

## 오렁지 추출물의 염증성 세포활성물질 억제효과

김병진<sup>1</sup>, 함경완<sup>2</sup>, 박경배<sup>1</sup>, 김대현<sup>1</sup>, 조범연<sup>2</sup>, 조창래<sup>2</sup>, 조길환<sup>2</sup>,  
배기상<sup>2</sup>, 박경철<sup>2</sup>, 구본순<sup>2</sup>, 김민선<sup>2</sup>, 송호준<sup>2</sup>, 박성주<sup>2\*</sup>

1: 원광대학교 약학대학 한약학과 2: 원광대학교 한의과대학 본초학교실

### Inhibitory Effect of Extract of *Trogopterorum Faeces* on the Production of Inflammatory Mediators

Byung-Jin Kim<sup>1</sup>, Kyung-Wan Ham<sup>2</sup>, Kyung-Bae Park<sup>1</sup>, Dae-Hyeon Kim<sup>1</sup>,  
Beom-Yeon Jo<sup>2</sup>, Chang-Re Cho<sup>2</sup>, Gil-Hwan Cho<sup>2</sup>, Gi-Sang Bae<sup>2</sup>, Kyoung-Chel Park<sup>2</sup>,  
Bon Soon Koo<sup>2</sup>, Min-Sun Kim<sup>2</sup>, Ho-Joon Song<sup>2</sup>, Sung-Joo Park<sup>2\*</sup>

1: Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University  
2: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of extract from *Trogopterorum Faeces* (TF) on the RAW 264.7 cells.

**Methods** : To prove the TF's anti-inflammatory effects, we investigated nitric oxide (NO) production and own cell viability. We examined the cytokine productions on lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells and also cellular regulatory mechanisms.

**Results** : TF does not have any cytotoxic effect. TF reduced LPS-induced NO production, interleukin (IL)-1b, IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in RAW 264.7 cells. TF inhibited the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) and also the degradation of inhibitory kappa B  $\alpha$  (I $\kappa$ -Ba) in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. TF reduced the serum levels of IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ . The survival rate of LPS-induced endotoxin shock was increased by TF administration.

**Conclusions** : TF down-regulated LPS-induced NO and cytokines production, which could provide a clinical basis for anti-inflammatory properties.

**Key words** : *Trogopterorum Faeces* (TF), lipopolysaccharide (LPS), inflammation. RAW 264.7 cells. Endotoxin shock

#### 서 론

五靈脂는 날다람쥐과 동물 橙足鼯鼠와 飛鼠의 말린 분변이다. 일년 내내 수시로 채집할 수 있으나 봄과 가을에 많이 채집할 수 있고 봄에 채집한 것이 품질이 비교적 좋은 것으로 형태에 따라서 靈脂槐과 靈脂米의 두 종류

로 나뉘며 주로 中國의 河北·山西에서 난다. 오렁지는 오래 전부터 이용되어온 주요한 전통한약재로서 活血止痛 및 化痰止血 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

오렁지는 Triterpene 계열 화합물로 goreishic acid<sup>2)</sup>, 3-O-cis-p-coumaroyltormentic acid, pomolic acid, 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid 및 jacoumaric acid 등이 함유되어

\* 교신저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 063-850-6450 · E-mail : parksj08@wku.ac.kr  
· 접수 : 2009년 8월 31일 · 수정 : 2009년 9월 17일 · 채택 : 2009년 9월 23일

있으며<sup>3)</sup>, 기타 6H-dibenzo [b,d] -pyran-6-one과 3,8,10-trihydroxy-6H-dibenzo [b,d] pyran-6-one 등이 함유되어 있다<sup>4)</sup>. 6H-dibenzo [b,d] -pyran-6-one은 hyaluronidase 억제 활성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 또한 오렁지에 대한 연구로는 인삼근과 함께 쥐에 투여할 경우 인삼 단독보다 자극에 대한 저항성이 향상되고, 중앙 상태의 랫드 수명이 연장된다는 보고가 있으며<sup>5)</sup>, 오렁지는 위 분비를 억제하고 점막 혈행 조절기전을 통해 위점막을 보호하는 작용이 있는 것으로 보고되었다<sup>6)</sup>. 그러나 아직 오렁지에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았으며, 오렁지의 항염증성 작용에 대한 명확한 관찰과 그 기전에 대한 규명이 이루어지지 않고 있다. 이에 우리는 염증 반응에 대한 기초적 접근을 하였다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다<sup>7)</sup>.

Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다<sup>8)</sup>. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 LPS로 자극 될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다<sup>9-13)</sup>. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다. 또한 활성화된 대식 세포에서는 interleukin (IL)-1b, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 전염증성 및 염증성 cytokine과 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등을 생산하게 된다<sup>14,15)</sup>. 염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 대장염, 췌장염, 류마티스성 관절염, 천식 등의 각종 인체질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6, IL-10과 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다<sup>16,17)</sup>.

이에 오렁지가 LPS로 유도한 대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 검증하고자 NO, 전염증성 사이토카인(IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ )의 발현을 실험하였고, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) family인 extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) 및 p38에 미치는 영향을 조사하였으며, inhibitory kappa B  $\alpha$  (Ik-Ba)를 조사하였다. 또한 *in vivo*에서 LPS로 유도한 endotoxin shock 실험도 병행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용한 오렁지는 옴니허브(서울, 한국)에서 구

입하였다.

#### 2) 시약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS, Tris-HCl 등은 SIGMA (St. Louis, USA)에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-Ik-Ba, anti-phospho-JNK는 Cell signaling사에서 구입하였다. Anti-mouse IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1b antibodies, 재조합 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1b는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. Endotoxin shock실험에 사용된 LPS (Sero type ; 055, B5)는 SIGMA (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

#### 3) 실험동물

모든 동물은 원광대학교 동물관리규칙에 의해 관리되어졌다. C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트(성남, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 규격화된 마우스장에서 23 $\pm$ 2°C에서 유지되었다. 12시간 동안 밤낮을 유지해 주었고, 멸균된 사료와 물을 공급하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료의 제조

오렁지 물 추출물은 오렁지를 3차 증류수로 2시간 30분 전탕한 후 동결 건조시켜서 용매를 제거하고 그 얻어진 분말을 농도별로 녹여서 실린지 필터로 여과해서 사용했다.

### 2) MTT 분석

RAW 264.7 cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2 $\times$ 10<sup>5</sup>로 개대하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액(pH 4.7)을 첨가함으로써 용해했다. Formazan의 양은 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

### 3) 일산화질소(Nitric Oxide) 농도의 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 cell를 자극하기 전 오렁지 추출물을 1시간 동안 전 처리한 후 그리스 시약을 이용하여 측정하였다. NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트

를린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(Griss reagent A : 2 %의 sulfanilamide + 30 % acetic acid, Griss reagent B : 0.2 %의 naphthyl ethylenediamine dihydrochloride + 60 % acetic acid) 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 각각에 100  $\mu$ 씩을 첨가하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토미터(MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

#### 4) Cytokine (IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 cell를 자극하기 전 오령지 추출물을 1시간 동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS로 자극한 후 24시간 뒤 이들 염증매개물질을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다.

#### 5) Total RNA 추출

Total RNA는 Trizol 시약을 이용하여 추출하였다 먼저 배양한 세포에 귀전우를 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위의 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100  $\mu$ 의 chloroform 용액을 가하고 두세 번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15  $\mu$ 씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다.

#### 6) Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Tri-zol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을

넣고 70°C에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 1X singlestrand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase를 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1xPCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 58°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초를 30 cycle 반복하였다.

PCR반응이 끝난 후 1X 샘플링 buffer를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10  $\mu$ 씩을 넣고 전기영동한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

#### 7) Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에  $5 \times 10^6$  cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI 1640)으로 12시간 starvation 시킨 후 오령지(500 mg/ml)으로 전처리 하고 1시간 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별로(0, 15, 30, 60 min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. Lysis buffer (lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10  $\mu$  + protease inhibitor 10  $\mu$ )를 넣어 단백질을 lysis시켜서 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2 hrs blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 I $\kappa$ -Ba을 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

#### 8) Serum cytokine 측정(IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ )

6주된 C57BL/6 마우스 암컷 10마리에 오령지를 500 mg/kg의 농도로 5일(1회/1일)간 경구투여 하였다. 오령지는 동결건조하여 DW로 녹인 후 필터 하였다. 마지막 경구투여가 끝난 후 1시간 뒤 endotoxin shock를 유발한 LPS (setotype:055.B5)를 Lethal dose (37.5 mg/kg)로 마우스에게 주사하였다. 주사 3시간 후에 마우스의 혈청을 얻어, ELISA 방법으로 측정하였다.

