생성되는 peroxynitrite (ONOO⁻)는 pathogenic cellular damage와 organ dysfunction의 주요인으로 알려져 있으며 염증, 감염 등과 같은 특정 상태에서 대량 생성되어 강한 조직 파괴력을 나타내므로 NO와 $\cdot O_2^-$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있다¹.

Free radical은 세포질 내 여러 전사인자에 관여하여 세포 내 신호전달 체계를 통한 유전자 발현에 영향을 미쳐 염증반응을 유발하게 된다. 특히 nuclear factor κ B (NF- κ B)는 면역, 염증반응, 세포 분화, apoptosis에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하는 중심 역할을 하는 전사인자로서²⁻⁵ Rel family의 homodimer 또는 heterodimer complex 형태로 세포질 내에서 I κ B family에 sequestration되어 불활성 상태로 존재한다. 이런 상태에서 산화 스트레스 등의 외부 자극으로 인해 I κ B kinase (IKK)가 작용하여 인산화가 이루어지면 I κ B가 degradation되면서 NF- κ B를 노출해 subunit인 p50, p65가 핵 내로 전위되어 표적 유전자 조절부위의 DNA sequence와 결합하게 된다⁶. 이처럼 전사인자인 NF- κ B는 주로 염증 및 산화적 스트레스에 반응하여 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 다양한 염증성 cytokine들의 발현을 조절하는 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹.

地骨皮는 가지과 (Solanaceae)에 속한 枸杞子 (*Lycium chinense Milier*) 또는 寧夏枸杞 (*L. barbarum* L.)의 根皮를 건조한 것으로 <東醫寶鑑>에 “能涼血涼骨, 治消渴, 治有汗骨蒸 善解肌熱”이라고 수록되어 있으며 涼血除蒸, 清肺降火 등의 효능으로 陰虛潮熱, 骨蒸盜汗, 肺熱咳嗽, 咯血, 衄血, 內熱消渴 등의 치료에 상용하고 있다⁷. 또한 약리학적으로 cinnamic acid와 다량의 phenols, betaine이 함유되어 있으며⁸, 실험연구로는 혈당 및

혈압 강하작용⁹, 진통작용¹⁰, 손상된 간기능 회복작용¹¹ 등에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 이런 地骨皮의 효능이 산화 스트레스와 관련한 항염증, 항산화, 항노화 작용에 유효할 것으로 여겨지는 바 신장상피세포에서 地骨皮의 세포 독성 및 H₂O₂에 의한 세포사 보호 효과, $\cdot O_2^-$, NO, ONOO⁻ 및 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성과 COX-2, iNOS의 발현 및 NF- κ B와 관련된 염증성 단백질에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

地骨皮 (*Lycium chinense Milier*)는 대구한의대학교 부속한방병원 약재과에서 구입하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

Dulbecco's Modifide Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem (EMD Biosciences Inc., USA)에서, 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)은 Daiichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서, sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules, USA)에서, NP-40, CAPS, Tris base, ammonium persulfate, ponceau, glycerol, protease inhibitors, bovine serum albumin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서, 1차 항체인 IKK- α , IKK- β , p-IKK- α , I κ B- α , p-I κ B- α 는 Cell Signaling Technology (Cell Signaling, USA)에서, p50, p65, iNOS, COX-2, VCAM-1, β -actin, histone H1과 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat

IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용한 기기는 GENios (GENios-basic, Tecan, Austria), UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu Co., Japan)가 있다.

3) 세포

마우스의 LLC-PK₁ 세포 (renal epithelial cells)는 경북대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받아 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 地骨皮 1000 g에 3배 량의 95% methanol을 가하고 60°C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 72.97 g (수율 7.30%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

LLC-PK₁ 세포를 100 π dish (Corning Co., New York, USA)에 배양하였으며, 이때 5% fetal bovine serum, L-glutamine (5.84 μg/ml)과 L-sodium bicarbonate (2.438 g/ml)을 함유한 DMEM/F12 배지에 penicillin-streptomycin (100 U/ml)을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

3) MTT assay

地骨皮의 세포 독성 및 H₂O₂ 처리에 의한 세포 사로부터 地骨皮의 세포 보호 효과를 알고자 Tada 등의 방법¹²으로 측정하였다. 노란색의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액은 살아 있는 세포에서는 mitochondria의 succinyl dehydrogenase에 의해 비

수용성인 보라색의 formazan으로 환원된다. 이 formazan의 발색 정도를 spectrophotometer로 측정하여 세포의 생존율을 측정함으로써 地骨皮의 독성 및 세포 보호 효과를 측정할 수 있다. LLC-PK₁ 세포를 96 well plate에 1×10⁴/well로 접종하여 24시간 배양하고 serum free 배지로 바꿔준 후, 地骨皮 추출물을 농도별로 가하여 1시간 전처리한 다음 地骨皮의 세포 독성을 측정하였다. LLC-PK₁ 세포를 96 well plate에 1×10⁴/well로 접종하여 24시간 배양하여 地骨皮 추출물을 1시간 전처리하고 H₂O₂를 최종 농도 100 mM이 되도록 가하여 5시간 더 배양한 후 地骨皮의 세포 보호 효과를 측정하였다. 측정시에는 배지를 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 세포에 가하여 4시간 추가 배양하고 solubilization 용액 (dimethyl sulfoxide:ethanol, 1:1)을 가하여 24시간 배양한 후, 595 nm에서 발색 정도를 측정하였다.

