

마우스대식세포주인 RAW 264.7에서 SD-01의 항염증 활성 연구

박 선 동*

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory effect of SD-01 in RAW 264.7 cells

Sun-Dong Park*

Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objective : The aim of this study was to investigate anti-inflammatory activity of SD-01 methanol extract in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages.

Methods : Cytotoxic activity of SD-01 methanol extract 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 method. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), I κ -B-alpha and nuclear NF- κ B p65 expression were detected by western blot.

Results : Our results indicated that methanol extract of SD-01 significantly inhibited the LPS-induced NO, PGE₂ production and iNOS, COX-2 expression accompanied by an attenuation of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MCP-1 production in RAW 264.7 cells. Moreover, methanol extract of SD-01 treatment also blocked LPS-induced NF- κ B activation.

Conclusion : These findings indicate that methanol extract of SD-01 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 SD-01 has the potential for use as an agent of anti-chronic inflammatory diseases.

Key Words : SD-01, oxidative stress, inflammation, macrophage

서 론

본 연구실에서는 『동의보감』에 나오는 자연 약초 중 경험적 우수성과 과학적인 검증이 이루어진 7가지 약재를 선별하여 전통적 처방구성 원리에 따라 조성된 새로운 처방을 SD-01이라고 명명하였다. 한의학적으로는 補氣血하는 何首烏를 君藥으로 삼고, 活血化瘀작용이 있는 丹蔘, 鬱金, 蘇木, 등을 臣佐藥으로 하고, 使藥으로는 약물간의 調和작용이 있는 甘草로 배합하여 구성하였다. 현대 과학적 견지에서 처방을 구성하고 있는 각각의 약재들에 관해서는 항산화 및 항염증 활성, 항암 활성, 항미생물 활성, 항노화 활성 등 다양한 생물학적 활성이 보고되고 있다.

새로운 복합처방으로서의 새로운 약물적 가치는 일차적으로 항염증 기전이 중요한 의미를 가진다. 대부분의 다양한 질병은

염증기작을 전제로 변화되어지는 경향이 있기 때문이다. 본 처방도 가장 전통적이면서 과학적 관점에서 항염증작용이 우수할 것으로 기대되는 것임을 고려하여 가장 적합한 조성비율로 설정되었다. 따라서 다양한 염증 관련 질환의 예방과 치료를 목표로 한 본 처방의 항염증효과를 확인하고자 한다.

염증은 사이토카인 (cytokine) 및 다양한 염증인자 (inflammatory mediator)들의 생성 등에 의해서 조절되는 복합적인 과정을 통해 일어난다. 반복적인 조직의 손상이나 재생에 의해 염증반응이 지속되면 염증관련 세포에서 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활성 질소종 (reactive nitrogen species, RNS)이 과다 생성됨으로써 염증성 관련 질환이 유발된다¹⁾. 류마티스 관절염, 동맥경화증, 위염, 천식 등이 염증반응의 만성화에 의해 유발되는 질환이다²⁾.

*교신저자 : 박선동, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실.
· Tel : 054-770-2371, · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2010년 8월 5일 · 수정 : 2010년 8월 31일 · 채택 : 2010년 9월 13일

ROS는 다양한 세포 스트레스 메커니즘에 관여하고 있고 염증반응에 관련된 메커니즘인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성을 조절한다는 보고도 있다³⁾. 실제로 뛰어난 항산화 물질이 NF- κ B의 활성을 억제하고⁴⁾, 세포 내의 ROS 생성을 감소시킨다는⁵⁾ 보고가 있다. 따라서 세포내의 ROS와 RNS의 과다 생성을 조절하는 것이 중요하다.