#### 9) Survival rating test

6주된 C57BL/6 마우스 암컷 10마리에 오령지를 500 mg/kg의 농도로 5일(1회/1일)간 경구투여 하였다. 오령지는 동결건조하여 DW로 녹인 후 필터 하였다. 마지막 경구투여가 끝난 1시간 뒤 endotoxin shock를 유발한 LPS (serotype:055.B5)를 Lethal dose (37.5 mg/kg)로 마우스에게 주사하였다. 주사 후 24시간마다 마우스의 생존율을 체크하였다.

### 3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 Students' *t*-test에 준하였고 *p*-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

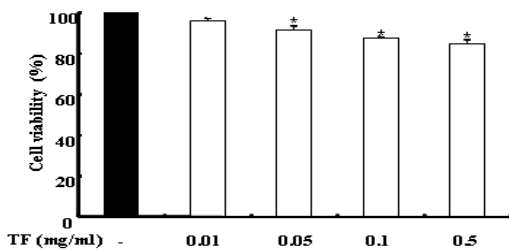
Table 1. The Sequence of TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 and b-actin

TNF- $\alpha$ Forward	ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC
TNF- $\alpha$ Reverse	TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT
IL-1b Forward	5'-AGT ATC ACT CAT TGT GGC TG-3'
IL-1b Reverse	5'-TCA CAG AGG ATG GGC TCT TC-3'
IL-6 Forward	CAT CCA GTT GCC TTC TTG GGA
IL-6 Reverse	CAT TGG GAA ATT GGG GTA GGA AG
IL-10 Forward	5'-ACC AGC TGG ACA ACA TAC TG-3'
IL-10 Reverse	5'-TAC CAG GTA AAA CTG GAT CAT T-3'
$\beta$ -actin Forward	TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G
$\beta$ -actin Reverse	TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C

## 결 과

### 1. 오렌지의 RAW 264.7 cell에 대한 독성

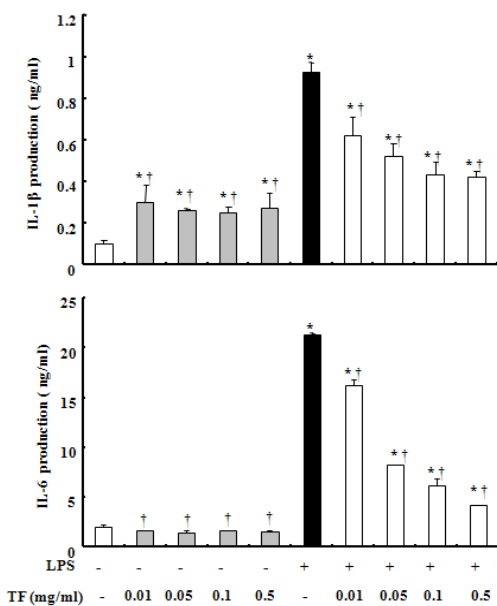
오렌지의 세포독성에 대해 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell에 오렌지를 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존률을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 오렌지는 RAW 264.7 cell에 0.5 mg/ml 농도까지 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).



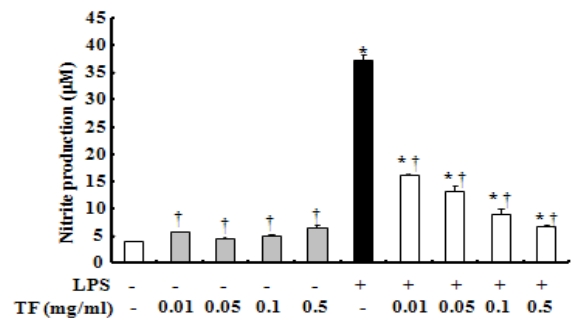
**Fig. 1. The effect of TF on cytotoxicity on RAW 264.7 cells**  
RAW 264.7 cells were incubated with TF at indicated dose. After 24 hrs, The cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment. \*  $p < 0.05$  vs. unstimulated cell.

