

蟬蛻의 抗炎效果에 대한 實驗的 研究

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

김경완, 조한백, 김송백, 최창민, 서윤정

ABSTRACT

The anti-inflammatory effects of *Cicadidae Periostracum*

Kyoung-Wan Kim, Han-Baek Cho, Song-Baeg Kim

Chang-Min Choe, Yun-Jung Seo

Dept. of Oriental Obstetric and Gynecology, college of Oriental Medicine,
Won-Kwang University

Objectives: The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of aqueous extract from *Cicadidae Periostracum*(CP) on the RAW 264.7 cells.

Method: We examined the cytokine productions including nitric oxide(NO), interleukin(IL)-1b, IL-6 and tumor necrosis factor-a(TNF-a) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells and also inhibitory mechanisms such as mitogen-activated protein kinases(MAPKs) and nuclear factor kappa BNF-kB) using Western blot.

Results: CP inhibited LPS-induced production of NO, IL-1b and TNF-a but not of IL-6 in RAW 264.7 cells. CP respectively inhibited the activation of MAPKs such as extracellular signal-regulated kinase(ERK 1/2), c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK), p38 and NF-kB in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Also oral administration of CP inhibited CLP - induced endotoxin shock.

Conclusion: our results showed that CP down-regulated LPS-induced NO, IL-1b and TNF-a productions mainly through ERK, JNK, p38 MAPK and NF-kB pathway, which suggest the anti-inflammatory effects of CP.

Key Words: *Cryotympana pustulata*(CP), lipopolysaccharide(LPS), Inflammation, Cytokine

“이 논문은 2010년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.”
“This research was supported by Wonkwang University in 2010”

I. 서론

염증(inflammation)은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로, 생체 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상을 받았을 때, 이 손상을 국소화 시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 고도로 발달된 방어기전이며, 면역계를 동원하는 생체의 방어기전과 상처의 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐만 아니라 많은 질병의 병리 발생에 관련되어 있는 중요한 과정이다¹⁾.

염증 반응 과정에서 대식세포는 외부 침입 물질에 의해 활성화 되는데, 그 신속한 방어기전으로서 많은 화학적 매개체들을 생산하여^{2,3)} 항원을 효과적으로 제거하지만, 이러한 화학적 매개체들이 과도하거나 지속적으로 나타나게 되면 급성 또는 만성 염증성 질환의 주요 원인이 되므로⁴⁾ 이러한 매개체를 생산케 하여 나타나는 염증 반응을 억제하는 것이 중요하다.

오늘날까지 염증성 질환의 치료에 있어서 화학적 매개체의 과도한 활성을 억제하는 항염증 약물이 그동안 꾸준히 발견 되어 온 것이 사실이나, 아직 부작용이나 내성에 적절한 대응을 하지 못하고 있는 형편이다. 그래서 그 해결의 실마리로서 천연물의 신약을 통해 찾으려는 노력이 활발해지고 있다.

蟬蛻(Periostracum Cicadidae)는 매미과(Cicadidae)에 속한 곤충인 참매미(Cryptotympana atrata) 및 말매미(Cryptotympana dubia)의 羽化後의 허물이다. 여름과 가을에 우리나라 전국의 나뭇잎이나 풀잎에서 채취하여 햇볕에

말려 약재로 사용하며, 本草學的으로 辛涼解表 藥類로 분류되고, 性味는 甘,寒無毒하다⁵⁾. 蟬蛻는 그동안 임상적으로 다양한 염증성 질환에 사용되고 있었으나, 항염 효과를 가진 약물에 대한 연구는 黃芩⁶⁾, 黃蓮⁷⁾, 金銀花⁸⁾, 蒲公英⁹⁾ 등의 清熱 藥物을 중심으로 이루어져 왔고, 蟬蛻에 관련된 기존 연구로서, 알레르기의 예방에 미치는 영향¹⁰⁾, 항혈전 효과에 관한 연구¹¹⁾ 등은 있으나, 항염증 효과에 관한 연구는 아직까지 접할 수 없었다.