본 연구에서는 SD-01 처방의 활성 산소종(ROS)과 활성 질소종(RNS)의 생성억제를 통한 항산화 활성을 조사하고, 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 염증유도물질인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 생성되는 염증성 물질 및 그 활성화 기전에 미치는 영향을 조사한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, SD-01 처방에 사용된 약재의 구성과 함량은 Table 1과 같다. 약재에 3배량의 메탄올을 가한 다음 70°C에서 48시간 동안 추출하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 50.9 g의 메탄올 추출물(수율 14.5%)을 얻었다. 얻어진 분말은 DMSO에 녹인 후 filter한 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition and contents of SD-01

한약재	생약명	사용량 (g)
하수오	Polygoni Multiflori Radix	100
단삼	Salviae Miltiorrhizae Radix	50
울금	Curcumae Longae Radix	50
★★	★★ Radix	★
소목	Caesalpinia sappan	25
★★	★★ Radix	★
감초	Glycyrrhizae Radix	50
합계		350

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 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, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, hypoxanthine, lipopolysaccharide (LPS), 4,5-diaminofluorecein (DAF-2), 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 antibody와 2차 항체인 anti-rabbit and anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz,

USA)에서, COX-2, p-I κ B- α , NF- κ B와 β -actin antibody는 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사 (Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 사이토카인 측정을 위한 ELISA kit와 Nuclear and cytoplasmic protein extraction reagents는 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 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) MTS assay

SD-01 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법⁶⁾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 농도별로 18 시간 동안 처리한 후, Well당 20 μ l의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. Microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다. 약재가 갖는 흡광도는 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교해서 보정하였다.

3) Intracellular ROS 측정

SD-01 추출물이 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCFH-DA assay를 실시하였다^{7,8)}. 먼저 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하고 24시간 배양 후, 약재를 농도별로 1시간 전처리하고 100 ng/ml의 LPS를 18시간 동안 처리하였다. 배양 후, 10 μ M DCFH-DA를 45분간 처리하였다. PBS로 2회 washing한 다음 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다. DCF 형광강도의 증가율은 대조군과 비교해서 배수 (fold)로 계산하였다.

4) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System⁹⁾을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 SD-01 추출물을 1시간 전처리하고 100 ng/ml의 LPS

를 18시간 처리한 후 배양액을 수거하여 실험에 사용하였다. 배양액 50 μ l와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였다.

5) PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험하였다. 세포에 SD-01 추출물을 1시간 전처리한 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 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.

6) Western blot analysis

약제를 처리한 세포를 수거하여 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 원심분리하여 상층액을 모았다. Nuclear extract의 경우는 nuclear extraction kit를 사용하여 얻었다. 이후, 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 항체 (anti-iNOS, anti-COX2, anti-phospho I κ B- α , anti-NF- κ B p65)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.

7) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 SD-01 추출물을 처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 18시간 처리하였다. 세포 배양액을 얻어 사이토카인 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, 사이토카인으로 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 처

리하여 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.

3. 통계처리

결과는 means \pm SEM으로 나타내었으며, 통계분석법은 GraphPad Prism 4.0을 이용하여 one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests를 실시한 후, P값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

실험결과

1. SD-01 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 SD-01 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. SD-01 추출물을 농도별 (0, 10, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml)로 18시간 동안 처리한 결과, 100 μ g/ml의 농도까지는 세포의 생존율이 90% 이상으로 독성이 거의 나타나지 않았고 200 μ g/ml의 농도에서 75%의 생존율을 나타내었다. 그 이상의 농도에서는 세포의 생존율이 50% 이상 감소되었다 (Fig. 1).