### 2. 오렌지 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

오렌지가 항염증 효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 오렌지가 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 오렌지를 다양한 농도로 전 처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상



**Fig. 3. Effect of TF on the productions of IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-α in RAW 264.7 cells**  
The cells were pre-treated TF at indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 hrs. Detail methods were described Materials and Methods. \*  $p < 0.05$  vs. unstimulated cell ; †  $p < 0.05$  vs. LPS stimulation alone.



**Fig. 2. The effect of TF on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells**  
The cells were treated with TF at indicated concentration for 1 hr, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 hrs. NO was measured by Griess. \*  $p < 0.05$  vs. unstimulated cell ; †  $p < 0.05$  vs. LPS stimulation alone.

층액에서 NO의 생성을 측정된 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 오렌지 추출물을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다(Fig. 2).

### 3. 오렌지 추출물의 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-α 발현에 대한 영향

오렌지가 RAW 264.7 cell에서 염증성 매개물질에 대한 영향을 조사하기 위하여 염증성 세포활성물질의 생성을 조사하였다. 오렌지를 전처리한 후 LPS로 자극하여 ELISA 방법으로 IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α를 측정된 결과 오렌지 추출물이 염증성 세포활성물질들을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

#### 4. 오렁지 추출물의 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ mRNA 발현에 대한 효과

오렁지가 RAW 264.7 cell에서 전염증성 세포활성물질을 단백질 수준에서 억제하였에 착안하여(Fig. 3), mRNA수준에서도 전염증성 인자들을 억제함을 알아보기 위해 오렁지를 전처리한 후 LPS로 자극하여 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 의 mRNA를 측정한다. 결과 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 를 대조군에 비해 실험군이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 4).

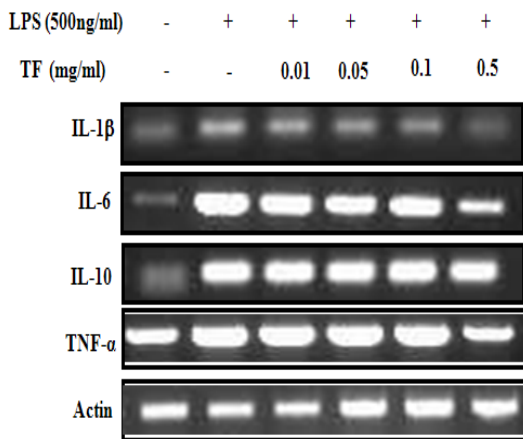


Fig. 4. Effect of TF on the mRNA levels of IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$

The cells were pre-treated TF extract at indicated concentrations for 1h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods.

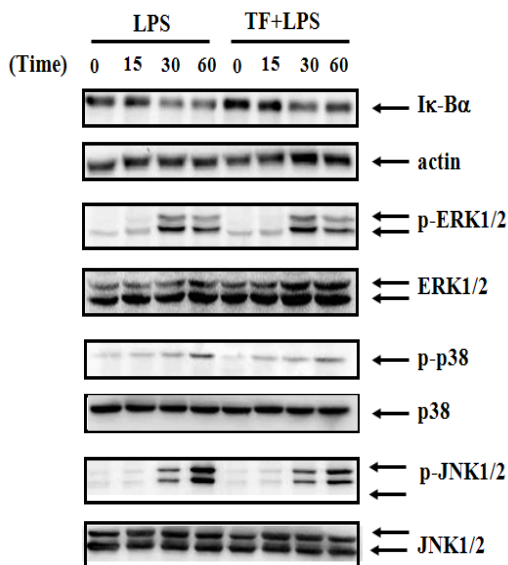


Fig. 5. Effects of TF on the expression of I $\kappa$ -Ba degradation and MAP kinase activity in LPS-stimulated of RAW 264.7 cells

The cells were pre-treated with TF extract (0.5 mg/ml) for 1 h, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for indicated time. Detail methods were described Materials and Methods.