이에 저자는 蟬蛻의 항염 효과를 알아보기 위하여, LPS로 유도된 대식세포(RAW 264.7 cell)에서의 NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 활성화에 미치는 영향 및 MAPKs family인 ERK 1/2, JNK, p38과 inhibitory kappa B($\text{I}\kappa\text{B}$)를 조사하였다. 또한, in vitro 상에서 실험 되어진 부분을 in vivo 상에서도 확인하기 위해 CLP로 유도된 endotoxin shock 모델에서 마우스의 생존율을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 약재

실험에 사용한 蟬蛻는 옴니허브에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학교실에서 蟬蛻로서 확인을 받은 후 사용하였다. 蟬蛻 추출물을 얻기 위하여 물 1 L에 蟬蛻 100 g을 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 14.3 g의 가루를 얻었다(수율 : 14.3%). 蟬蛻 가루는 다음 사용까지 -80°C 에서 보관되었다. 蟬蛻 가루를 3차 증류수에 녹여서

0.22 mM 필터로 여과한 후 사용하였다.

2. 시 약

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 chloroform, Tri-zol, sodium dodesyl sulfate(SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS, Tris-HCl 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-Ik-B, anti-phospho-JNK는 Cell signaling(Danvers, MA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

3. 실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트(성남, 경기도)에서 구입하여 사용하였다.

4. MTT 분석

RAW 264.7 cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 하는 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 /well 의 밀도로 세포를 배양했다. 여러 가지 농도로 蟬蛻를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, 스펙트로메타에서

540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다

5. NO 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(Griess reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 /well의 밀도로 세포를 배양하였고, 여러 가지 농도로 蟬蛻를 전처리하였다. 1시간 뒤 LPS로 세포를 자극하고, 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액 100 μ l를 96-well plate에 loading하였다. 100 μ l의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 스펙트로포토메터(MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

6. Cytokine(TNF- α , IL-1b, IL-6) 측정

Raw 264.7 cell을 1×10^6 /well의 밀도로 배양하였다. LPS(500 ng/ml)로 RAW 264.7 cell을 자극하기 전 蟬蛻 추출물을 여러 농도로 1시간동안 전처리 하였다. 24시간 뒤 세포 상층액을 얻어 ELISA법으로 cytokine의 발현을 측정하였다. ELISA는 BD pharmingen(San Diego, CA, USA)에서 Mouse ELISA kit for IL-1b, IL-6, TNF- α 를 구입하여 시행하였다.

7. RNA 추출 및 Real-time RT-PCR

Total RNA는 Tri-zol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 1×10^6 /well로 배양한 세포에 蟬蛻를 여러 가지 농도로 1시간 전처리한 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 μ l의 chloroform 용액을 가하고 두세 번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 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 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다. 추출한 RNA는 reverse transcriptase PCR의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 간단히 기술하자면 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg의 oligo-(dT)을 넣고 70°C 에서 10 분간 변성시켰다. 그 후에 $1 \times$ single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit reverse transcriptase 을 첨가하고 42°C에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, $1 \times$ PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 58°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초를 30 cycle 반복하였다. Forward(f)와 reverse(r) primer 및 TaqMan probe는 Applied Biosystems에서 합성하였다.

8. Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 蟬蛻 추출물(500 mg/ml)을 전처리 하고 1시간 뒤에 LPS(500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5,000 rpm, 5 mins) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer(lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + protease inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리(15,000 rpm, 20 mins)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질 샘플링 버퍼(4 \times)을 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 Ik-Ba을 ECL detection 용액(Amersham)으로 확인하였다.

9. Cecal ligation and puncture(CLP)

6주된 C57BL/6 마우스 암컷 10마리에 蟬蛻 추출물을 0.5 g/kg, 1 g/kg의 농도로 5일(1회/1일)간 경구투여 하였다. 蟬蛻는 동결건조 하여 3차 증류수로 녹인 후 필터 하였다. 마우스를 마취하여 수면상태로 빠트린다. 복강을 열어 맹장을 찾는다. 장을 실로 묶고, 맹장을 21 게이지 바늘로 1번 찌른다. 복강을 다시 닫아 주고, 회복을 위해 따뜻한 물 1 ml 을 복강 안에 넣어준다. 마우스의 회복을 관찰하고, 마우스의 생존 여부를 약 5일간 관찰한다.

