

마우스대식세포주인 RAW 264.7에서 金鈴子散 (金鈴子散)의 항염증 활성 연구

김도형, 이효승, 윤현정, 차창민, 박선동*

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory effect of methanol extract of Keum-Ryung-Ja-San in mouse macrophages

Do-Hyung Kim, Hyo-Seung Yi, Hyun-Jeong Yun¹, Chang-Min Cha,
and Sun-Dong Park*

Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objective : The aim of this study was to determine whether methanol extract of Keum-Ryung-Ja-San (KRJS) inhibit production of NO, PGE₂, iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 macrophages.

Methods : Cytotoxic activity of extracts on RAW 264.7 cells was measured using 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. The nitric oxide (NO) production was measured by Griess reagent system. And proinflammatory cytokines and PGE₂ were measured by ELISA kit. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), I κ -B- α and nuclear NF- κ B p65 expression were detected by western blot.

Results : Our results indicated that methanol extract of KRJS significantly inhibited the LPS-induced NO, PGE₂ production and iNOS, COX-2 expression accompanied by an attenuation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in RAW 264.7 cells. Moreover, methanol extract of KRJS treatment also blocked LPS-induced NF- κ B activation.

Conclusion : These findings indicate that methanol extract of KRJS inhibits the production of pro-inflammatory mediators and cytokines via suppression of NF- κ B activation. Take together, these results indicate that methanol extract of KRJS has the potential for use as an agent of anti-chronic inflammatory diseases.

Key Words : Keum-Ryung-Ja-San (KRJS), inflammation, macrophage, cytokine

서 론

金鈴子散 (Keum-Ryung-Ja-San, KRJS)은 金鈴子 (=川楝子)와 玄胡索이 각각 동량으로 구성된 처방으

로, 한방에서는 이를 肝鬱有熱로 心腹脇肋이 疼痛하고 口苦, 舌紅苔黃하며, 脈象이 弦數한 증상을 치료한다 하여, 위십이지장궤양, 만성위염, 담낭염 등의 질환에 응용하여 왔다¹⁾.

*교신저자 : 박선동, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실
· E-mail : sundong@dongguk.ac.kr · Tel : 054-770-2371
· 접수 : 2010년 5월 1일 · 수정 : 2010년 6월 3일 · 채택 : 2010년 6월 22일

金鈴子散 (Keum-Ryung-Ja-San, KRJS)은 金鈴子 (=川楝子)와 玄胡索이 각각 동량으로 구성된 처방으로, 한방에서는 이를 肝鬱有熱로 心腹脇肋이 疼痛하고 口苦, 舌紅苔黃하며, 脈象이 弦數한 증상을 치료한다 하여, 위십이지장궤양, 만성위염, 담낭염 등의 질환에 응용하여 왔다¹⁾.

金鈴子散의 구성약재 중에서 金鈴子は 川楝子라고도 명명되며 멀구슬나무과 식물 川楝(*Melia toosendan Sieb. et Zucc.*)의 열매이다. 한방에서는 川楝子가 濕熱을 제거하고 肝火를 내리며 통증을 완화하고 기생충을 구제하는 효능이 있다고 해서 熱厥心痛, 脇痛, 疝痛, 만성 회충증으로 인한 복통을 치료하는데 사용해 왔다²⁾. 川楝子의 생리활성과 치료학에 대한 실험 연구는 주성분으로 알려진 toosendanin으로 진행된 것이 주를 이루는데, 암세포에 대한 아포토시스 효과³⁾ 및 성장억제 효과⁴⁾, 항보툴리누스 효과⁵⁾, 항균 효과⁶⁾, 아세틸콜린 분비억제 효과⁷⁾, 간의 약물대사효소 및 담즙 분비활성 효과⁸⁾, 항고지혈증 효과⁹⁾ 마우스를 이용한 항염증 및 진통 효과¹⁰⁾ 등이 보고되어 있다. 金鈴子散의 또 다른 구성약재인 玄胡索은 양귀비과에 속한 玄胡索 (*Corydalis turtschaninovii* Bess.)의 덩이줄기로 活血散瘀하고 理氣止痛하는 효과가 있다 하여 胸脇腕腹疼痛, 經閉痛經, 產後瘀阻, 跌撲腫痛 등에 사용되어 왔다¹¹⁾. 玄胡索의 약리작용에 대한 연구는 진통 및 진정 작용¹²⁻¹⁴⁾, 항고혈압 작용¹⁵⁻¹⁶⁾, 항알러지 작용¹⁷⁻¹⁸⁾, 근이완 및 진경 작용¹⁹⁾, 항건망증 작용²⁰⁾ 그리고 위산분비 억제 및 항궤양 작용²¹⁾ 등이 보고되어 있다. 그러나 金鈴子散을 이용한 실험연구는 마우스의 행동연구를 통한 항우울 효과를 검증한 것²²⁾ 외에는 거의 전무한 실정이다. 따라서 金鈴子散의 항염증 활성에 대한 연구는 중요한 의미가 있다고 할 수 있다.