4) 신장상피세포에서 ·O₂⁻, NO 및 ONOO⁻ 소거능 측정

LLC-PK₁ 세포를 96 well plate에 1×10⁴/well로 분주하고 하루 동안 배양한 다음 地骨皮 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 후, H₂O₂ 100 mM을 처리하여 5시간 배양하고 나서 각 소거능을 측정하였다.

·O₂⁻ 소거능은 DCFDA assay¹³로 측정하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 200 μl와 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 희석한 0.125 mM DCFDA 50 μl를 첨가한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다.

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)은 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방

출하는 triazolofluorescein을 생성하며 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. NO 소거능은 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 150 μ l와 Dimethyl sulfoxide 550 μ l에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석한 DAF-2 50 μ l를 첨가한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 3분 간격으로 7회 측정하였다¹⁴.

ONOO⁻ 소거능은 Kooy 등의 방법¹⁵에 의해 측정하였는데 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 20 μ l와 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μ M diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μ M DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4) 180 μ l를 가하여 5분간 방치한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다.

5) Prostaglandin E₂ 측정

세포 내에서 생성되는 염증물질인 Prostaglandin E₂ (PGE₂)의 양은 배지를 사용하여 PGE₂ immunoassay kit (R&D SYSTEMS)의 실험 방법에 따라 측정하였다.

6) Western blot analysis

LLC-PK₁ 세포를 100 π dish에 24시간 배양한 후 地骨皮 추출물을 농도별로 1시간 전처리하고 H₂O₂를 최종 농도 100 mM이 되도록 가하여 5시간 더 배양한 후 PBS로 세척하고 scraper로 모은 LLC-PK₁ 세포에서 cytosol, nuclear 단백질을 분리하여 염증인자의 단백질 발현을 관찰하였다. 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, nitrocellulose membrane에 단백질들을 전이시켜 주었다. 이 membrane을 분리한 후 5% skim milk로 단백질이 결합하지 않은 부분의 비특이적 antibody 결합을 차단하고 각 표적 단백질의 1차 antibody를 2시간 이상 처리하였다. 이 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 TBST로 60분간 세척한 다음 2

차 antibody를 2시간 이상 반응시키고, TBST로 60분간 세척한 다음 membrane에 ECL solution을 반응시켜 발생된 형광을 X-ray film에 감광시켰다.

7) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법¹⁶과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

8) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's *t*-test를 이용하여 통계 처리하였다.

III. 결 과

1. 地骨皮의 세포 독성 측정

地骨皮를 농도별 (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml)로 처리하였을 때 각각의 농도에서 116.03, 121.27, 120.69, 112.43, 106.57, 89.05, 85.78%의 생존율을 나타내어 400 μ g/ml까지는 독성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

2. 地骨皮의 세포 보호 효과

H₂O₂ 100 mM을 처리하였을 때 세포 생존율은 58.21%였으나, 地骨皮 추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml로 전처리한 경우에 생존율이 각각 62.03, 69.06, 73.12, 76.74, 72.71, 53.90, 50.81%로 나타나 400 μ g/ml까지는 H₂O₂에 의한 세포사를 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

3. 신장상피세포에서 \cdot O₂⁻, NO 및 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

\cdot O₂⁻는 정상 세포에서 113.52 \pm 7.28 fluorescence/min 인데 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 172.68 \pm 10.21 fluorescence/min으로 생성이 증가하였으나 地骨皮 추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소하여 200 μ g/ml 농도에서 142.22 \pm 10.28 fluorescence/min, 400 μ g/ml 농도에서 139.74 \pm 9.13 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3A).

NO는 정상 세포에서 68.31±5.89 fluorescence/min 인데 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 117.28±8.21 fluorescence/min으로 생성이 증가하였으나 地骨皮 추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소하여 200 μg/ml 농도에서 103.98±7.05 fluorescence/min, 400 μg/ml 농도에서 97.25±7.23 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3B).

ONOO는 정상세포에서 180.68±7.77 fluorescence/min 인데 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 320.53±12.71 fluorescence/min으로 생성이 증가하였으나 地骨皮 추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소하여 200 μg/ml 농도에서 275.88±16.23 fluorescence/min, 400 μg/ml 농도에서 251.22±13.01 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3C).