10. 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean ± S.D.로 나타냈으며, 실험결과에 대한 통계처리는 Oneway ANOVA에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 대식세포(RAW 264.7 cell)에서의 蟬蛻 추출물의 세포 독성

蟬蛻의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 대식세포(RAW 264.7 cell)에 蟬蛻를 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 MTT 분석법으로 측정하였다. 蟬蛻는 모든 농도에서 80% 이상의 생존율을 보이며, RAW 26.7 cell에 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

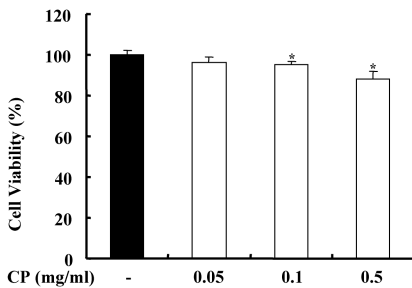


Fig. 1. Effect of *Cicadidae Periostracum* (CP) on cytotoxicity on RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with CP as indicated dose. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment. *P < 0.05 : significant as compared to saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

2. 蟬蛻 추출물이 LPS로 유도한 NO 생성에 미치는 영향

蟬蛻 추출물의 항염 효과에 대해서 조사하기 위하여 먼저 蟬蛻가 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 蟬蛻를 다양한 농도(0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 전처리하고 1시간 뒤 LPS(500 ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정한 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 蟬蛻 추출물을 전처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다(Fig. 2).

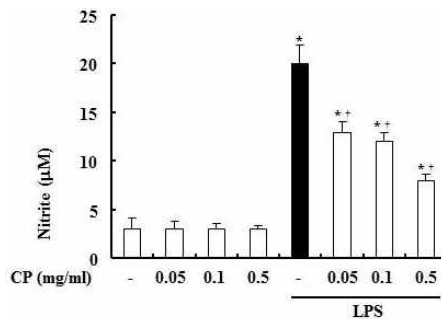


Fig. 2. The Inhibitory Effects of CP on LPS-induced NO Production.

The cells were treated with CP water extract as indicated concentration for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. NO release was measured by the method of Griess assay. *P < 0.05 : significant as compared to saline, **P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

3. 蟬蛻 추출물이 IL-1b, IL-6, TNF-a 활성화에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에서 염증성 cytokine 들(IL-1b, IL-6, TNF-a)의 활성화에 끼치는 蟬蛻 추출물의 효과를 조사하기 위하여, 蟬蛻를 다양한 농도(0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(500 ng/ml)로 자극하여 ELISA 방법으로 IL-1b, IL-6, TNF-a를

측정하였다. 염증성 cytokine 들의 활성화에 관한 실험 결과, 蟬蛻 추출물이 IL-6의 생성은 억제하지 못하였으나, IL-1b와 TNF-a의 활성을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

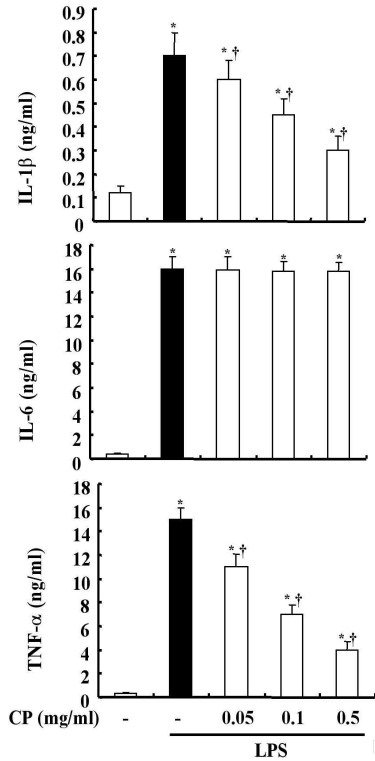


Fig. 3. Effect of CP on the Productions of IL-1b, IL-6 and TNF-a on RAW 264.7 cells.

The cells were pre-treated CP as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

4. 蟬蛻 추출물이 IL-1b, IL-6, TNF-a mRNA 활성화에 미치는 영향

蟬蛻 물 추출물이 RAW 264.7 cell에서 염증성 cytokine을 단백질 수준에서 억제하였음에 착안하여(Fig. 3), mRNA 수

준에서도 염증성 cytokine의 활성을 억제하는지 알아보기 위해 蟬蛻를 다양한 농도(0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 전처리한 후 LPS(500 ng/ml)로 자극하여 IL-1b, IL-6, TNF-a의 mRNA를 Real-Time RT-PCR 방법으로 측정된 결과, IL-1b와 TNF-a의 mRNA 활성화는 현저히 억제하였으나, IL-6 mRNA 활성화는 억제하지 못했다(Fig. 4).