염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들 (pro-inflammatory mediators) 이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등이 있다. 이러한 염증인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다²³⁻²⁴⁾. 포유동물 세포의 nitric oxide synthase (NOS)의 경우, 유사형태가 3가지 존재하는데 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), 그리고 inducible NOS (iNOS)이다. 그 중에서 특히 iNOS가 염증반응에 관여하는데, iNOS의 경우 Interferon- γ , lipopolysaccharide (LPS), 그리고 여러 가지 염증성

사이토카인의 자극 있을 때 발현된다. PGE₂는 cyclooxygenase (COX)에 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, PGE₂의 생산은 면역세포의 대표적인 염증인자이다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines) 인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 등이 포함된다.

최근, 합성 항산화제의 부작용들이 밝혀지면서 천연자원으로부터 항산화제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다. 그리고 뛰어난 항산화 효과를 지닌 물질들이 뛰어난 항염증 작용을 수반하고 있다고 알려진 경우도 많다²⁵⁻²⁷⁾. 동맥경화를 비롯한 고혈압, 당뇨, 암이나 관절염 등은 대표적인 만성 염증성 질환 (chronic inflammatory disease)으로 현재 임상에서 이러한 질환이 차지하는 비중은 매우 높다. 한방에서는 오랜 역사에 걸쳐서 다양한 천연 자원의 치료효과를 연구해 왔으며, 이런 천연 자원들을 한의학적인 이론에 따라서 조합을 해서 실제 치료제로서 사용해 왔다. 그러므로 항산화 및 항염증 효과를 지닌 천연물이나 그 천연물의 조합을 찾아내면, 만성 염증성 질환에 사용할 수 있는 치료물질로 개발하는데 크게 이바지할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 金鈴子散을 메탄을 추출하고, 그 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 농도 별로 1시간 전 처리한 후 LPS를 처리하여 염증반응을 유도시켜서, 약제가 이를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는 지 관찰하였다. 그 지표로서 세포가 방출하는 NO, PGE₂ 생성량과 iNOS, COX-2 발현정도 뿐만 아니라 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성량을 조사하였고 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였다. 金鈴子散 추출물은 金鈴子 150 g과 玄胡索 150 g에, 2000 ml의 100% methanol을 가한 다음 37℃에서 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 더 반복하여 얻어진 용액을 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 19.9 g의 메탄올 추출물 (수율 6.6%)을 얻었다 (Fig. 1).

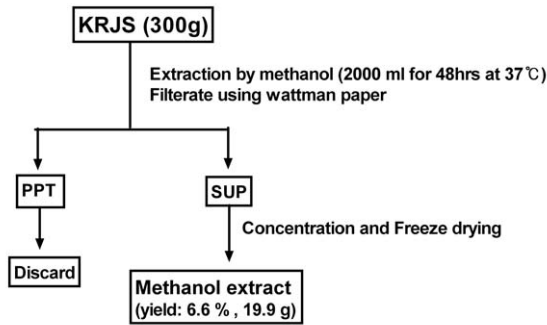


Figure 1. Preparation procedure of extract

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide, Bis는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고, hydrogen peroxide (H₂O₂), 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), CAPS, tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 iNOS monoclonal antibody (mAb)는 Santa Cruz Biotechnology사 (CA, USA)에서, COX-2 polyclonal antibody (pAb), NF-κ B p65 mAb, phospho-I-κ B-α (p-I-κ B-α) mAb, poly-ADP ribose polymerase(PARP) pAb, β-actin mAb는 Cell Signaling Technology사 (Beverly, MA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사 (Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정을 위한 ELISA kit는 Pierce Biotechnology사 (Rockford, USA)에서 구입하였으며, PGE₂ assay kit는 R&D사 (Minneapolis, USA)

에서 구입하였다. Protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) MTS assay

金鈴子散 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) assay 방법²⁸⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약재를 농도별 (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 μg/ml)로 18시간 동안 처리하였다. Well당 20 μl의 MTS solution을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 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 흡광도는 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교해서 보정하였다.

3) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System³¹⁾을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 金鈴子散 추출물을 농도별 (200, 400 μg/ml)로 전처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액 50 μl와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

4) PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay

kit를 R&D systems (Minneapolis, MN)에서 구입하여 실험하였다. 세포에 200, 400 μ g/ml의 金鈴子散 추출물을 전처리하고 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18시간 후 세포 배양액을 얻어 PGE₂ 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 100 μ l씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50 μ l와 PGE₂ conjugate 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 μ l씩 처리하여 5-20분간 반응시킨 후, 50 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간 별로 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 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/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 비 특이적 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 항체 (anti-iNOS, anti-COX2)를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

6) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 200, 400 μ g/ml의 金鈴子散 추출물을 처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 μ

l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100 μ l의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 μ l의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2, 4, 5-trimethoxy benzalmalonate (TMB) substrate를 100 μ l씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Nuclear extraction

세포질에서 핵으로 이동하는 NF- κ B p65의 양을 측정하기 위해 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific ; IL, USA)를 사용하여 핵과 세포질을 분리하였다. 분리한 sample은 각각의 항체를 사용하여 western blotting을 수행하여 핵으로 이동한 NF- κ B p65의 양과 세포질 내의 p-I- κ B- α 의 발현양상을 조사하였다.

3. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 편차로 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.

실험결과

1. 金鈴子散 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 약재의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 金鈴子散 추출물을 농도별 (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 μ g/ml)로 18시간 동안 처리한 결과, 400 μ g/ml의 농도까지는 추출물 자체의 세포독성이 전혀 나타나지 않았지만, 그 이상의 농도에서는 독성이 나타났다 (Fig. 1). 그래서 金鈴子散의 추출물이 RAW 264.7의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 200 μ g/ml과 400 μ g/ml의 농도로 다음 실험을 진행하였다.

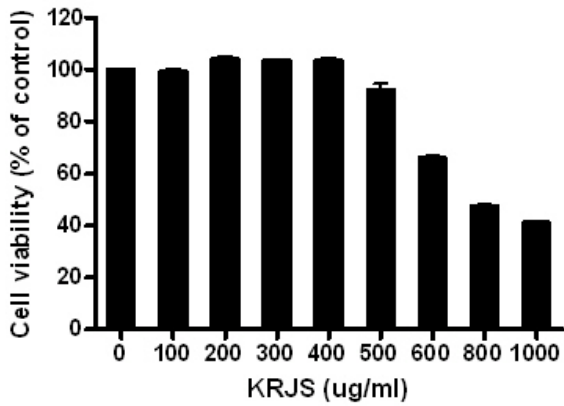


Figure 2. Effect of KRJS extract on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 μ g/ml) of KRJS extract for 18 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in Materials and Methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

2. 金鈴子散 추출물이 NO와 PGE₂의 생성량에 미치는 영향

약재의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 金鈴子散 추출물 200, 400 μ g/ml을 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, 200 μ g/ml의 농도에서는 92.7% 감소시켰고, 400 μ g/ml의 농도에서는 95.7% 감소시켰다 (Fig. 2A). LPS에 의해 유도되는 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 200 μ g/ml의 농도에서는 21.5% 감소시켰고, 400 μ g/ml의 농도에서는 52.5% 감소시켰다 (Fig. 2B). 따라서, 金鈴子散 추출물 모두 농도 의존적으로 LPS로 유도된 NO와 PGE₂를 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