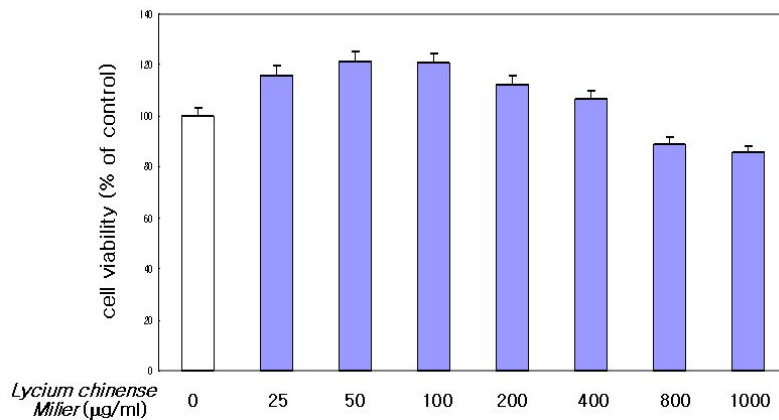


Fig. 1. Cytotoxic effect of *Lycium chinense Milier* in LLC-PK₁ cells.

Cells were exposed to *Lycium chinense Milier* (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml). After 24-hr exposure, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean±S.D.

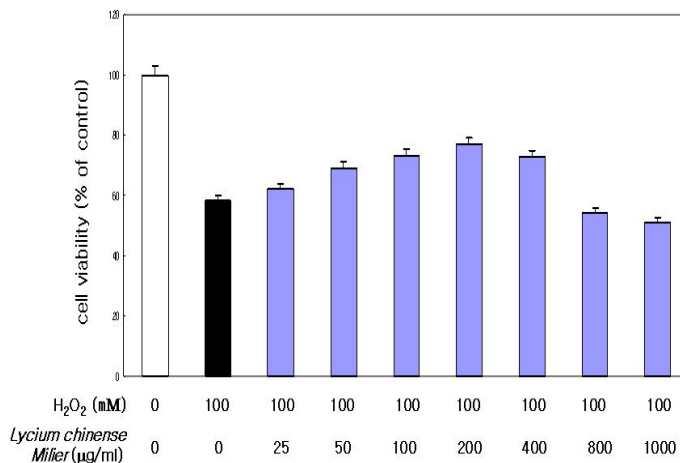


Fig. 2. Cytoprotective effect of *Lycium chinense Milier* on H₂O₂-induced cell death in LLC-PK₁ cells.

Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Lycium chinense Milier* (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml). After 5hr exposure, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean±S.D.

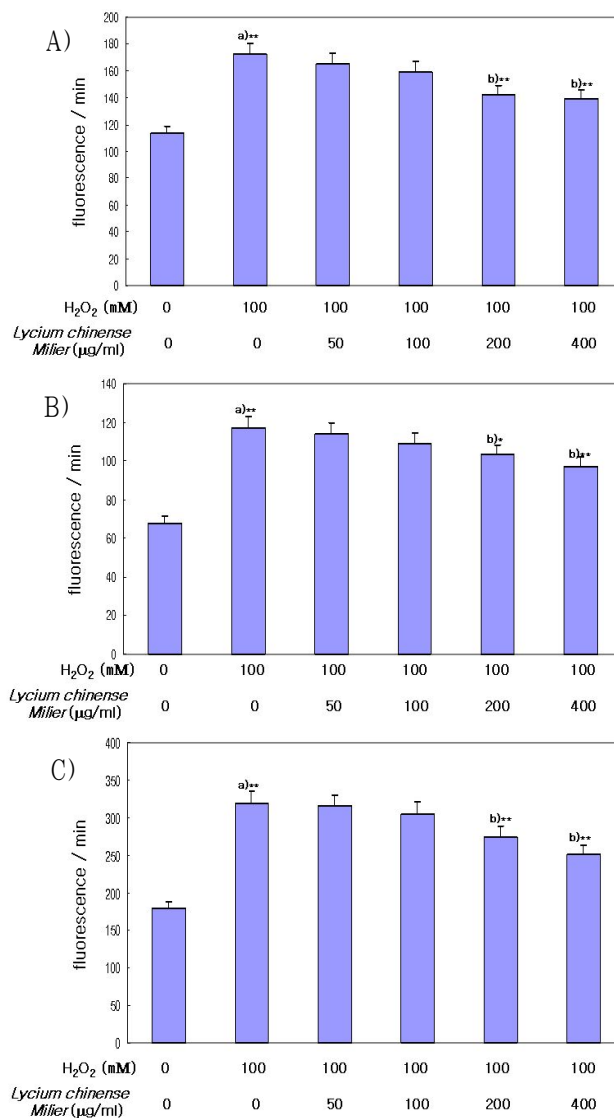


Fig. 3. Effect of *Lycium chinense Milier* on ROS, NO and $ONOO^-$ generation in LLC-PK₁ cells.

Cells were exposed to H_2O_2 (100 mM) in the presence and absence *Lycium chinense Milier* (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$). Results are mean \pm S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). A : The generation of ROS was measured by DCFH-DA fluorescence probe. B : The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. C : The generation of $ONOO^-$ was measured by DHR 123 fluorescence probe.