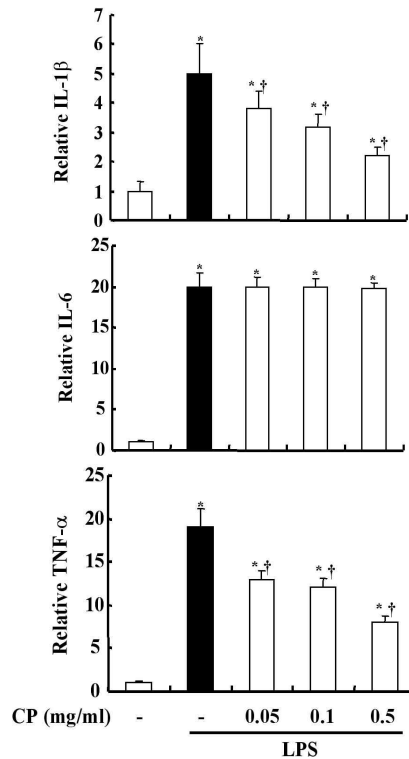


Fig. 4. Effect of CP on the mRNA Expression of IL-1b, IL-6 and TNF-a. The cells were pre-treated CP water extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h.

Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

5. 蟬蛻 추출물이 MAPKs의 인산화에 미치는 영향

蟬蛻 추출물이 MAPKs의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해서, 蟬蛻를 다양한 농도(0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 전처리한 후, LPS(500 ng/ml)로 자극하여, MAPKs의 인산화 정도를 Western blot으로 분석한 결과, LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서는 ERK, JNK, p38의 인산화가 증가 하지만, 蟬蛻를 전처리 했을 경우 ERK, JNK, p38의 인산화가 억제되었다(Fig. 5).

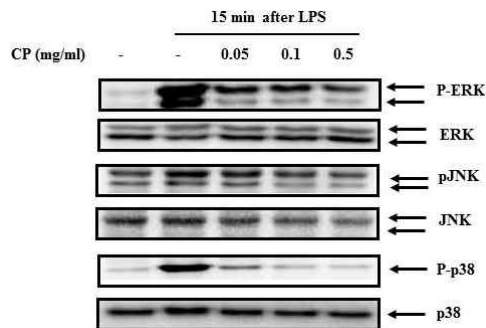


Fig. 5. Effects of *CP* on the Activation of MAPKs on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were pre-treated with *CP* aqueous extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for 15 min. The activation of MAPKs was measured by western blot. The similar results were obtained from three additional experiments.

6. 蟬蛻 추출물이 NF-κB의 활성화에 미치는 영향

蟬蛻 추출물이 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 蟬蛻를 다양한 농도(0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 전처리한 후, LPS(500 ng/ml)로 자극하여, Iκ-Bα의 분해정도를 Western blot으로 분석한 결과, 蟬蛻 추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서의

Iκ-Bα의 분해를 억제하고 있다. 즉 蟬蛻 추출물이 NF-κB의 활성을 억제하고 있다는 것을 보여 준다(Fig. 6).

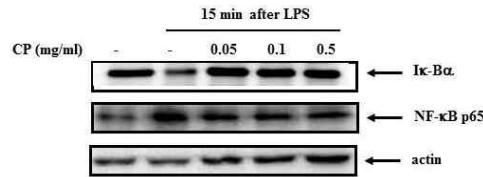


Fig. 6. Effects of *CP* on the Degradation of Iκ-Bα on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were pre-treated with *CP* aqueous extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for 15 min. The degradation of Iκ-Bα was measured by western blot. The similar results were obtained from three additional experiments.

7. 蟬蛻가 CLP로 유도된 endotoxin shock에서 마우스의 생존률에 미치는 영향

Cecal ligation and puncture(CLP)란 맹장을 묶고 구멍을 내어 내부에 축적되어 있던 분비물(박테리아)에 의해 shock를 일으키는 모델이다. 이에 蟬蛻가 CLP로 유도한 endotoxin shock에서 유의한 효과가 있는지 마우스의 생존률 실험으로 알아보았다. 실험 방법은, 마우스를 10마리씩 두 그룹(蟬蛻 100mg/kg를 경구 투여한 그룹과 경구 투여하지 않은 그룹)으로 나누어, 마취시켜 수면상태로 빠뜨리고, 복강을 열어 맹장을 찾아 실로 묶고, 맹장을 21 게이지 바늘로 1번 찌른다. 복강을 다시 닫아주고, 회복을 위해 따뜻한 물 1ml를 복강 안에 넣어주었다. 그리고 12시간마다 마우스의 회복을 관찰 하고, 마우스의 생존 여부를 120시간 동안 관찰했다. 蟬蛻를 경구 투여하지 않고 CLP로 유도한 endotoxin shock

그룹에서는 108~120 시간 사이에 모두 사망하였고, 蟬蛻 추출물 100 mg/kg를 경구 투여한 그룹에서는 120시간까지 사망률을 60%로 억제하였다(Fig. 7).