#### 5. 오렁지 추출물에 의한 MAPKs의 발현억제 효과

MAPKs는 세포활성물질의 생성 조절 및 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서는 p38, ERK, JNK의 활성이 증가하지만, 오렁지를 전처리 했을 경우에 ERK는 억제하지 못했지만, p38, JNK의 활성이 억제되었다(Fig. 5). LPS는 NF- $\kappa$ B를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비한다. 또한 NF- $\kappa$ B의 활성은 I $\kappa$ -Ba의 분해에 의존하게 된다. 즉 I $\kappa$ -Ba분해가 억제되면 NF- $\kappa$ B의 활성이 억제된다고 볼 수 있다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 오렁지가 LPS에 의한 I $\kappa$ -Ba의 분해를 억제하고 있다.

즉 오렁지가 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하고 있다(Fig. 5).

#### 6. 오렁지의 LPS로 유도된 shock 상태에서의 serum cytokine 억제 효과

LPS (serotype:055,B5)는 Toll-Like-Receptor 4의 Ligand로 endotoxin shock 유발에 사용한다. 일반적으로 LPS를 주사하였을 때 24~48시간 이내에 shock가 유발되어 사망한다. 이때 사용되는 LPS에 의해 몸 내부에서는 IL-6, TNF- $\alpha$ , interferone 등이 생산되는데, 이러한 사이토카인에 의해 우리의 장기나 조직이 손상을 입어 shock를 유발하게 한다. 우리는 오렁지가 사이토카인 억제 효과가 큰 것에 착안하여 *in vivo*상에서도 억제하는 지 알아보았다. Fig. 6에서 처럼 오렁지를 경구 투여한 그룹에서는 혈청 내 사이토카인이 억제되었음을 알 수 있다(Fig. 6).

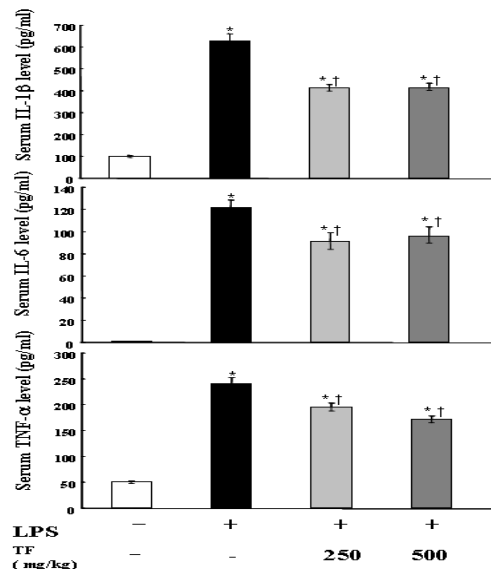


Fig. 6. Effect of TF on circulating levels of endotoxin shock mice treated with lethal dose LPS

Mice were administrated orally with TF (500 mg/kg) for 5 days and then intra peritoneal injected with LPS (37.5 mg/kg). Detail methods were described in the section of Materials and Methods. \*  $p < 0.05$  vs. unstimulated cell; †  $p < 0.05$  vs. LPS stimulation alone.

## 7. 오령지의 LPS로 유도된 endotoxin shock 억제 효과

오령지가 *in vivo*상에서도 사이토카인의 억제 효과가 있음에 착안하여, 실제로 이러한 사이토카인 억제가 shock를 억제할 수 있는지 실험하였다. 오령지를 경구 투여한 마우스를 보면 완벽히 차단하지 못했지만 endotoxin shock를 억제하고 있음을 보여준다(Fig. 7).