4. PGE₂ 생성에 미치는 영향

PGE₂ 생성은 정상군에서는 234.58 \pm 9.82 pg/ml인

데 비하여 H_2O_2 를 처리한 대조군에서는 349.21 \pm 15.79 pg/ml로 유의하게 증가하였으나 地骨皮 추출물을

地骨皮가 H₂O₂에 의한 LLC-PK₁ 세포의 Redox Status 및 NF-κB Signaling에 미치는 영향

처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소하여 200, 400 mg/kg 농도에서 299.27±11.95, 292.71±11.54 pg/ml로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

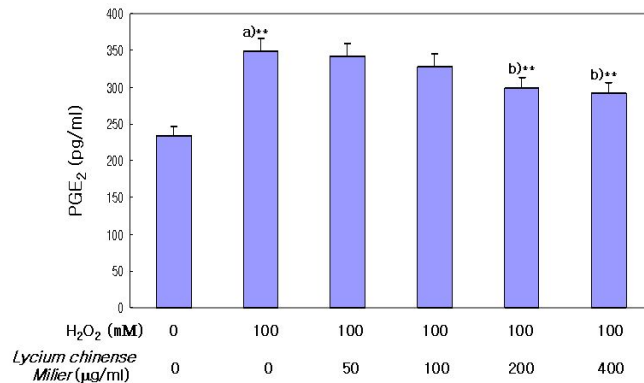


Fig. 4. Effect of *Lycium chinense Milier* on PGE₂ level in LLC-PK₁ cells.

Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Lycium chinense Milier* (50, 100, 200, 400 µg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01).

5. IKK-α, p-IKK-αβ 및 phospho IκB-α에 미치는 영향

NF-κB 활성화에 관여하는 신호전달체인 IKK-α와 p-IKK-αβ에 미치는 영향을 검토한 결과 정상군에 비하여 H₂O₂를 처리한 대조군에서 증가하였으나 地骨皮 추출물을 처리한 실험군에서는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5A-B).

Phospho IκB-α는 H₂O₂를 처리한 대조군에서 증가하여 인산화가 진행되었으나 地骨皮 추출물을 처리한 실험군에서는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5C).

6. NF-κB 단백질 양에 미치는 영향

地骨皮 추출물이 ROS 감수성 전사인자인 NF-κ

B의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 핵 내의 p50, p65 양을 조사하였다. NF-κB의 subunit인 p50, p65의 양을 관찰한 결과 정상군에 비하여 H₂O₂를 처리한 대조군에서 증가하였으나 地骨皮 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6).

7. 염증 촉진 인자의 발현에 미치는 영향

地骨皮 추출물이 염증 촉진 인자인 COX-2, iNOS의 단백질 발현 양에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 H₂O₂를 처리한 대조군에서 증가하였으나 地骨皮 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7).

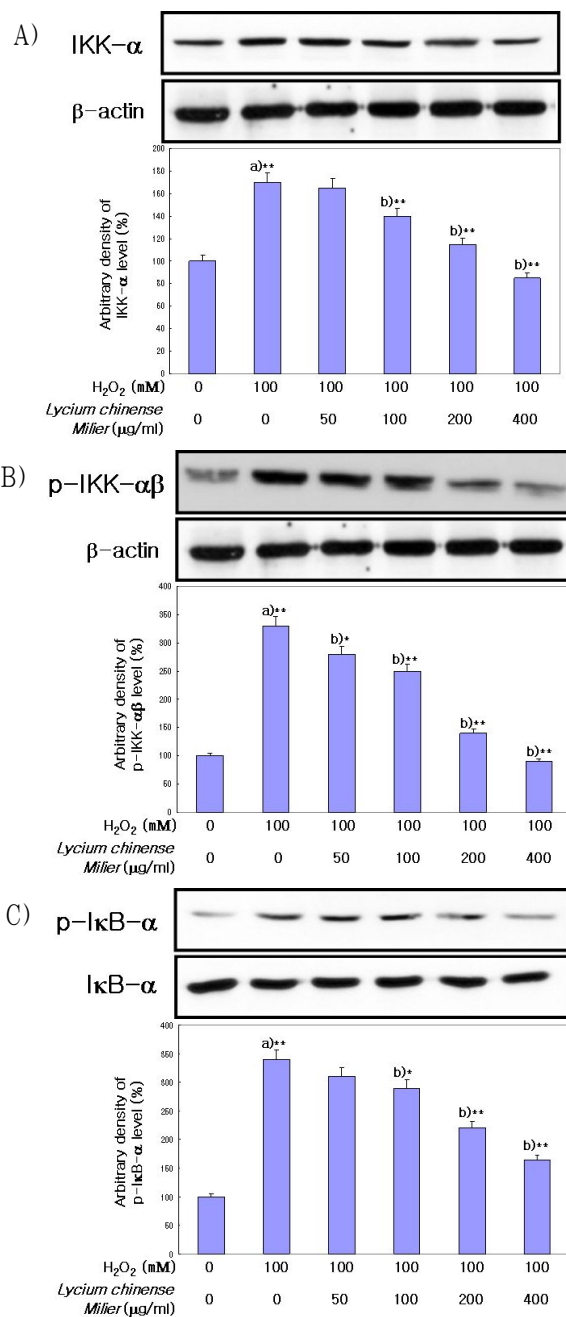


Fig. 5. Effect of *Lycium chinense Milier* on IKK-α, p-IKK-αβ and p-IκB-α expression.

