

## 寶豆散 메탄올 추출물의 항염증 효과

김관준<sup>2</sup>, 윤현정<sup>1</sup>, 허숙경<sup>1</sup>, 김경애<sup>2</sup>, 김동완<sup>2</sup>, 김재은<sup>3</sup>, 박선동<sup>1,2\*</sup>

1: 동국대학교 심혈관계질환 천연물 연구개발센터 2: 동국대학교 한의과대학 방제학교실  
3: 동국대학교 한의과대학 병리학교실

### Anti-inflammatory Effect of *Bodusan*

Pan-Joon Kim<sup>2</sup>, Hyun-Jeong Yun<sup>1</sup>, Sook-Kyoung Heo<sup>1</sup>, Kyoung-Ae Kim<sup>2</sup>,  
Dong-Wan Kim<sup>2</sup>, Jae-Eun Kim<sup>3</sup>, Sun-Dong Park<sup>1,2\*</sup>

1: Cardiovascular Medical Research Center, Dongguk University,  
2: Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University  
3: Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

### ABSTRACT

**Objectives** : Inflammation is important event in the development of vascular diseases including hypertension, atherosclerosis, and restenosis. *Bodusan* (BDS) was a traditional Korean herbal medicine and widely used in treatment of gastrointestinal complaint and stomach ulcer. The aim of this study was to determine whether BDS and its components inhibit production of nitrite, PGE2 and proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 macrophages.

**Methods** : Cytotoxic activity of BDS and its components on RAW 264.7 cells was using 5-(3-carboxymicrophages.eth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. The nitric oxide (NO) production was measured by Griess reagent system. And proinflammatory cytokines were measured by ELISA kit. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression were detected by western blot.

**Results** : Our results indicated that BDS and its components significantly inhibited the LPS-induced NO and PGE2 production. Moreover, BDS and its components inhibited iNOS and COX-2 expression accompanied by an attenuation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 formation in macrophages.

**Conclusions** : These results indicate that BDS and its components have potential as an anti-inflammatory agent.

**Key words** : *Bodusan* (BDS), *Strychni ignatii* Semen (SIS), *Glycyrrhizae* Radix (GR), cytokine, inflammation

## 서 론

寶豆(*Strychnos ignatii* Semen)는 마전과(Loganiaceae)에 속하는 상록관목인 보두나무의 종자를 말한다. 민간에서 진통, 진경, 지혈, 구충, 그리고 해독작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 복통, 위궤양, 위암 등에 활용되어 왔는데 한 번에 약 0.3-0.9 g씩 가루로 복용한다. 임상에서는 寶豆를 修治法에 따라 분말로 甘草와 배합하여 寶豆散이라

부르며 항암치료나 진통제 등으로 사용되어 왔다<sup>1,2)</sup>.

보두에는 같은 마전과의 생약인 마전자의 특성과 유사하나 strychnine과 brucine, 휘발성분, 수지, 색소, 불휘발성유, 그리고 bassorin이 더 많이 함유되어 있으며 배아나 전분은 없다. 보두는 마전자처럼 강장작용을 하거나 흥분을 야기시키는데, 가격이 싸서 일반적으로 마전자의 대용품으로서 사용되어 왔다. 고대의 기록에는 콜레라에 대한 치료약물로 알려져 왔다. 이것은 특정형태의 심장질

\* 교신저자 : 박선동, 경충 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실  
· Tel : 054-770-2654 · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr  
· 접수 : 2009년 5월 15일 · 수정 : 2009년 6월 22일 · 채택 : 2009년 6월 22일

환에 유용하며 대단한 주의가 요구되는데 이는 활성이 강하고 강력한 독성을 가지고 있기 때문이다. 이에 대한 해독은 물론이다<sup>3)</sup>. 특히 strychnine과 brucine은 강력한 독성을 가지는 알칼로이드로서 Strychnos속 식물에 상존하는데 이 식물들은 일찍이 한약처방에서 종종 신경 질환, 구토, 관절 그리고 외상통증을 치료하기 위해 활용되어 왔다<sup>4)</sup>.