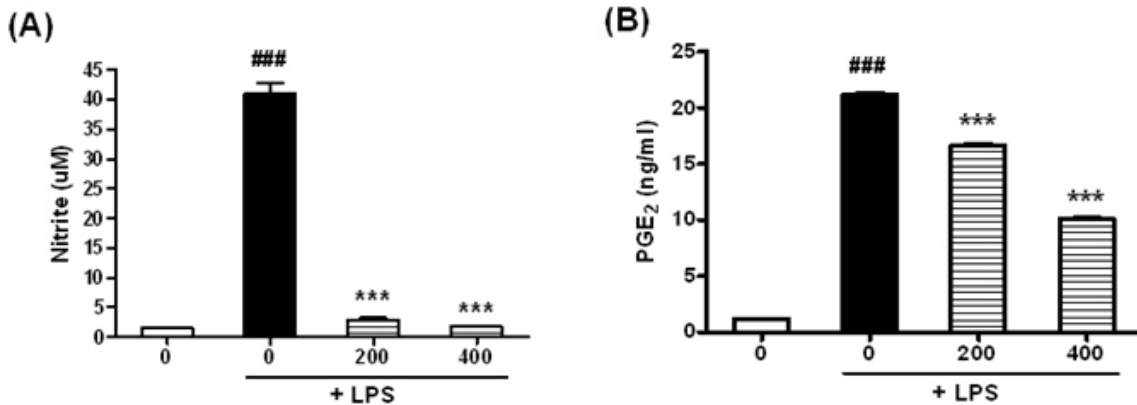


Figure 3. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by KRJS extract, RAW 264.7 cells were preincubated with 200, 400 μ g/ml of KRJS extract for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. (A) The NO production was measured by Griess Reagent System. (B) The PGE₂ production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as means \pm SEM. ###P < 0.001 vs. control group, ***P < 0.001 vs. LPS alone.

3. 金鈴子散 추출물이 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

염증에 관여하는 NO는 보통 iNOS에 의해서, PGE₂는 COX-2에 의해서 만들어진다. 그래서 RAW 264.7 세포에서 金鈴子散 추출물이 LPS로 유도된 iNOS 와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기로 하였다. RAW 264.7 세포에 약재를

200, 400 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 iNOS의 발현에 미치는 영향을 같은 방법으로 조사한 결과, 농도 의존적으로 우수한 억제 효과가 나타났다 (Fig. 3A). 또한, LPS에 의해 유도되는 COX-2 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 역시 농도 의존적인 감소 효과가 관찰되었다 (Fig. 3B).

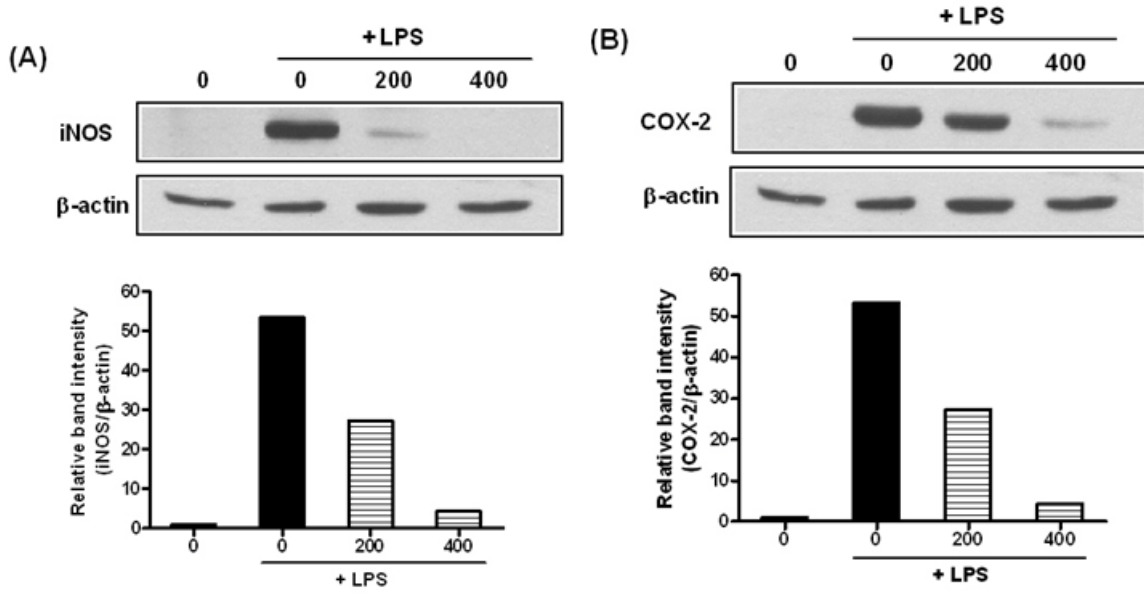


Figure 4. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by KRJS extract. RAW 264.7 cells were preincubated with 200, 400 μ g/ml of KRJS extract for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of iNOS (A) and COX-2 (B) were determined by western blotting as described 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.