Western blot was performed to detect IKK-α, p-IKK-αβ and p-IκB-α protein level in cytosol fractions from LLC-PK₁. Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Lycium chinense Milier* (50, 100, 200, 400 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (* p < 0.05, ** p < 0.01). A : IKK-α protein, B : p-IKK-αβ protein, C : p-IκB-α protein.

地骨皮가 H₂O₂에 의한 LLC-PK₁ 세포의 Redox Status 및 NF-κB Signaling에 미치는 영향

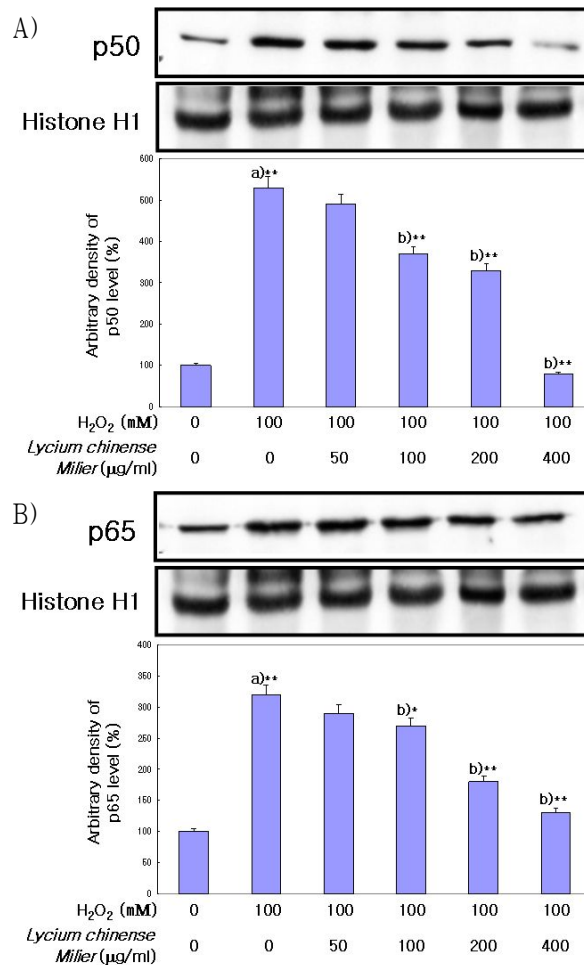


Fig. 6. Effect of *Lycium chinense Milier* on NF-κB expression.

Western blot was performed to detect NF-κB protein level in nuclear fractions from LLC-PK₁. Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Lycium chinense Milier* (50, 100, 200, 400 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (* p < 0.05, ** p < 0.01). A : p50 protein. B : p65 protein.

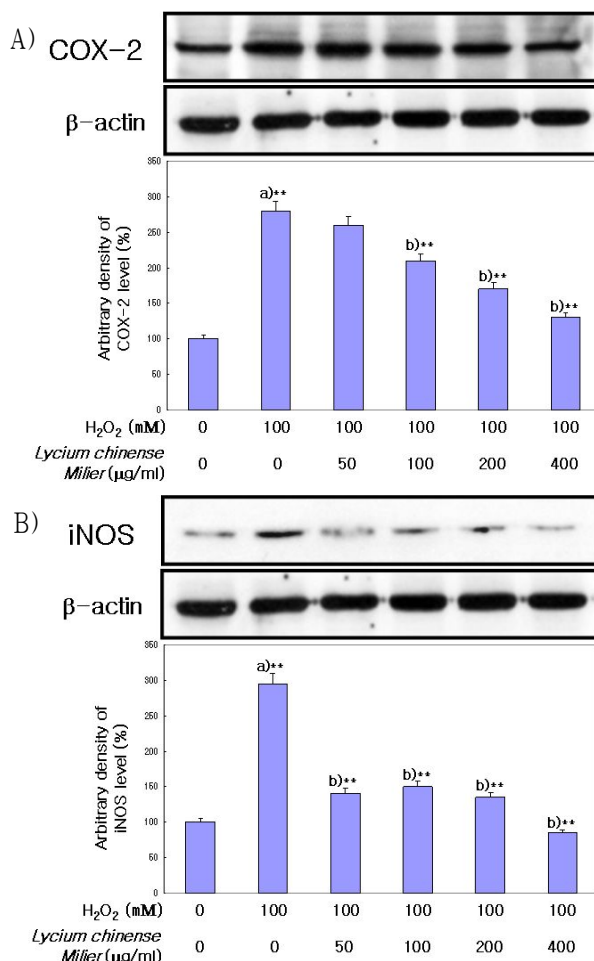


Fig. 7. Effect of *Lycium chinense Milier* on COX-2 and iNOS expression.

Western blot was performed to detect COX-2 and iNOS protein level in cytosol fractions from LLC-PK1. Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Lycium chinense Milier* (50, 100, 200, 400 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01). A : COX-2 protein, B : iNOS protein.