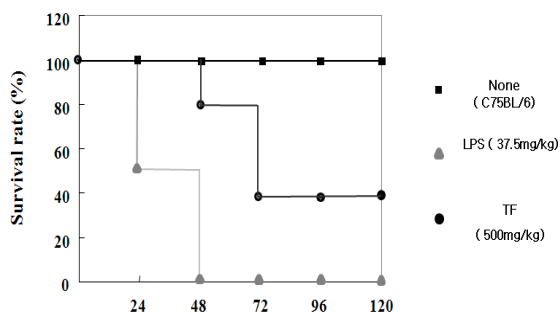


Fig. 7. Effect of TF on survival rate of endotoxin shock mice treated with lethal dose LPS

Mice were administrated orally with TF (500 mg/kg) for 5 days and then injected with LPS (37.5 mg/kg). Detail methods were described in the section of Materials and Methods.

## 고찰

본 연구에서 오령지의 물 추출물이 *in vivo* 및 *in vitro*상에서 IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$  등을 억제하여 염증 작용을 억제함을 보여주었다.

오령지는 한호충, 갈매, 요명오령지, 산편복, 단지, 백지, 독춘이라고도 불리며, 다량의 수지와, 요소, 요산 등을 포함하고 있다. 陰 중의 陰이라고 불리는 약으로 行血하는 작용이 뛰어나다고 알려져 있다. 散瘀止痛의 대표 약물로 평활근경련의 완화작용과 통경작용이 있어 산병, 월경과다, 자궁출혈, 경풍, 전간, 소아감병 등에 특히 유효하다. 그러나 기혈이 부족한 자에게 사용하면 크게 진기를 손상하므로 조심하여야 한다<sup>1)</sup>. 특히 동서양 모두에서 지혈약 및 인삼과의 배합을 고려한 보고가 많이 알려져 왔다<sup>18,19)</sup>.

그람음성 세균 세포외막의 성분인 LPS는 대식세포에서 면역기능을 조절하는 여러 분자 즉 TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, IL-10 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 pro-inflammatory 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다<sup>20,21)</sup>. 오령지는 RAW264.7 cell에서 이러한 염증 매개물질이 농도 의존적으로 감소함을 볼 수 있었다.

LPS 자극에 의하여 현저하게 영향받는 대식세포 신호 전달 분자로는 serine/threonine kinase로서 세포막 신호를 핵내로 전달하게 하는 MAP kinase가 있다. LPS에 의하여 활성화되는 MAP kinase로는 ERK 1/2, p38, JNK

등이 있고 LPS에 의해 분비된 TNF- $\alpha$ 에 의해서 NF- $\kappa$ B 유전자가 전사를 위한 활성화가 되어서 nitric oxide 및 superoxide anion 등의 free radicals이 생성된다<sup>22-25)</sup>. 오령지가 Ik-Ba의 분해를 억제했고, MAPK 구성요소 중에서 JNK와 p38의 인산화를 억제하였다.

장기나 조직으로 부터의 과도한 cytokine의 분비는 endotoxin shock를 유발하여 사망을 초래한다. 오령지의 싸이토카인 분비 억제는 shock 억제에 응용이 가능할 것을 추측하여 survival rate를 측정하였다. 실제로 IL-6, TNF, interferone Knock out 마우스에서 endotoxin shock를 억제한다고 보고되어 있다<sup>26)</sup>. 오령지는 인체 내 사이토카인을 억제하였을 뿐만 아니라 shock를 유발하였을 시 그 생존률 및 생존 시간을 증가시켰다(Fig. 6, 7).

이러한 실험 결과들로 보아 오령지가 대식세포에서 JNK와 p38의 인산화를 저해하고 Ik-Ba의 분해를 억제하여 전염증성 cytokine들의 발현을 억제하여 NO의 생산을 억제하였다고 생각된다. 오령지의 이와 같은 작용은 신체 내 모든 면역질환과 생식기·호흡기·소화기 등의 염증에 효과적일 것이라고 생각된다.

## 결론

RAW264.7 cell을 LPS로 자극하였을 때 오령지의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 오령지를 농도별로 처리했을 때 세포 독성이 나타나지 않았다.
2. 오령지가 농도 의존적으로 NO 생성이 억제됨을 알 수 있었다.
3. 오령지가 농도 의존적으로 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  생성을 억제하였다.
4. 오령지 처리시 Ik-Ba의 분해를 방지하였고 JNK, p38의 인산화가 억제되었다.
5. 오령지는 LPS로 유도한 생체 내 cytokine의 발생을 억제하였다.
6. LPS로 유도한 endotoxin shock 모델에서 오령지를 전처리한 군은 대조군에 비하여 약간의 억제효과를 나타내었다.