염증(inflammation)은 생체조직의 외부 자극에 대한 방어반응의 하나로서 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(proinflammatory mediators)이 만들어지는데 이로 인하여 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다. 염증인자에는 iNOS에 의해서 만들어지는 NO와 COX-2에 의해서 만들어지는 PGE<sub>2</sub> 등이 있다. 이러한 염증인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 염증을 일으킨다<sup>5,6)</sup>.

보두 관련 보고로 김<sup>7)</sup>은 烏貝散과 보두의 병용 *in vivo* 실험에서 진통작용, 수면 시간 연장, 장관운동항진, 위 운동 억제, 궤양 발생 억제, 위손상 억제, 그리고 위산 분비 억제효과가 있다고 하였다. 조<sup>8)</sup>는 보두의 修治法에 따라 strychnine 감소가 있었고, 또한 유문결찰케양과 indomethacin 유발 궤양에 대한 억제효과와 위액 분비 억제와 더불어 pepsin 억제효과도 수치에 의해 유의성을 나타낸다고 보고하였다. 윤<sup>9)</sup>은 보두산이 사람 위암 세포주인 SNU-1의 caspases의 활성화와, mitochondrial pathway<sup>10,11)</sup>를 통해 apoptosis를 유도한다는 것을 확인하였으며, cell cycle 중 G1 phase에서 arrest시켜 세포의 증식을 억제함으로써 보두산의 항암 활성을 보고한 바 있다. Deng<sup>12)</sup>과 Yina<sup>13)</sup>은 보두의 주성분인 brucine의 HepG2세포와 SMMC 7221세포의 증식억제기전은 caspase-3를 경유하고 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 매개로 한 apoptosis 및 cell cycle arrest를 유도한다고 보고하였다.

보두산 및 보두에 관한 몇몇 보고가 있었지만 그 수가 많지 않았고 작용기전에 관한 연구는 더욱 미흡한 실정이었으며, 특히 항염증 활성에 관한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 보두산과 그 구성약재인 보두, 감초의 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 각각의 약제를 전 처리한 후 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 염증반응을 유도하고, 각각의 약제가 세포의 염증 유도를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는지 관찰하였다. 그 지표로서 세포가 방출하는 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) 생성량과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2 발현정도뿐만 아니라 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 생성량 등을 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제 학교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 보두산의 구성 및 총량은 Table 1과 같다. 보두는 식초에 24시간 수침한 후 사용하였다. 약재 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 보두산 84.5 g (수율 : 16.9%)을 얻었다. 또한 보두, 감초는 각각 62.4 g (수율 : 20.8%), 47.4 g (수율 : 15.8%)을 얻었다(Fig. 1). 이 분말을 세포배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 녹여 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition and Contents of *Bodusan* (BDS)

약재명	생약명	사용량 (g)
보두	<i>Strychnos ignatii</i> Semen (SIS)	100
감초	<i>Glycyrrhizae</i> Radix (GR)	400
총량		500
수율		16.9%

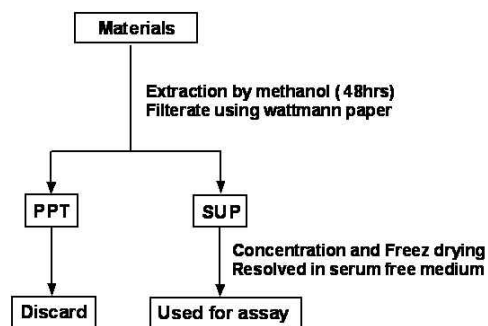


Fig. 1. Preparation procedure of BDS, SIS, GR extracts

#### 2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사(NY, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 Sodium Dodesyl Sulfate (SDS), Acrylamide, Bis는 Bio-Rad사(CA, USA)에서 구입하였고, NP-40, CAPS, Tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사(CA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 iNOS monoclonal antibody (mAb)는 Santa Cruz Biotechnology사(CA, USA)에서, COX-2 polyclonal antibody와  $\beta$ -actin mAb는 Cell Signaling Technology사(Beverly, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사

(CA, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사(WI, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정을 위한 ELISA kit는 Pierce Biotechnology사(IL, USA)에서 구입하였으며, PGE<sub>2</sub> assay kit는 R&D사(MN, USA)에서 구입하였다. Protein assay reagent는 Bio-Rad사(CA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 2) MTS assay