IV. 고찰

地骨皮는 가지과 (Solanaceae)에 속한 枸杞子 (*Lycium chinense Milier*) 또는 寧夏枸杞 (*L. barbarum* L.)의 根皮를 건조한 것으로 杞根, 地骨, 枸杞根, 枸杞根皮라고도 한다⁸. 骨蒸肌熱, 熱勞와 유행성 결막염·치주염·외음부 종창 등의 각종

염증 질환, 옹종, 악성종기, 토혈, 하혈, 소갈증, 치질, 고혈압 등의 치료에 효과가 있다고 하여 내복 혹은 외용하여 사용된다⁹. <東醫寶鑑>⁷에 “去骨熱 煮湯常服佳...善解骨蒸肌熱...能涼血涼骨 剉取三錢 水煎服日二三...治消渴 水煎服之 又取葉作飲啜之... 入足少陰經手少陽經 治有汗骨蒸 善解肌熱”이라고 수록되어 있으며 涼血除蒸, 清肺降火 등의 효능으

로 知母, 鱉甲, 桑白皮, 白茅根, 側柏葉, 地黃, 天花粉 등의 약물과 배합하여 陰虛血熱과 小兒疳疾로 인한 發熱 및 骨蒸潮熱, 盜汗, 肺熱喘咳, 血熱妄行으로 인한 吐血과 衄血, 消渴多尿 등의 증상을 치료하는데 상용하고 있다.⁸

地骨皮의 성분에는 다량의 phenols, betaine이 함유되어 있다고 하나 뿌리껍질에는 betaine이 존재하지 않는다는 보고도 있고, vitamin B₁의 활성을 억제하는 물질이 포함되어 있지만 그의 억제 작용은 cysteine과 vitamin C에 의하여 해제된다고 하며, β-sitosterol, linoleic acid, melissic acid 등이 함유되어 있다.¹⁰ 최근 안¹⁷은 地骨皮 추출물이 자외선 B에 노출된 쥐 피부의 들연변이원성 억제효과, superoxide and hydroxide radical scavenging activity, 단백질 산화 및 지질과산화 억제효과가 있다고 하였고, 조¹¹는 地骨皮의 EA 분획이 CCl₄ 손상간에 대하여 보호 작용이 있음을 보고 하였다. 또한 고¹⁸는 rat의 스트레스로 유발된 기억손상을 억제하였고 부동행동을 감소시켰으며 청반과 복측 피개야에서 tyrosine hydroxylase의 발현을 억제하여 기억증진과 항우울 효과가 있음을 시사하였다. 성⁹은 地骨皮가 혈당강하, 해열, 혈압강하 작용 및 백혈구 수의 변화에 유의한 결과를 나타낸다고 보고 하였으며, 최¹⁹는 streptozotocin으로 유발된 당뇨병성 중 地骨皮 투여군은 β세포에서의 insulin 합성이 활성화되었으며 glucagon의 감소가 유도된 것으로 보고한 바 있다.

본 실험에서는 우선 地骨皮 methanol 추출물의 세포 독성을 측정해 보았는데 400 μg/ml까지는 독성을 나타내지 않았으나 800, 1000 μg/ml에서는 세포 생존율의 감소를 나타내었다. 또한 地骨皮의 세포 보호 효과를 측정해본 바에서도 400 μg/ml까지는 H₂O₂에 의한 세포사를 저해하는 것으로 나타났다. 이는 楡根皮, 丹蔘을 이용한 他 연구^{20,21}에서도 세포 독성 측정시 과도한 농도에서는 세포 손상을 일으킨다는 동일한 결과가 나온 바 있다.

ROS는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydroxyl

radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H₂O₂) 및 singlet oxygen (1O_2) 등을 말하며, 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사 과정을 통해 생성된다²². 비록 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등이 세포 내에서 생성된 ROS를 제거하기 위한 생리적 방어 기전으로 작용하지만, 과도한 ROS는 이들 방어 체계를 초과하여 세포 손상을 초래한다^{23,24}. ROS는 염증반응, 고혈압 및 고지혈증²⁵⁻²⁷에서 세포 신호전달 과정을 매개하고 직접적으로 조직 손상을 유발하여 혈관 기능을 저하시킨다. 특히 $\cdot O_2^-$ 와 H₂O₂는 호기성 세포에서 유해 물질에 노출될 때 과다 생성되면 세포나 조직에 손상을 주며 또한 반응성이 높은 다른 ROS를 형성시킨다^{28,29}.

NO는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 여러 조직과 세포에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성된다. 그러나 NO가 필요 이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응이 유발되어 조직 손상 등의 유해한 작용을 나타내며, 또한 NO는 생체에서 생성된 $\cdot O_2^-$ 와 반응하여 더욱 세포 독성이 강한 ONOO⁻와 같은 이차적인 radical 생성을 일으킨다고 보고되어 있다¹.