4. 金鈴子散 추출물이 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines) 은 염증을 나타내는 중요한 지표이다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 金鈴子散 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향을 알아보았다. RAW 264.7 세포에 약재를 200, 400 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를

18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, 200, 400 μ g/ml의 농도에서 각각 85.7%, 99.1% 감소시켰다 (Fig. 4A). LPS에 의해 유도되는 IL-1 β 의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 200, 400 μ g/ml의 농도에서 각각 83.1%, 89.3% 감소시켰다 (Fig. 4B). 또한, LPS에 의해 유도되는 IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 200 μ g/ml의 농도에서 각각 94.5%, 400 μ g/ml의 농도에서 99.2% 감소시켰다 (Fig. 4C).

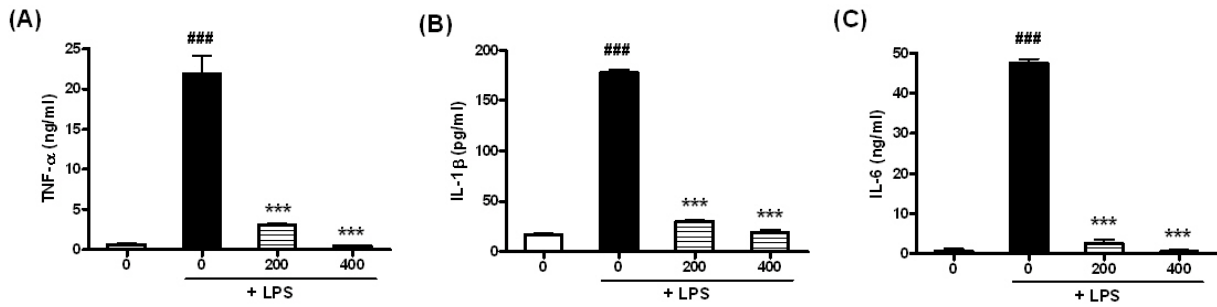


Figure 5. Inhibition of LPS-induced TNF- α , IL-1 β and IL-6 by KRJS extract. RAW 264.7 cells were preincubated with 200, 400 μ g/ml of KRJS extract for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The TNF- α , IL-1 β and IL-6 production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as means \pm SEM. ###P < 0.001 vs. control group, *** P < 0.001 vs. LPS alone.

5. 추출물이 NF-κ B pathway의 활성화에 미치는 영향

RAW 264,7 세포에 약재를 200, 400 μg/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리한 후 얻은 세포를 핵과 세포질로 분리한 후 NF-κ B pathway에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 세포질 내에서는 LPS에 의해 Iκ B-α의 인산화가 증가되었고, 이는 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5A). 또한, LPS에 의해 핵 내로 이동하는 NF-κ B p65의 양이 증가하였고 이는 추출물에 의해 효과적으로 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 5B).

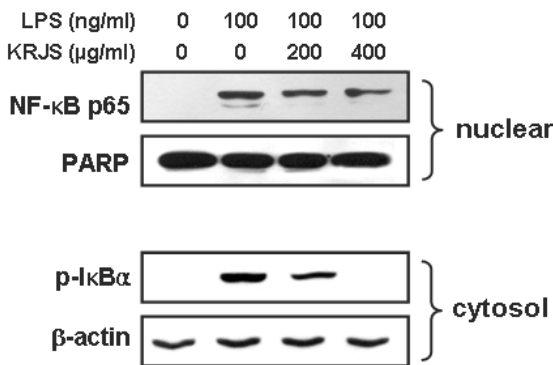


Figure 6. Inhibitory effect of KRJS extract on LPS-activated NF-κ B signaling. RAW 264,7 cells were preincubated with 200, 400 μg/ml of KRJS extract for 18 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 30 min. The amount of NF-κ B p65 in the nucleus, and the level of phospho-Iκ B-α in the cytosol were determined by western blotting. PARP and β-actin levels were used as internal markers for loading variation.