보두산 및 구성 약제의 메탄올 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymethyl-oxyphenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) assay 방법<sup>14)</sup>으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10<sup>4</sup>/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약제를 농도별(0, 100, 300, 500, 700, 1000 µg/ml)로 18시간 동안 처리하였다. 또한 같은 방법을 이용하여 농도 700 µg/ml을 고정하고 0, 9, 18, 24, 48시간 동안 배양하였다. Well당 20 µl의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

### 3) NO 생성량 측정

NO의 생성량은 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System<sup>15)</sup>을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 700 µg/ml의 보두산 및 보두, 감초의 메탄올 추출물을 1시간 전 처리한 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 실험에 사용하였다. 배양액 50 µl와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

### 4) PGE<sub>2</sub> 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE<sub>2</sub>의 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험하였다. RAW 264.7 세포에 500 µg/ml의 약제메탄올 추출물을 1시간 전 처리한 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각의 배양액을 100 µl씩 loading한다. 여기에 primary antibody solution 50 µl와 PGE<sub>2</sub> conjugate 50 µl씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 µl씩 처리하여 5-20분간 반응시킨 후, 50 µl의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS ; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 세척한 후, lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1-2시간 동안 반응시켰다. 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. ECL system으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

### 6) Cytokines 측정

RAW 264.7 세포에 700 µg/ml의 약제 메탄올 추출물을 1시간 전 처리한 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양한 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 µl씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100 µl의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 µl의 streptavidine-HRP solution을 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate (TMB) 기질을 100 µl

씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 통계처리

실험결과는 means $\pm$ SEM으로 표시하고 유의성 검증은 Prism 4.00을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. Western blot을 통해 얻은 band의 density 분석은 GelDoc-It BioImaging System (UVP, USA)을 사용하여 측정하였다.

## 결 과

### 1. 보두산 및 구성약재의 RAW 264.7 세포생존율에 미치는 영향

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 보두산, 보두, 감초를 농

도별(0-1000  $\mu$ g/ml), 시간별(0-48 hr)로 처리한 후, MTS assay를 수행하였다. 보두산과 감초의 경우 농도별로 18 시간 동안 처리하였을 때 1000  $\mu$ g/ml의 농도까지 세포독성이 거의 관찰되지 않았고 보두의 경우에는 700  $\mu$ g/ml에서 98.8%, 1000  $\mu$ g/ml에서 73.2%의 세포 생존율이 관찰되었다. 따라서 보두산, 보두, 감초 모두 세포 독성이 없는 농도인 700  $\mu$ g/ml 처리한 후 시간별로 MTS assay를 수행한 결과 보두산의 경우 24시간부터 약간의 세포 생존율 감소가 관찰되었고 보두와 감초는 48시간까지 세포의 생존율에 거의 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그래서 보두산, 보두, 감초가 RAW 264.7의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 700  $\mu$ g/ml의 농도로 18시간 처리하여 다음 실험을 진행하였다.

### 2. 보두산 및 구성약재가 LPS에 의한 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성량에 미치는 영향

보두산 및 보두, 감초의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약재 700  $\mu$ g/ml의 농도를 1시간