ONOO⁻는 지질, 단백질 및 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화 유도에 의한 세포 독성에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, glutathione의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다.³⁰

본 연구에서는 地骨皮 추출물을 전처리한

LLC-PK₁ 세포에 H₂O₂를 주입하여 활성산소 및 활성질소 생성계를 유도한 결과 $\cdot O_2^-$, NO, ONOO⁻의 생성이 농도 의존적으로 억제되었다.

NF-κB는 핵 내의 대표적인 redox sensitive 전사인자로 알려져 있으며 염증 및 산화적 스트레스에 반응하여 COX-2, iNOS, acute-phase proteins, immunoreceptors, 세포접착분자, 다양한 염증성 cytokine 등의 발현을 조절하는 중추적인 역할을 한다¹. NF-κB는 세포질 내에 p50과 p65의 heterodimer와 방해 단백질인 IκB 등과 함께 불활성 형태로 존재하다가 ROS, LPS, cytokine 같은 염증성 자극에 의해 IκB kinase가 활성화되어 IκB가 분해되면 NF-κB는 활성화된 후 핵으로 이동하여 COX-2, iNOS 등의 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{31,32}. COX-2의 경우 각종 만성 질병의 pathogenesis와 관련된 prostaglandin을 합성하는 단계에서 필요한 효소이며 노화나 당뇨와 같은 만성 질병의 경우 그 발현이 증가한다고 보고되고 있고, iNOS는 과잉의 NO 생성에 의해 발현되고 DNA 손상을 일으켜 carcinogenesis를 일으킨다는 실험결과에 따라 세포 내의 조절인자 뿐만 아니라 유해 활성산소종 기능을 가지고 있음이 알려져 있다. 이와 같이 NF-κB의 활성화와 이에 의한 유전자 발현은 노화, 암, 동맥경화 등과 같은 여러 가지 병리적인 상태와 관련이 있는 것으로 알려져 있다¹. 또한 NF-κB의 활성화에 관여하는 신호전달체인 IKK-α, p-IKK-αβ와 p-IκB-α에서 특히 IκB-α는 외부 자극에 의해 활성화된 IKK의 작용으로 IκB-α의 32번과 36번의 serine이 인산화된 후에 prostaglandin 경로를 통해 분해된다³³. 보통 다수의 항염증 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성을 억제하며 이는 COX-2의 생성 및 효소 활성저해에 의한 것이다. COX는 COX-1과 COX-2로 구분되는데, 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin을 합성하고³⁴ COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발

현된다^{34,35}. 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다.

이에 본 실험에서는 COX-2에 의해서 세포 내에서 생성되는 염증물질인 PGE₂를 H₂O₂ 처리로 증가시킨 후 地骨皮 추출물 처리를 한 경우에 그 양이 유의하게 감소하였다. 또한 NF-κB 활성화에 관여하는 신호전달체인 IKK-α, p-IKK-αβ와 p-IκB-α는 H₂O₂ 처리에 의해 증가된 것이 地骨皮 추출물 처리에서는 감소하는 것으로 나타났다. 地骨皮 추출물이 ROS 감수성 전사인자인 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 핵 내의 p50, p65 양을 조사한 바 H₂O₂ 처리에 의해 핵 내의 p50, p65 단백질 양이 증가하였으나 地骨皮 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 地骨皮 추출물은 NF-κB의 활성화로 인한 여러 가지 염증 지표 단백질의 발현을 억제하는 것으로 여겨진다. 또한 地骨皮 추출물이 염증 촉진 인자인 COX-2, iNOS의 단백질 발현량에 미치는 영향을 관찰한 결과에서도 H₂O₂ 처리에 의해 발현량이 증가하였으나 地骨皮 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 연구에서 地骨皮는 400 μg/ml 이하의 농도에서는 세포 독성이 없었으며 H₂O₂ 처리에 의한 세포사를 방지하였고, $\cdot O_2^-$, NO, ONOO⁻의 생성을 감소시켜 항산화 효과를 나타내었다. 또한 H₂O₂ 처리로 증가된 IKK-α, p-IKK-αβ, p-IκB-α와 NF-κB의 핵 내 heterodimer 형태의 전위인자인 p50, p65를 억제함으로써 NF-κB의 활성화를 제어하였으며, 염증 촉진 인자인 COX-2, iNOS의 발현과 염증 물질인 PGE₂의 생성을 억제하였다. 이와 같이 地骨皮는 여러 가지 염증인자 발현의 기전을 제어함으로써 항염증 효과를 나타내었으며, 염증 및 염증성 질환의 조절에 유효한 약제가 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

地骨皮 추출물이 LLC-PK₁ 세포에서 H₂O₂에 의한 세포사 보호 효과와 염증 억제 효능이 있는지를 확인하기 위하여 ·O₂⁻, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂ 생성과 NF-κB와 관련된 염증성 단백질에 미치는 영향을 검토하였다.

地骨皮 추출물은 400 μg/ml까지는 H₂O₂ 처리로 인한 세포사를 방지하여 세포 생존율을 증가시켰다. 또한 地骨皮 추출물은 H₂O₂ 처리로 유도된 ·O₂⁻, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂의 생성, 증가된 IKK-α, p-IKK-αβ, p-IκB-α 및 NF-κB의 활성화와 COX-2, iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.