고찰

2002년 통계청에서 발표한 사망원인통계 자료를 보면, 남녀 모두 1위 암, 2위 뇌혈관질환, 3위 심장질환으로 나타났다. 최근 10년간 순환기계 질환에 의한 사망률 변화를 보면 인구 십만 명 당 92년 156.0명에서 2002년 127.8명으로, 전체적으로 감소한 것으로 나타났다. 이는 순환기계 질환 중 고혈압성 질환과 뇌혈관 질환에 의한 사망률이 감소했기 때문인데, 주목할 점은 순환기계 질환 중 심근경색 등의 허혈성 심장질환의 사망률은 오히려 늘었다는 사실이다. 허혈성 심장질환은 혈액을 공급하는 관상동맥이 경화되어 혈관이 탄력을 잃고 부분적으로 막혀서 심근으로 혈액을 원활하게 공급하지 못해 발생하게 되는데, 동맥경화증은 동맥이 약 70% 폐쇄가 되어도 특정한 증상

이 아닌 막연하고 애매한 증상들을 호소하고 통증이 분명한 질환이 아닌데다가, 노화에 따라 누구에게나 점진적으로 진행된다는 점에서 더욱 중요성이 있다³²⁾.

동맥경화증의 원인에 관한 이론들 중에서 아직까지 확실한 이론은 없다. 노화이론, 대사이론, 스트레스이론, 호르몬 이론, 바이러스 혹은 독성 요인설, 다요인설 등의 여러 이론이 있지만 논쟁이 계속되고 있다. 최근에는 동맥경화의 발생이론이 크게 두 가지 측면에서 접근되고 있는데, 첫 번째로 '손상에 대한 반응가설 (reaction to injury hypothesis)'이 있다. 이 가설은 죽상동맥경화증이 손상에 대한 반응으로 시작된다는 것으로 염증반응과 밀접한 관련이 있다. 동맥경화의 발생에 염증 반응이 관여한다는 기본적인 근거는 병리학적인 관찰에 기인하는데, 죽상동맥경화반 내에서 단핵구를 위시하여 대식세포와 T 림파구 등의 염증세포들의 침윤이 발견되기 때문이다³³⁾. 특히 혈관 내피세포 (vascular endothelial cell)와 평활근 세포 (smooth muscle cell)에서 이런 염증세포의 침윤이 두드러지게 나타난다³⁴⁾. 두 번째로 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의한 가설이 있다. 우리 몸은 항상성 유지를 위해 산화촉진물질 (prooxidant)과 산화억제물질 (antioxidant)들이 균형을 이루고 있다. 만약 이 균형이 깨져서 산화 촉진 쪽으로 기울게 되면 세포에 유해한 작용을 하게 되는데, 이를 산화적 스트레스라고 한다. 이런 산화적 스트레스는 기본적으로 노화와 밀접한 관련을 갖고 있으며, 체내 DNA 손상, 지질의 과산화로 인한 세포막의 손상, 단백질과 지질의 산화 등을 가져와 동맥경화나 암, 백내장, 노인성 치매, 파킨슨씨병과 같은 질환 등을 유발 시킨다³⁵⁾. 특히 동맥경화의 경우에서 Kunsch와 Medford 등의 연구에 의하면³⁶⁾, 여러 가지 죽상동맥경화의 위험 인자들이 공통적으로 혈관세포 내 산화스트레스 (oxidative stress)를 증가시키고, 이에 따라 2차적으로 redox-sensitive signaling pathway와 transcription factor를 활성화함으로써 혈관세포와 면역세포의 상호작용에 의한 염증을 유발하고, 혈관기능의 장애를 초래하여 죽상동맥경화를 유발한다고 밝혔다. 따라서, 항염증 효과를 동반한 천연물은 동맥경화와 같은 만성 염증성 질환 (chronic inflammatory disease)의 예방 및 치료제 개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

메탄올 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 마우스 대식세포인 RAW 264,7 세포에서 MTS assay를 실행하여 세포독성이 없는 약재의 농도를 선정하였다 (Fig. 1).