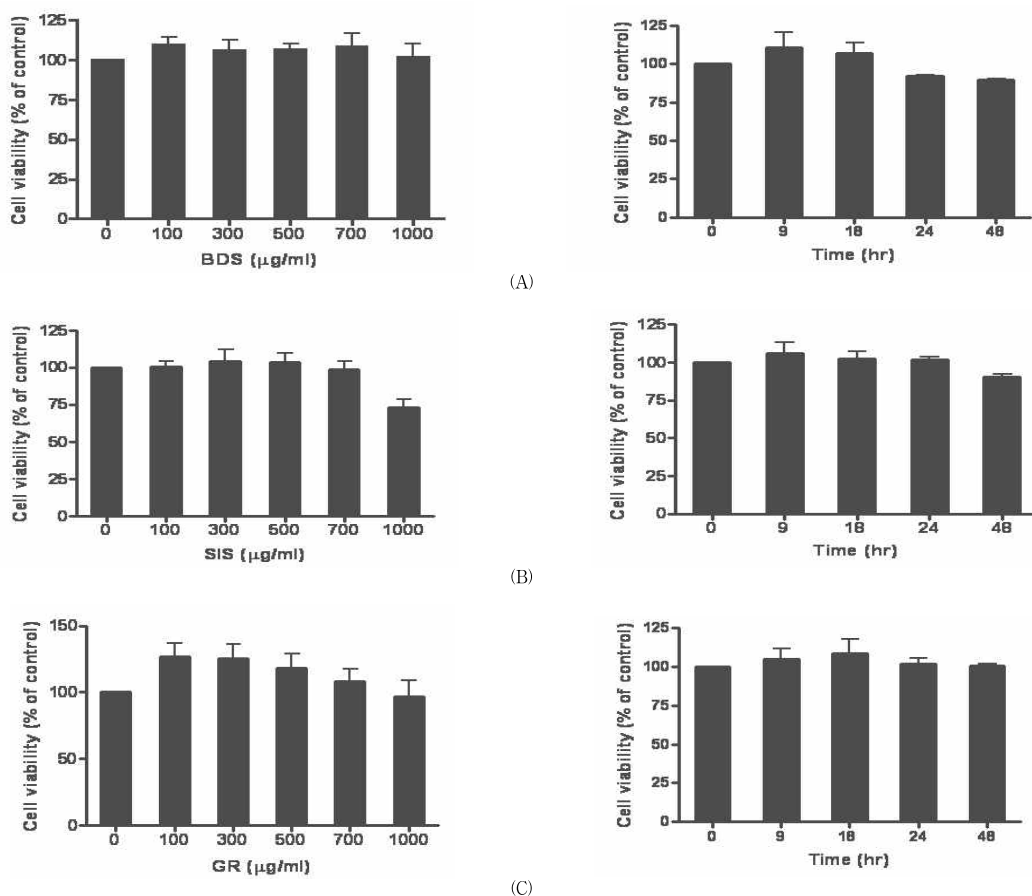


Fig. 2. Effect of BDS, SIS and GR on the cell viability of RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 100, 300, 500, 700, 1000  $\mu$ g/ml) of BDS (A), SIS (B) and GR (C) for 18 hr (left panel). RAW 264.7 cells were treated with 700  $\mu$ g/ml of BDS, SIS and GR for 0, 9, 18, 24, 48 hr (right panel). Cell viability was measured by MTS assay as described in Materials and Methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

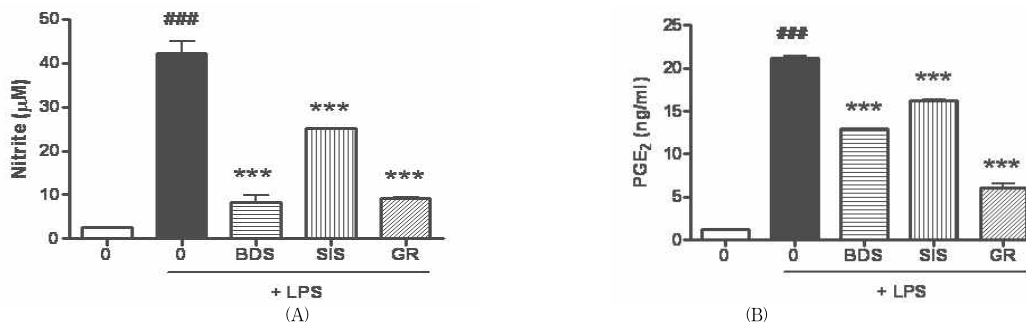


Fig. 3. Inhibition of LPS-induced NO and PGE<sub>2</sub> by BDS, SIS and GR

RAW 264.7 cells were preincubated with 700 µg/ml of BDS, SIS and GR for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The NO production was measured by Griess Reagent System as described in Materials and Methods (A). The PGE<sub>2</sub> production was measured by ELISA as described in Materials and Methods (B). Data are represented as mean±SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (\*); ##, \*\*\* :  $p < 0.001$ .