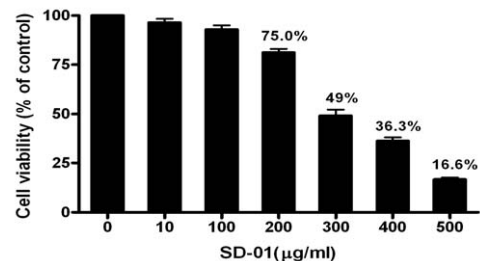


Figure 1. Effect of SD-01 extract on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 10, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml) of SD-01 extract for 18 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in materials and methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

2. SD-01 추출물이 세포 내의 ROS 생성에 미치는 영향

SD-01 추출물이 LPS에 의한 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 100, 200 μ g/ml의 SD-01 추출물을 전처리한 다음, LPS로 세포 내의 ROS 생성을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 LPS를 처리한 실험군에서는 유의성 있는 형광강도의 증가 (1.8배)를 보였다. 이로써 LPS의 처리가 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. 이는 SD-01 추출물의 농도 100, 200 μ g/ml을

함께 처리한 경우 각각 63.6, 90.9%까지 생성 억제 효과가 나타났다. 이는 ROS 생성 효소인 NADPH oxidase의 inhibitor인 AEBSF (72.7%)와 비교하여 더 탁월한 억제능을 보인 것이었다 (Fig. 2).

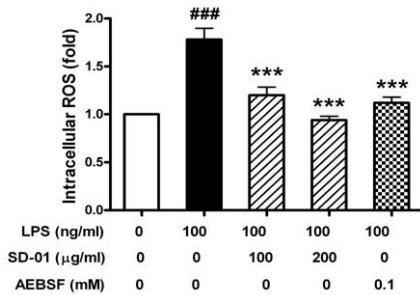


Figure 2. Inhibitory effect of SD-01 extract on intracellular ROS production in RAW 264.7 induced by LPS. RAW 264.7 cells were preincubated with 100, 200 μg/ml of SD-01 extract for 18 hr. 100 ng/ml of LPS was treated to induce intracellular ROS production. The increase of DCF fluorescence was calculated as increasing fold of control. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); ###, *** : P < 0.001.

3. SD-01 추출물이 NO, PGE₂, iNOS, COX-2의 생성량에 미치는 영향

염증성 매개물질의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Griess Reagent를 사용하여 NO의 생성량을 조사하였고 PGE₂의 생성량을 ELISA assay를 수행하였다. 또한 western blotting을 통해 NO의 생성효소인 iNOS와 PGE₂의 생성효소인 COX-2의 발현 정도를 조사하였다. 그 결과 100 ng/ml의 LPS에 의해 NO와 PGE₂의 생성량이 각각 11배, 9.2배 증가하였고, 증가된 NO는 100, 200 μg/ml의 SD-01 추출물에 의해 48.4%, 56.3%까지 생성량이 감소하였고, PGE₂는 33.8%, 40.5%까지 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 3A). LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 발현량 또한 SD-01 추출물에 의해 농도의존적인 감소효과를 확인하였다 (Fig. 3B).

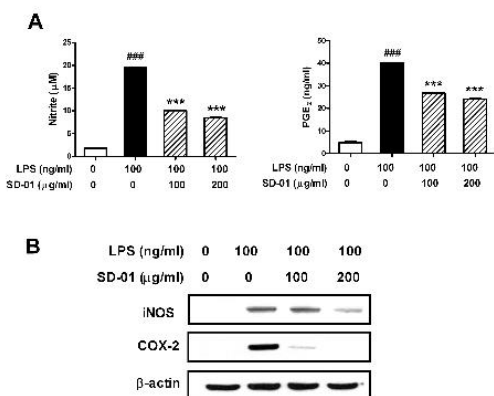


Figure 3. Inhibitory effects of LPS-induced inflammatory mediators. RAW 264.7 cells were preincubated with 100, 200 μg/ml of SD-01 extract for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. (A) The NO production was measured by Griess Reagent System and PGE₂ production was measured by ELISA as described in materials and methods. (B) The expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blotting as described in materials and methods. β-actin levels were used as internal markers for loading variation. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); * : P < 0.05; ###, *** : P < 0.001.