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능

장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE₂, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 염증반응이 시작되면 염증반응의 전사인자인 NF- κ B가 활성화되는데, NF- κ B의 활성화는 먼저 IL-1 β , IL-6, IL-8과 TNF- α 를 포함하는 일부 주요 염증촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하며, 또 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하여 염증반응 전반에 걸쳐 중요한 역할을 한다³⁸⁾. 동맥경화증의 경우도 지속적인 NF- κ B의 활성화에 의한 염증 및 혈관 평활근세포의 증식과정으로 인해 일어나는 것으로, 동맥경화 병변부위에서 평활근세포, 대식세포 및 혈관내피세포의 NF- κ B의 활성이 증가되어 있으며, 잠정적 병인인자인 oxidized LDL 또한 NF- κ B의 활성을 촉진하는 것으로 보고되어 있다³⁹⁾. NF- κ B 활성화에 관여하는 인자들에는 TNF- α , lymphotoxin, IL-1 β , IL-6와 같은 여러 가지 염증성 사이토카인들, mitogens, lipopolysaccharide (LPS), 단백질 합성 저해제, 산화적 스트레스, 자외선, phorbol esters 등이 있는데⁴⁰⁾, 흥미로운 점은 이 물질들이 대부분 ROS를 발생하는 것으로 알려져 있고, 이 NF- κ B 활성화는 화학적으로 광범위한 항산화제에 의해 저해된다는 사실이다. 이러한 연구는 NF- κ B 활성화가 대부분 산화반응에 의해 촉진됨을 보여주는 것으로 산화와 염증의 밀접한 연관성을 잘 보여주고 있다고 할 수 있다.

RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하고, 1시간이 지난 후에 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그리고 염증인자인 NO, PGE₂의 production, iNOS, COX-2 expression, proinflammatory cytokines인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량을 측정하였다. 그 결과, 추출물은 모두 LPS로 유도된 염증 인자들을 농도 의존적으로 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화를 저해함을 확인하였다.

이러한 실험 결과들로 보아, 의 추출물은 탁월한 항염증 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 따라서 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

마우스 대식세포에서 의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 추

출물의 독성을 조사하여 생존율에 영향을 미치지 않는 농도 (200, 400 μ g/ml)에서 실험을 진행하였다. 이는 추출물의 항산화 및 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성임을 말한다.

2. 약재를 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 결과, 추출물이 LPS로 유도되는 NO, PGE₂의 생성량과 iNOS, COX-2의 발현을 크게 저해하였고, 또한 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량도 현저히 감소시켰다.
3. 세포에 약재를 200, 400 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리한 후 얻은 세포를 핵과 세포질로 분리한 후 NF- κ B pathway에 미치는 영향을 조사한 결과, 추출물은 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화를 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 추출물은 뛰어난 항염증 효과를 가지고 있었으며, 이는 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨나 관절염 등 만성 염증성 질환(chronic inflammatory disease)의 예방과 치료에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

- 본 연구는 2010년 동국대학교 논문게재 장려금 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

1. 박선동 外. 方劑學, 서울, 도서출판 영림사, p380-1, 1999.
2. 김창민 外. 完譯 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, p4098-101, 1997.
3. Shi YL, Tang MZ. Cell death and apoptosis-induced effect of toosendanin. Chi J Neurosci, 2004 ; 20 : 461-5.
4. Kim HM, Oh GT, Han SB, Hong DH, Hwang BY, Kim YH, Lee JJ. Comparative studies of adriamycin and 28-deacetyl sendanin on in vitro growth inhibition of human cancer cell lines. Arch Pharm Res, 1994 ; 17(2) : 100-3.