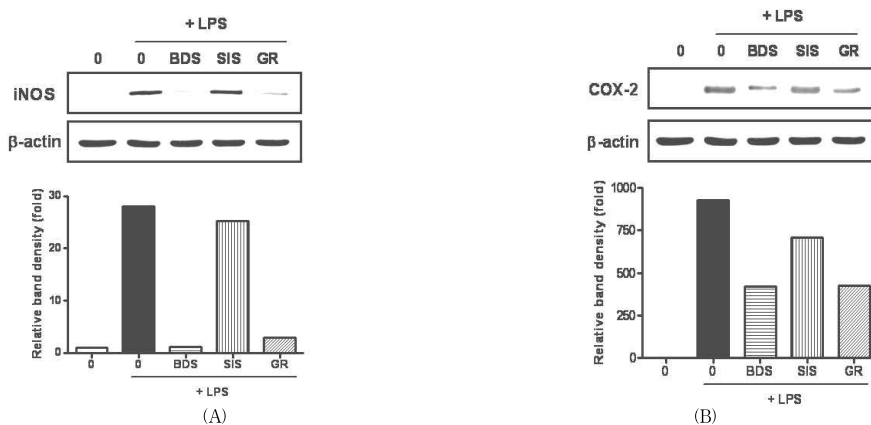


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by BDS, SIS and GR.

RAW 264.7 cells were preincubated with 700 µg/ml of BDS, SIS and GR for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of iNOS (A) and COX-2 (B) were determined by western blotting as described in Materials and Methods. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. β-actin levels were used as internal markers for loading variation.

동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성량에 미치는 영향을 같은 방법으로 조사한 결과, 보두산의 경우에는 69.5% 감소시켰고, 보두는 38.9%, 감초는 77.4% 감소시켰다(Fig. 3A). LPS에 의해 유도되는 PGE<sub>2</sub>의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 보두산의 경우에는 39.1% 감소시켰고, 보두는 23.2%, 감초는 71.3% 감소시켰다 (Fig. 3B). 보두산과 그 구성약제인 보두, 감초 모두 LPS로 유도된 NO와 PGE<sub>2</sub>를 효과적으로 감소시키는 것으로 확인되었다.

### 3. 보두산 및 구성약제가 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

보두산 및 보두, 감초의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약제 700 µg/ml의 농도를 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 iNOS의 발현에 미치는 영향

을 같은 방법으로 조사한 결과, 보두산의 경우에는 96.1% 감소시켰고, 보두는 10.0%, 감초는 89.7% 감소시켰다(Fig. 4A). 또한 LPS에 의해 유도되는 COX-2 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 보두산의 경우에는 54.3%, 보두는 23.6%, 감초는 54.0%까지 감소시켰다 (Fig. 4B). 보두산 및 그 구성약제들은 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 효과적으로 감소시키는 것으로 관찰되었다.

### 4. 보두산 및 구성약제가 LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향

약제의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약제 700 µg/ml의 농도를 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보듯이 LPS에 의해 유도

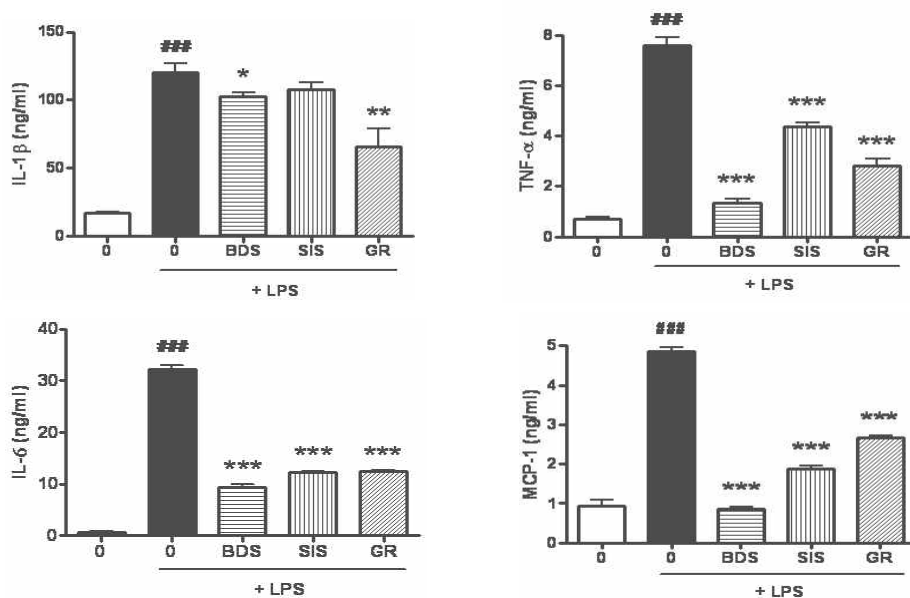


Fig. 5. Inhibition of LPS-induced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 by BDS, SIS and GR