4. SD-01 추출물이 염증성 cytokines의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)은 염증을 나타내는 중요한 지표이다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 SD-01 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-α, IL-1β, MCP-1의 생성량에 미치는 영향을 알아 보았다. RAW 264.7 세포에 약재를 100, 200 μg/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 IL-6, TNF-α, IL-1β, MCP-1의 생성량에 미치는 영향을 조사하였다. LPS 처리에 의해 각각 63.7배, 87.7배, 109.3배, 4.1배 생성량이 증가하였고, IL-6는 SD-01 100, 200 μg/ml의 농도에서 48.4%, 93% 감소되었고, TNF-α는 41.5%, 84.3% 감소되었다. IL-1β는 79.1%, 96.5% 감소되었으며, MCP-1은 63.9%, 67.2% 감소되었다. ROS 생성효소인 NADPH oxidase의 inhibitor인 AEBSF을 처리한 경우 LPS에 의해 유도되는 IL-6, TNF-α, IL-1β, MCP-1의 생성이 효과적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

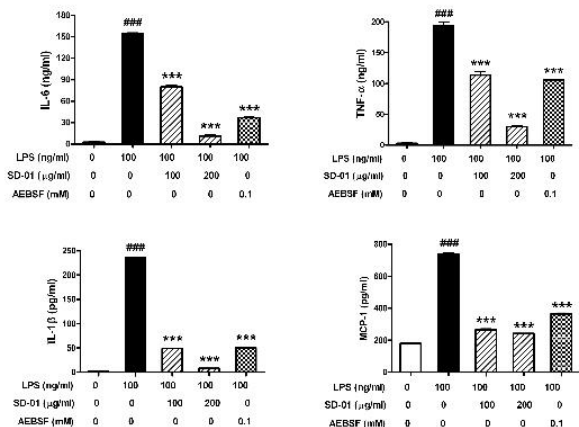


Figure 4. Inhibition of LPS-produced proinflammatory cytokines by SD-01 extract. RAW 264.7 cells were preincubated with 100, 200 μg/ml of SD-01 extract for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The IL-6, TNF-α, IL-1β and MCP-1 production was measured by ELISA as described in materials and methods. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); * : P < 0.05; ###, *** : P < 0.001.

5. SD-01 추출물이 NF-κ B의 활성에 미치는 영향

NF-κ B의 핵으로의 translocation은 Iκ Bα의 phosphorylation, ubiquitination과 degradation에 의해서 일어나게 된다¹⁰. 대식세포에서 LPS에 의해서 활성화되는 NF-κ B의 주요 구성요소는 p65이기 때문에, western blot을 통해 SD-01 추출물이 p65의 활성에 미치는 영향과 Iκ B-α의 phosphorylation에 미치는 영향을 확인해 보았다. RAW 264.7 세포에 약재를 100, 200 μg/ml의 농도로 18시간 동안 처리한 후 100 ng/ml의 LPS를 1시간 동안 처리하여 NF-κ B p65의 핵으로의 translocation에 미치는 영향을 nuclear extraction를 수행하여 세포의 핵과 세포질을 분리한 다음 핵내로 이동한 NF-κ B p65과 세포질내의 인산화된 Iκ B-α (p-Iκ B-α)의 양을 조사하였다. 그 결과, LPS 처리에

의해 핵내로 이동한 NF- κ B p65의 양이 크게 증가하였고 이는 SD-01 추출물에 의해 효과적으로 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 5A). 또한 cytosol extract에서 LPS에 의해 유도된 I κ B- α 의 phosphorylation이 SD-01 추출물에 의해 농도 의존적으로 저해됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B).