이와 같은 결과로 보아 오령지 추출물은 JNK와 p38의 인산화를 막고 Ik-Ba의 분해를 억제함으로써 NO와 항염증성 cytokine들의 생산을 억제하여, 항염증성 효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

## 감사의 글

이 논문은 한국보건산업진흥원(B08-0013-AM0826-08NI-00030B)과 2009년도 한국한의학연구원의 지원을 받아 기관고유사업의 일환으로 수행된 연구임(K09011)

## 참고문헌

1. 김창민, 신민교, 안덕균, 이정순. 중약대사전. 도서출판 정담. 1997 ; 3047-50.
2. Numata A, Takahashi C, Miyamoto T, Yoneda M, Yang PM. New triterpenes from a Chinese medicine, goreishi. Tokyo : Chem Pharm Bull. 1990 ; 38 : 942-4.
3. Numata A, Yang P, Yakahashi C, Fujiki R, Nabaie M, Fujita E. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi. Tokyo : Chem Pharm Bull. 1989 ; 37 : 648-51.
4. Jeong SJ, Kim NY, Kim DH, Kang TH, Ahn NH, Miyamoto T, Higuchi R, Kim YC. Hyaluronidase inhibitory active 6H-dibenzo [b,d] -pyran-6-one from the feces of Trogopterorum Faeces. Planta Med. 2000 ; 66 : 76-7.
5. Chang M. An experimental study on the antistimulative and antineoplastic effects of radix ginseng used in combination with Faeces Trogopterus. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1997 ; 22 : 694-6.
6. Li Q. Clinical and experimental study of faeces trogopterus on protection of gastric mucosa. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1996 ; 16 : 90-2.
7. Abul K Abbas. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition. Saunders Elsevier. 2006 : 75-97.
8. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell. 1994 ; 78 : 915-8.
9. 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 ; 406 : 301-9.
10. Kwqamata H, Ochiai H, Mantani N, terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 2000 ; 28 : 217-26.
11. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol. 2000 ; 35 : 21-8.
12. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 2001 ; 69 : 625-35.
13. 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 RAW264.7 macrophage. J Ethnopharmacol. 2001 ; 76 : 119-23.
14. Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D, Foxwell BM. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. J Immunol. 2006 ; 176(6) : 3635-41.
15. Hirohashi N, Morrison DC. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production *in vitro*. Infect Immun 1996 ; 64(3) : 1011.
16. Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I and Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. Bioorganic Med Chem. 2003 ; 11 : 1995-2000.
17. Wang S, Zhai S, Wang Y, Wang L. Effect of radix Ginseng-faeces Trogopteri combination on pharmacodynamics and effective chemical composition of radix Ginseng. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1995 ; 20(10) : 630-2.
18. Guo GH, Lu YB, Song LF. Effects of compatibility of radix Ginseng with faeces Trogopteri on toxicity in experimental animals. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1994 ; 19(4) : 247-50.
19. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta Med. 2004 ; 70(2) : 93-103.
20. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. Biochem J. 2002 ; 366 : 376-82.
21. Binetruy B, Smeal T, Kariu M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. Nature. 1991 ; 351 : 122-7.
22. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Curr Opin Cell Biol. 1999 ; 11 : 211-8.
23. Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. Helicobacter pylori in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases. AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. Lab Invest. 2004 ; 84 : 49-62.
24. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase.

- TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by suchinone effects on I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British J Pharmacol.* 2003 ; 139 : 11-20.
25. Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 1997 ; 185(9) : 1661.
26. Uematsu S, Kaisho T, Tanaka T, Matsumoto M, Yamakami M, Omori H, Yamamoto M, Yoshimori T, Akira S. The C/EBP beta isoform 34-kDa LAP is responsible for NF-IL-6-mediated gene induction in activated macrophages, but is not essential for intracellular bacteria killing. *J Immunol.* 2007 ; 15 ; 179(8) : 5378-86.