RAW 264.7 cells were preincubated with 700  $\mu$ g/ml of BDS, SIS and GR for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The cytokine level was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as mean $\pm$ SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (\*).

\* :  $p < 0.01$ . \*\* :  $p < 0.05$ . ### :  $p < 0.001$

되는 TNF- $\alpha$ 의 생성량이 보두산에 의해 81.5%까지 감소되었고, 보두는 41.2%까지, 감초는 62.9%까지 감소되었다. IL-1 $\beta$ 의 생성량은 보두산에 의해 70.7%까지 감소되었고, 보두는 61.9%까지, 감초는 61.1%까지 감소되었으며, IL-6 생성량은 보두산에 의해 13.9%까지 감소되었고, 보두는 9.6%까지, 감초는 26.8%까지 감소되었다. MCP-1은 보두산에 의해 82.2%까지 감소되었고, 보두는 61.5%까지, 감초는 45.2%까지 감소되었다. 보두산, 보두, 감초 모두 LPS로 유도된 염증성 사이토카인을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, 그 중 복방인 보두산의 효과가 가장 탁월한 것을 확인할 수 있었다.

## 고찰

뇌혈관 및 심장질환은 현재 의학적으로 많은 관심을 보이고 있어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 혈관질환은 동맥이 약 70% 폐색이 되어도 통증을 느낄 수 없는 병증으로 질환해석과 발병요인에 대한 것은 물론 개선제의 개발이 미약한 분야로 혈관질환을 개선하는 예방 및 치료제의 개발에 대한 여지가 높은 질환으로 부각이 되었다. 특히 동맥경화 질환은 대표적인 만성 염증성 질환(chronic inflammatory disease)이다.

염증(inflammation)은 생체조직의 외부 자극에 대한 방어반응의 하나로서 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(proinflammatory mediators)이 만들어지는데 이로 인하여 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다. 염증인자에는 iNOS에 의해

서 만들어지는 NO와 COX-2에 의해서 만들어지는 PGE<sub>2</sub> 등이 있다. 이러한 염증인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 염증을 일으킨다<sup>16,17</sup>. 포유동물 세포의 NOS의 경우, 유사형태가 3가지 존재하는데 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), 그리고 iNOS이다. 그 중에서 특히 iNOS가 염증반응에 관여한다. nNOS와 eNOS는 항상 발현되어있으며, iNOS의 경우 Interferon- $\gamma$ , LPS, 그리고 여러 가지 염증성 사이토카인의 자극 있을 때 발현된다. 보통 eNOS는 강력한 혈관확장제로서 혈관의 항상성(vascular homeostasis) 유지에 중요한 역할을 한다<sup>18</sup>. 또한 NO는 급성, 만성 염증반응을 조절하기도 한다. PGE<sub>2</sub>는 COX에 의해서 arachidonic acid로부터 생산된다. COX에 대해서는 1990년대 초반에 주로 연구되었는데, 이 또한 유사형태가 2가지 존재한다. COX-1은 거의 모든 조직에 발현되어 있고, prostaglandin을 생산하여 신장의 혈액 흐름을 조절하거나 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적인 기능을 조절한다. 반대로 COX-2의 경우는 미생물에 의한 감염이나 손상 혹은 여러 요인의 스트레스에 반응한 대식세포 (macrophage)에서 발현된다. 즉 iNOS와 COX-2의 발현과 NO, PGE<sub>2</sub>의 생산은 면역세포의 대표적인 염증인자이다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 등이 포함된다.