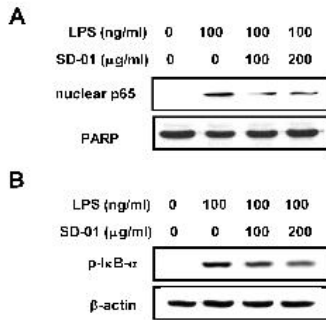


Figure 5. Effect of SD-01 extract on LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B p65 and on the phosphorylation of I κ B- α . RAW 264.7 cells were preincubated with 100, 200 μ g/ml of SD-01 extract for 18 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 1 hr. The expression levels of NF- κ B p65 and I κ B- α were determined by western blotting using nuclear extracts and cytosol extract, respectively. PARP and β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

고찰

전통의약 혹은 herb요법을 통해 난치성 및 만성 질환에 대한 관리나 치료를 받으려는 인식이 확산되어 가고 있다. 이와 같은 경향은 합성의약품에 대한 부작용 우려와 자연주의의 추구가 그 요인이다. 그리고 최근 사람들은 건강과 질병의 치료보다는 삶의 질을 향상시키는 의료기술과 의약품에 관심이 높아, 이에 대한 전통의약의 역할도 또한 기대된다.

동양 문화권의 전통의약이 전 세계의 의약으로 발돋움하기 위해서는 세계가 인정하는 과정과 수준을 거쳐야 한다. 세계 의약계가 요구하는 방향과 정도는 전통의약에 대한 종교적 신념과 고대 서지학적 증거를 요구하는 것이 아니라 자연과학적인 논리와 수준을 요구하는 것이다. 국제규격의 전임상시험, 임상시험을 거쳐 국가가 인증하는 전통의약만이 세계의약에 포함된다. 국제규격을 도외시하는 경우는 결국 자국의 전통의약에 불과한 것이다¹¹⁾.

신약개발은 전형적인 지식기반 연구개발로 고부가가치를 창출하는 21세기형 산업이다. 그러나 화학합성물로부터 신약개발은 신물질에서 허가까지 평균 14.9년이 걸리며, 성공률 또한 낮으며, 개발비용은 날로 높아지고 있다. 따라서 최근에 이러한 어려움의 돌파구로 신약연구부문에서는 천연약물(한약)에서 신약을 찾기 시작했고, 이에 대한 특허 건수도 꾸준히 증가하고 있다¹⁵⁾.

한약복합처방에 나타나는 것과 같은 복수화합물에 의한 복합효과기구가 해명될 것으로 생명공학분야에서는 보건의료에 촉과제로 제시한 바 있다. 여러 종류의 한약이 100 $^{\circ}$ C 물에 용해되면서 복합적인 화학기전으로 인체에 투여된다. 현재 한약의 복합기전을 밝혀내는 분석방법은 미약한 수준이다. 이 한약의 복합화합물에 의한 복합기전이 밝혀져야 한의학의 과학적 입증 및 신약개발을 위한 기초적인 자료가 축적될 것이다¹²⁾.

본 연구실에서는 이러한 기초를 바탕으로 전통적인 한약으로부터 신약개발의 가능성을 탐색하고 있다. 과학적 입증이 전제된 몇 가지 전통 한약으로 복합처방을 구성하여 그 유효성을 밝혀 보고자 한다.

SD-01 처방을 구성하고 있는 약재들의 생물학적 활성에 관하여 많은 연구결과가 보고되고 있다. 먼저, 하수오 (Polygoni Multiflori Radix)는 항산화 활성에 의한 항노화 효과에 관한 보고가 있었고, 간세포의 증식을 유도하며 Kupffer cell의 phagocytic activity를 향상시킴으로써 간경화를 억제하는 활성이 있음이 보고되어 있다¹³⁾. 또한 하수오로부터 분리된 성분인 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside (THSG)는 LPS에 의해 유도되는 염증반응 억제능이 보고되어 있다^{14,15)}. 그 밖에도 뇌 보호 효과¹⁶⁾, 항당뇨 활성¹⁷⁾, 기억력 향상¹⁸⁾ 등 다양한 보고가 있었다.