5. Shi YL, Wang ZF. Cure of experimental botulism and antibotulismic effect of toosendanin. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 ; 25 : 839-48.
6. Lirussi D, Li J, Prie to JM, Gennari M, Buschiazzo H, Rios JL, Zaidenberg A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in chinese medicine. *Fitoteria.* 2004 ; 75 : 718-23.
7. Shi YL, Wang WP, Xu K. Electrophysiological analysis on the presynaptic blocking effects of toosendanin on neuromuscular transmission. *Acta Physiol Sin.* 1981 ; 33 : 259-65.
8. Kim BS, Choi JW, Lee CK. Effect of *Melia toosendan fructus* on liver function (I) - Effect of each fractions from meliae toosendan fructus on drug metabolism enzyme system and bile secretion. *Kor J Pharmacogn.* 1993 ; 24(1) : 63-8.
9. Ryu MY, Kim BS, Choi JW, Lee C K. Effect of *Melia toosendan fructus* on liver function (II) - Effect of seed oil on lipid metabolism in rats. *Kor J Pharmacogn.* 1994 ; 25(3) : 272-7.
10. Xie F, Zhang M, Zhang CF, Wang ZT, Yu BY, Kou JP. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from melia toosendan fruit. *J Ethnopharmacol.* 2008 ; 117(3) : 463-6.
11. 강병수 외. *本草學*, 서울, 도서출판 영림사, p413-4, 2000.
12. Hu J, Xie J, Hu J, Zhang Y, Wang J, Chen R. Effect of drugs on electroacupuncture analgesia and cytosolic free Ca²⁺ concentration of mice brain. *Zhen Ci Yan Jiu.* 1994 ; 19 : 55-8.
13. Chang CK, Lin MT. DL-tetrahydropalmatine may act through inhibition of amygdaloid release of dopamine to inhibit an epileptic attack in rats. *Neurosci Lett.* 2001 ; 307 : 163-6.
14. Hu JY, Jin GZ. Arcuate nucleus of hypothalamus involved in analgesic action of l-THP. *Acta Pharmacol Sin.* 2000 ; 21 : 439-44.
15. Lin MT, Chueh FY, Hsieh MT, Chen CF. Antihypertensive effects of dl-tetrahydropalmatine: an active principle isolated from *Corydalis*. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996 ; 23 : 738-42.
16. Chueh FY, Hsieh MT, Chen CF, Lin MT. Hypotensive and bradycardic effects of dl-tetrahydropalmatine mediated by decrease in hypothalamic serotonin release in the rat. *Jpn J Pharmacol.* 1995 ; 69 : 177-80.
17. Matsuda H, Tokuoka K, Wu J, Tanaka T, Kubo M. Inhibitory effects of methanolic extract from corydalis tuber against types I-IV allergic models. *Biol Pharm Bull.* 1995 ; 18 : 963-7.
18. Matsuda H, Tokuoka K, Wu J, Shiimoto H, Kubo M. Inhibitory effects of dehydrocorydaline isolated from corydalis tuber against types I-IV allergic models. *Biol Pharm Bull.* 1997 ; 20 : 431-4.
19. 木村正康. *漢方藥理學*, 東京, 南山堂, p177-179, 1997.
20. Hung TM, Ngoc TM, Youn UJ, Min BS, Na M, Thuong PT, Bae K. Anti-amnesic activity of pseudocoptisine from *Corydalis Tuber*. *Biol Pharm Bull.* 2008 ; 31(1) : 159-62.
21. Kim SR, Hwang SY, Jang YP, Park MJ, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities. *Planta Med.* 1999 ; 65(3) : 218-21.
22. Jung JW, Lee S, Yoon BH, Kim D H, Ryu JH. Keum-ryung-ja-san, an traditional herbal prescription, ameliorates depressive behaviors in mice. *J Appl Pharmacol.* 2009 ; 14 : 114-8.
23. 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 ; 30;23(3) : 398-404.
24. 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- κ B. *Dig Dis Sci*. 2007 ; 52(8) : 1890-6.
25. Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Mol Pharmacol*. 1997 ; 52(3) : 465-72.
26. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF κ B in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol*. 1999 ; 126(3) : 673-80.
27. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. 1999 ; *Carcinogenesis*. 20(10) : 1945-52.
28. 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.
29. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999 ; 27 : 612-6.
30. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1996 ; 20 : 121-7.
31. 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.
32. 유형준. 動脈硬化. 한국논단(Monthly Korea Forum). 142(1) : 166-9, 2001.
33. 한기훈. 이상지질혈증, 염증과 죽상동맥경화. 심장과 혈관 (Cardiovascular Update). 6(3) : 6-13, 2004.
34. Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*. 1993 ; 68(5) : 499-508.
35. Chung IM, Kim KH, Ahn JK. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. *Kor J Med Sci*. 1998 ; 6 : 311-22.
36. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*. 1999 ; 85(8) : 753-66.
37. Chung HY, Kim HJ, Shin KH, Kim KW. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev*. 1999 ; 111(2-3) : 97-106.
38. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 ; 19(7) : 1623-9.
39. Grilli M, Chiu JJ, Leonardo MJ. NF- κ B Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol*. 1993 ; 143 : 1-62.