최근 천연자원으로부터 혈관 재협착 억제제, 동맥경화 예방 물질에 대한 관심이 집중되고 있다. 천연 자원은 지금까지도 여러 치료제의 선도물질로서 개발되어 제약 산업에 소중한 자원으로 이용되어 왔다. 동맥경화 질환은

대표적인 만성 염증성 질환인데, 이러한 질환의 예방효과를 탐색하는 연구가 경쟁적으로 진행되고 있는 실정이다. 본 연구에서는 보두산 및 구성 약재 메탄올 추출물을 마우스 대식세포에 전 처리한 후, 염증에 대한 예방효과를 확인하고 동맥경화 예방 후보물질로서의 가능성을 찾아 보고자 하였다.

보두는 苦果 혹은 呂宋果라고도 불리우며, 여충두의 종자로 식초나 쌀뜨물에 담가서 유연할 때 잘게 썰어 사용한다. 성미는 苦寒有毒하고, 心, 胃, 肝經에 들어간다. 진통, 진경, 지혈, 구충, 해독하는 효능이 있어, 복통, 위궤양, 위암, 충적복통, 뱀 및 오공교상을 주치한다. 가루로 복용하거나 기름에 개어 환처에 사용하는데 용량은 1일 0.3-0.9g이다. 보두산은 민간에서 진통, 진경, 지혈, 구충, 그리고 해독작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 복통, 위궤양, 위암 등에 활용되어 왔고, 임상에서는 항암치료나 진통제 등으로 사용되어 왔다<sup>1,2)</sup>. 최근 연구로 윤<sup>9)</sup>은 보두산이 사람 위암 세포주인 SNU-1의 caspases의 활성화와, mitochondrial pathway를 통해 apoptosis를 유도한다는 것을 확인하였고, cell cycle 중 G1 phase에서 arrest시킴으로써 세포의 증식을 억제하는 보두산의 항암 활성을 보고한 바 있으나, 대식세포에서 보두산 메탄올 추출물의 항염증효과는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 약재의 메탄올 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 각각의 약재를 1시간 동안 전 처리한 후 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하였다. 그 다음 각각의 약재가 세포의 염증 유도를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는지 관찰하였다.

먼저 RAW 264.7 세포에 대한 약재의 독성을 알아보기 위하여 보두산과 그 구성약재인 보두, 감초를 농도별, 시간별로 처리한 후 MTS assay를 수행하였다. 보두산과 감초의 경우 농도별로 18시간 동안 처리하였을 때 1,000 µg/ml의 농도까지 세포독성이 거의 관찰되지 않았다. 보두의 경우에는 700 µg/ml까지 세포의 생존율에 영향이 없었고 1,000 µg/ml에서 세포독성이 관찰되었다. 따라서 보두산, 보두, 감초 모두 세포 독성이 없는 농도인 700 µg/ml 처리한 후 시간별로 MTS assay를 수행한 결과 보두산의 경우 24시간부터 약간의 세포생존율 감소가 관찰되었고 보두와 감초는 48시간까지 세포의 생존율에 거의 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 보두산, 보두, 감초가 RAW 264.7의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 700 µg/ml의 농도로 18시간 처리하여 다음 실험을 진행하였다. 이는 보두산과 그 구성약재들이 보여주는 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성에 의한 것임을 말한다.

RAW 264.7에 보두산과 보두, 감초를 700 µg/ml 처리하여 1시간이 지난 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 다음으로 염증인자인 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성량, iNOS, COX-2 발현양상, 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP-1의 생성량의 미치는 영

향을 측정하였다. 그 결과 보두산과 그 구성 약재가 모두 LPS로 유도된 염증인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 복방인 보두산이 염증성 사이토카인들의 억제효과가 탁월하였다.

이러한 실험 결과들로 보아, 보두산 및 그 구성약재는 강력한 항염증 활성을 가지고 있음을 알 수 있었고, 전체적으로 보두산의 효과가 탁월함을 확인할 수 있었다. 따라서 보두와 감초의 복방인 보두산이 가장 이상적인 항염증 활성을 가지는 것으로 보인다. 따라서 동맥경화를 비롯한 고혈압, 당뇨병, 암이나 관절염 등 염증기작으로 인하여 생기는 많은 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

마우스 대식세포에서 보두산 및 그 구성약재의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

동맥경화 질환은 대표적인 만성 염증성 질환인데, 이러한 질환의 예방효과를 알아보기 위하여 약재를 전 처리하여 본 실험에서 선택한 약재가 동맥경화의 예방효과가 있는지를 알아보았다.