단삼 (Salviae Miltiorrhizae Radix)으로부터 분리한 유효 성분들의 활성에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다. 성분 중 salvianolic acid B의 항염증 활성¹⁹⁾, 간보호 효과²⁰⁾ 등의 활성이 있음이 보고되어 있고, 또 다른 성분인 tanshinone I, tanshinone IIA에 관해서는 항산화 및 항염증활성 및 항암활성^{21,22,23)} 등 다양한 생물학적 활성이 보고되고 있다. 울금 (Curcumae Longae Radix)은 그 성분으로 알려져 있는 xanthorrhizol의 항염증 효과²⁴⁾, 사람 대장암 세포주인 HCT116에서 apoptosis 유도 및 cell cycle arrest를 통한 증식억제효과²⁵⁾, 사람 간암세포주인 HepG2의 apoptosis 유도²⁶⁾ 등 다양한 암세포에서의 항암활성뿐 아니라, 항산화 및 항노화 활성²⁷⁾, 항미생물 활성^{28,29)} 등 다양한 생물학적 활성이 보고되어 있다. 소목(Caesalpinia sappan)은 그 구성성분인 brazilin, brazilein에 관한 다수의 항산화³⁰⁾ 및 항염증 활성^{31,32)}과 항암활성³³⁾, 항미생물 활성³⁴⁾ 등 다양한 생물학적 활성에 관한 보고가 있으며, 그리고 감초 (Glycyrrhizae Radix)에 관한 생물학적 활성 연구는 이미 활발히 진행되고 있는 상태이다.

이와 같이 SD-01 처방을 구성하는 약재들의 활성에 기인하여, SD-01 처방의 항산화 및 항염증 활성이 뛰어난 것으로 생각되어 마우스 대식세포주인 RAW 264.7에서의 항염증 활성 실험을 진행하였다.

먼저, DCFH-DA assay를 수행하여 SD-01추출물이 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 내의 ROS 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, LPS에 의해 세포내 ROS의 생성이 약 1.8 배 증가하였고 SD-01 추출물에 의해 효과적으로 감소되는 것을 확인하였다.

염증 반응에 관여하는 대식세포의 표면에는 Toll-like receptors (TLRs)가 있어서 병원체를 인지하게 되는데, 박테리아성 내독소인 LPS의 경우 TLR4를 수용체로 하여 NF- κ B를 활성화시키고, NO, PGs와 같은 염증인자와 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 다양한 염증성 사이토카인을 발현시키게 된다³⁵⁾.

만성적인 NO의 생성은 염증인자로서 여러 가지 만성 염증성 질환을 유발하는 주요 원인이 된다. NO는 NO synthase (NOS)에 의해서 생성이 되는데, NOS에는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS

(iNOS), 세 종류의 형태가 존재한다. 이 중에서 iNOS가 활성화된 대식세포에서 NO를 다량으로 생성하여 염증 반응을 유발시킨다. 또 다른 중요한 염증 인자인 PGE₂는 COX-2에 의해 생성되며, 혈관의 투과성을 높이기 때문에 염증과정에서 발열, 종창, 통증 등을 유발할 수 있다. 그리고 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 사이토카인은 활성화된 대식세포에서 주로 생산되며 선천면역과 관계되어 내피세포와 백혈구에 작용하여 미생물에 대한 초기 염증반응을 자극하고 조절한다³⁶⁾. 따라서 활성화된 대식세포에서 염증인자인 NO와 PGE₂ 그리고 이 염증인자들의 합성효소인 iNOS와 COX-2, 염증성 cytokines의 과발현을 막는 것은 염증반응을 조절함에 있어서 아주 중요한 요소가 될 수 있을 것이다.

RAW 264.7 세포에서 SD-01 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위하여 LPS를 처리하여 염증을 유발한 다음 SD-01 추출물에 의해 염증인자인 NO, PGE₂와 iNOS, COX-2 발현, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1의 생성에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, SD-01 추출물은 LPS로 유도된 염증 인자들과 생성효소의 발현, 그리고 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β , IL-6를 포함하는 일부 주요 염증성 사이토카인의 발현을 조절하고, 또 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하며, 세포부착분자와 금속분해효소의 활성을 조절하는 등 염증반응 전반에 걸쳐 중요한 역할을 한다³⁷⁾. Western blotting을 통해 NF- κ B의 활성을 알아본 결과, SD-01 추출물은 LPS에 의해서 유도된 I κ B- α 의 인산화를 저해하고 NF- κ B p65의 핵으로의 이동을 억제하는 것으로 보아 NF- κ B의 활성화를 효과적으로 억제한다는 것을 알 수 있었다.