이상의 결과로 地骨皮는 H₂O₂에 의한 ·O₂⁻, NO, ONOO⁻의 생성을 억제하여 항산화 효과를 나타내었고, NF-κB와 관련한 염증유발 유전자의 발현 제어와 COX-2, iNOS, PGE₂와 관련한 염증인자 단백질의 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 보이는 바 염증 및 염증성 질환의 조절 약물로 작용할 수 있는 가능성이 시사되었다.

참고문헌

1. 최미진, 흑미의 항산화 및 항노화 효과와 작용기작 연구. 부산대학교 석사학위논문. 2008:23.
2. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltshmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor NF-κB is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 1996;97:1715-22.
3. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-κB transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991;2247-52.
4. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear

factor B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Res Commun.* 1992;17:221-37.

5. Luo SF, Wang CC, Chien CS, Hsiao LD, Yang CM. Induction of cyclooxygenase-2 by lipopolysaccharide in canine tracheal smooth muscle cells : involvement of p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappa B pathways. *Cell Signal.* 2003;15:497-509.
6. Del Arco PG, Martinez-Martinez S, CalvoV, Armesilla AL, Redondo JM. Antioxidants and AP-1 activation: a brief overview. *Immunobiology.* 1997;198:273-8.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 2001, p. 296, 510, 738.
8. 전국한의과대학 본초학교수 共編著. 본초학. 서울: 영림사; 2000, p. 237-8.
9. 성낙기, 김성훈, 서영배, 오안향. 地骨皮와 枸杞梗皮가 혈당, 해열, 혈압 및 혈액학적 변화에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 1994;9(1):161-71.
10. 중약대사전 편찬위원회. 중약대사전. 서울: 정담; 1997, p. 3929-34.
11. 조영주, 김성훈. 地骨皮 EA 분획의 CCl₄ 손상 간에 대한 보호 작용. *동의병리학회지.* 1997;11(2):63-71.
12. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986;93(2):157-65.
13. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 1983;134:111-6.
14. Nagata N, Momose K, Ishida Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein.

- DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem Tokyo*. 1999;125:658-61.
15. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 1994;16:149-56.
 16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
 17. 안병용, 광준수, 류승희, 문갑순, 최동성, 박성혜, 한중현. 자외선 B에 노출된 쥐 표피의 지질과산화에 대한 地骨皮 물 추출물의 보호 효과. *한국응용생명화학회지*. 2002;45(4):218-22.
 18. 고동균, 이태희. 地骨皮가 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. *대한본초학회지*. 2007;22(2):137-46.
 19. 최해운, 정태영, 서부일, 김종대, 박동일. Streptozotocin으로 유발된 당뇨병에서 수종의 한약재가 혈당강하에 미치는 영향. *대한본초학회지*. 2003;18(2):121-7.
 20. 조은영, 정지천. 楡根皮 추출물의 활성종 억제 및 염증 촉진인자 제어효과. *대한한방내과학회지*. 2008;29(2):421-31.
 21. 김상범, 정지천. H₂O₂에 의한 신장 세포 손상에 대한 丹蔘 추출물의 방지 효과. *대한한의학회지*. 1994;25(2):144-52.
 22. 이동규, 이호균, 최수진나, 정상영. Myciphenolic acid가 사람 jurkat 세포의 자멸사에서 활성 산소 생성에 미치는 영향. *대한외과학회지*. 2008;75(3):149-55.
 23. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In *Textbook of Surgery: Free radicals in biology and medicine*. Oxford:Clarendon Press. 1989;2:86-9.
 24. Lee WA, Gu L, Miksztal AR, Chu N, Leung K, Nelson PH. Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm Res*. 1990;7:161-6.
 25. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative disease: a hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Rad Biol Med*. 1999;26:1346-55.
 26. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43:562-71.
 27. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*. 1993;91:2546-51
 28. Simon RH, Scoggin CH, Patterson D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem*. 1981;256(14):7181-6.
 29. Shingu M, Oribe M, Todoroki T, Tatsukama K, Tomo-oka K, Yasuda M, et al. Serum factors from patients with systemic lupus erythematosus enhancing superoxide generation by normal neutrophils. *J. Invest. Dermatol*. 1983;81(3):212-5.
 30. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232(1):164-8.
 31. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. *Nat Med*.

- 2001;7(12):1291-7.
32. Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-κB. *FEBS Lett.* 1999;442(1):89-94.
 33. 윤호일, 이창훈, 이희석, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규. FK506과 cyclosporin A가 기관지상피세포, 단핵구, 림프구 및 폐포대식세포에서 IκBα 분해 및 IKKα 활성화에 미치는 효과. 대한 결핵 및 호흡기학회. 2003;54(4):449-58.
 34. Masferrer J, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isacson PC and Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 1994;91:3228-32.
 35. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L and Ksaxon P. Pharmacological and biochemical demonstration and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:12013-7.