먼저 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 보두산, 보두, 감초의 독성 효과를 조사하여 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(700 µg/ml)에서 실험을 진행하였다. 이는 보두산과 그 구성약재들이 보여주는 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 활성에 의한 것임을 말한다.

RAW 264.7 세포에 약재를 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 결과 보두산과 그 구성약재들이 LPS로 유도되어야 할 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성량과 iNOS, COX-2의 발현을 크게 저해하였고, 또한 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP-1의 생성량도 크게 감소시켰다.

이러한 실험 결과들로 보아 보두산 및 그 구성약재는 항염증 효과를 가지고 있으며, 그 중 보두산이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 동맥경화를 비롯한 고혈압, 당뇨병, 암이나 관절염 등 염증기작으로 인하여 생기는 많은 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터 육성사업(R13-2005-013-01000-0)의 지원으로 수행되었음

## 참고문헌

1. 신길구. 신씨본초학. 서울 : 수문사. 1982 : 705.
2. 김재길. 흰색천연약물대사전 (상). 서울 : 남산당. 1984 : 215.
3. Geneviève Philippe, Luc Angenot, Monique Tits, Michel Frédéric. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. *Toxicon*. 2004 ; 44(1) : 405-16.
4. The Committee of the Pharmacopoeia of the Ministry of Health of the people's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. vol 1. Beijing : Chemical Industry Press. 2000 : 38.
5. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim J. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kappa B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells*. 2007 ; 23(3) : 398-404.
6. Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsuji S, Tsujii M, Hayashi N, Kawano S. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF-kappaB. *Dig Dis Sci*. 2007 ; 52(8) : 1890-6.
7. 김태운, 조종관. 烏貝散과 寶豆의 병용투여가 위장관에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 1994 ; 15(2) : 27-36.
8. 조유경, 김진성, 윤상협, 류봉하, 류기원. 寶豆의 修治法에 따른 毒性 및 消化器系에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2002 ; 23(1) : 107-16.
9. 윤현정, 서교수, 최재우, 이현우, 허숙경, 박원환, 박선동. 보두산(寶豆散)에 의한 SNU-1 세포의 Apoptosis 유도과 Cell cycle arrest. *대한본초학회지*. 2007 ; 22(2) : 35-43.
10. Ahmed MD, Alcock RA, Chendil D, Dey S, Das A, Venkatasubbarao K, Mohiuddin M, Sun L, Strodel WE, Freeman JW. Restoration of transforming growth factor-beta signaling enhances radiosensitivity by altering the Bcl-2/Bax ratio in the p53 mutant pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *J Biol Chem*. 2002 ; 277(3) : 2234-46.
11. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2001 ; 8(3) : 705-11.
12. Xu-Kun Deng, Wu-Yin, Wei-Dong Li, Fang-Zhou Yin, Xiao-Yu Lu, Xiao-Chun Zhang, Zi-Chun Hua, Bao-Chang Cai. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cells and its possible mechanism. *J Ethnopharmacol*. 2006 ; 106 : 179-86.
13. Wu Yina, Xu-Kun Dengb, Fang-Zhou Yin, Xiao-Chun Zhang, Bao-Chang Cai. The cytotoxicity induced by brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* proceeds via apoptosis and is mediated by cyclooxygenase 2 and caspase 3 in SMMC 7221 cells. *Food and Chemical Toxicol*. 2007 ; 45 : 700-8.
14. Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci*. 2008 ; 97(7) : 2745-56.
15. Wang S, Chen Y, He D, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol*. 2007 ; 114(3) : 458-62.
16. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim J. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kappa B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells*. 2007 ; 23(3) : 398-404.
17. Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsuji S, Tsujii M, Hayashi N, Kawano S. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF-kappa B. *Dig Dis Sci*. 2007 ; 52(8) : 1890-6.
18. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2007 ; 26(3) : 205-38.