SD-01 추출물은 대식세포인 RAW 264.7 내에서 LPS 자극으로 발생한 ROS의 생성을 유의성 있게 감소시켰으며, NF- κ B의 활성화를 저해를 통해 염증성 물질들의 생성 또한 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과들로 보아, SD-01의 메탄올 추출물은 뛰어난 항염증 활성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 SD-01은 동맥경화, 관절염, 고혈압, 암, 당뇨, 천식 등의 만성 염증성 질환 치료에 효과적으로 응용해 볼 가치가 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

- 본 연구는 2010년 동국대학교 논문계재 장려금 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

1. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008 ; 11(1) : 11-5.
2. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the

- transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 2003 ; 24(1) : 25-9.
3. Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 2002 ; 23(6) : 983-91.
4. Bai SK, Lee SJ, Na HJ, Ha KS, Han JA, Lee H, Kwon YG, Chung CK, Kim YM. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp Mol Med.* 2005 ; 37(4) : 323-34.
5. Kamata H, Manabe T, Kakuta J, Oka S, Hirata H. Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NFkappaB: effects of N-acetylcysteine and H2O2 on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and I kappa B kinases. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 ; 973 : 419-22.
6. 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.
7. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999 ; 27 : 612-6.
8. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1996 ; 20 : 121-7.
9. 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.
10. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.* 2005 ; 118(Pt 20) : 4589-92.
11. Hyun-kyoo Shin, The research on the strategy for the globalization of the oriental medicine, 보건복지부, 2001, p.3
12. Shin HK, Sung HJ. Research tendency of the middle & long period future estimating Oriental medicine. *Korean J Oriental medicine.* 1996 ; 2 : 491-3.
13. Huang CH, Horng LY, Chen CF, Wu RT. Chinese herb Radix Polygoni Multiflori as a therapeutic drug for liver cirrhosis in mice. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 114(2) : 199-206.
14. Zhang YZ, Shen JF, Xu JY, Xiao JH, Wang JL. Inhibitory effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity. *J Asian Nat Prod*

- Res. 2007 ; 9(3-5) : 355-63.
15. Li RW, David Lin G, Myers SP, Leach DN. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *J Ethnopharmacol.* 2003 ; 85(1) : 61-7.
 16. Chan YC, Wang MF, Chen YC, Yang DY, Lee MS, Cheng FC. Long-term administration of *Polygonum multiflorum* Thunb. reduces cerebral ischemia-induced infarct volume in gerbils. *Am J Chin Med.* 2003 ; 31(1) : 71-7.
 17. Chan CM, Chan YW, Lau CH, Lau TW, Lau KM, Lam FC, Che CT, Leung PC, Fung KP, Lau CB, Ho YY. Influence of an anti-diabetic foot ulcer formula and its component herbs on tissue and systemic glucose homeostasis. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 109(1) : 10-20.
 18. Chan YC, Wang MF, Chang HC. *Polygonum multiflorum* extracts improve cognitive performance in senescence accelerated mice. *Am J Chin Med.* 2003;31(2):171-9.
 19. Wang SX, Hu LM, Gao XM, Guo H, Fan GW. Anti-inflammatory activity of salvianolic acid B in microglia contributes to its neuroprotective effect. *Neurochem Res.* 2010 ; 35(7) : 1029-37.
 20. Salvianolic acid B attenuates hepatocyte apoptosis by regulating mediators in death receptor and mitochondrial pathways. *Exp Biol Med.* 2010 ; 235(5) : 623-32.
 21. Su CC, Chen GW, Lin JG. Growth inhibition and apoptosis induction by tanshinone I in human colon cancer Colo 205 cells. *Int J Mol Med.* 2008 ; 22(5) : 613-8.
 22. Liu JJ, Liu WD, Yang HZ, Zhang Y, Fang ZG, Liu PQ, Lin DJ, Xiao RZ, Hu Y, Wang CZ, Li XD, He Y, Huang RW. Inactivation of PI3k/Akt signaling pathway and activation of caspase-3 are involved in tanshinone I-induced apoptosis in myeloid leukemia cells in vitro. *Ann Hematol.* 2010 May 30. [Epub ahead of print]
 23. Tian HL, Yu T, Xu NN, Feng C, Zhou LY, Luo HW, Chang DC, Le XF, Luo KQ. A novel compound modified from tanshinone inhibits tumor growth in vivo via activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Cancer Lett.* 2010 May 20. [Epub ahead of print]
 24. Kim AJ, Kim YO, Shim JS, Hwang JK. Immunostimulating activity of crude polysaccharide extract isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 ; 71(6) : 1428-38.
 25. Kang YJ, Park KK, Chung WY, Hwang JK, Lee SK. Xanthorrhizol, a natural sesquiterpenoid, induces apoptosis and growth arrest in HCT116 human colon cancer cells. *J Pharmacol Sci.* 2009 ; 111(3) : 276-84.
 26. Handayani T, Sakinah S, Nallappan M, Pihie AH. Regulation of p53-, Bcl-2- and caspase-dependent signaling pathway in xanthorrhizol-induced apoptosis of HepG2 hepatoma cells. *Anticancer Res.* 2007 ; 27(2) : 965-71.
 27. Oh HI, Shim JS, Gwon SH, Kwon HJ, Hwang JK. The effect of xanthorrhizol on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type-I procollagen in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *Phytother Res.* 2009 ; 23(9) : 1299-302.
 28. Lee LY, Shim JS, Rukayadi Y, Hwang JK. Antibacterial activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. against foodborne pathogens. *J Food Prot.* 2008 ; 71(9) : 1926-30.
 29. Kim JE, Kim HE, Hwang JK, Lee HJ, Kwon HK, Kim BI. Antibacterial characteristics of *Curcuma xanthorrhiza* extract on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Microbiol.* 2008 ; 46(2) : 228-32.
 30. Choi BM, Lee JA, Gao SS, Eun SY, Kim YS, Ryu SY, Choi YH, Park R, Kwon DY, Kim BR. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression of heme oxygenase-1. *Biofactors.* 2007 ; 30(3) : 149-57.
 31. Washiyama M, Sasaki Y, Hosokawa T, Nagumo S. Anti-inflammatory constituents of *Sappan Lignum*. *Biol Pharm Bull.* 2009 ; 32(5) : 941-4.
 32. Bae IK, Min HY, Han AR, Seo EK, Lee SK. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol.* 2005 ; 513(3) : 237-42.
 33. Zhong X, Wu B, Pan YJ, Zheng S. Brazilin inhibits survivin protein and mRNA expression and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Neoplasma.* 2009 ; 56(5) : 387-92.
 34. Kim KJ, Yu HH, Jeong SI, Cha JD, Kim SM, You YO. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 2004 ; 91(1):81-7.
 35. Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, Marjanovic N, Dave M, Park J, Bingham CO 3rd, Al-Mussawir H, Abramson SB. Resolution of inflammation: prostaglandin E₂ dissociates nuclear trafficking of individual NF- κ B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol.* 2005 ; 175(10) : 6924-30.
 36. Abul KA, Andrew HL, Shiv P. 세포분자면역학, 6판. 서울 : 이퍼블릭. 2008 : 271-96.
 37. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002 ; 2(10) : 725-34.