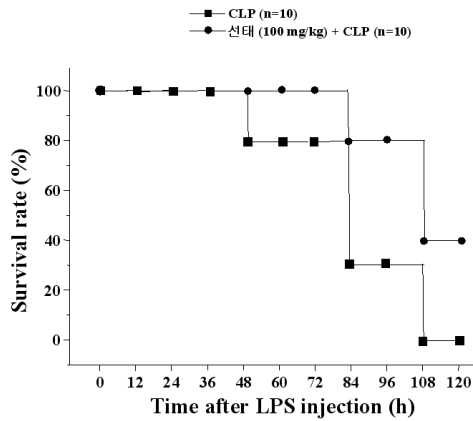


Fig. 7. Effect of CP on Survival Rate of Endotoxin Shock mice Treated with CLP.

Mice were administrated orally with CP(100 mg/kg) for 5 days and then performed the CLP surgery. Detail methods were described in the section of Materials and Methods.

IV. 고찰

의학의 발달로 인해 그동안 다양한 항염증 약물이 많이 발견되었지만, 그 효과는 여전히 한정 되어있고, 기왕에 발견된 항염증 약물조차도 내성과 독성으로 인해 부작용이 적지 않아서 대안이 필요한 것이 현실이다. 따라서 부작용이 적으면서 유의한 항염증 효과를 나타내는 천연물 신약은 그 대안의 하나로서 많은 연구가 이루어지고 있다.

蟬蛻는 한의학적으로, 淸熱 효과를 통해서 疏散風熱, 透疹止痒, 退目翳, 熄風解癩 등의 효능이 있어서 급성 후두염이나 기관염, 알러지성 피부염, 결막염 등

현대의학의 염증성 질환의 치료에 두루 사용되어 왔다⁵⁾. 《東醫寶鑑》에서는 蟬蛻를 三退散, 三退飲, 龍蛻散, 保安丸¹²⁾ 등에서 催生, 妊娠通治 및 胞衣不下의 치료에 사용하였고, 妊娠 중 皮風症에 사용하는 淸風散과 妊娠婦의 건성 피부병을 치료하는 消風散 등의 처방에 蟬蛻가 포함되어 있는 것으로 보아¹³⁾ 蟬蛻는 淸熱 효과를 통한 제반 염증성 질환의 치료 뿐 만 아니라 여성의 산전 산후의 염증성 질환에도 사용되었으며, 蟬蛻의 항염 효과가 실험적으로 검증된다면 염증 질환 치료에 지금보다 광범위하게 이용될 수 있을 것이다.

염증성 질환에 있어서 감염 초기에는 주로 해부학적 방어벽, 생리학적 방어벽, 포식 작용, 염증 반응 등의 선천 면역(innate immunity)의 기전으로, 감염 초기가 지나면 적응 면역(adaptive immunity)의 기전으로 감염에 대한 방어가 이루어진다. 선천 면역 반응에서 대식세포가 활성화하면서, 전염증성 인자(cytokine)를 생성하고, cytokine에 의해 염증상태가 유발 된다¹⁴⁾.

체내에서 면역을 담당하는 대식세포는 항원작용, 식작용 및 면역반응 조절작용을 가지는 면역세포로, LPS 등의 외부 자극에 의해 활성화되어 전염증성 cytokine이나 NO 등의 염증매개물질을 다량 분비함으로써 염증반응을 일으킨다. 대식세포는 항원을 세포표면에 제시함으로써 면역획득에 관여하는 T세포를 활성화시키는데, 이때 대식세포의 표면에 발현되는 세포표면 수용체(Toll-like receptor) 중에서 특히 TLR4는 대식세포에 발현하는 수용체로 LPS에 특이적인 반응을 한다¹⁵⁻¹⁷⁾.

TLR4의 ligand인 LPS는 그람 음성 박테리아의 외부 세포막 구성 물질로서, 내독소(endotoxin)인 lipid A를 포함하고 있어서 endotoxin shock의 원인 물질로 알려져 있다. 그리고 대식세포를 활성화시켜서 NO, TNF-a, IL-1b, IL-6 등의 cytokine을 분비시켜서 조직 내 염증 반응을 유발한다¹⁸).

이에 본 연구에서는 蟬蛻의 급성 염증반응에 미치는 효과를 확인하기 위하여, LPS로 유도된 대식세포에서의 NO, TNF-a, IL-1b, IL-6의 생성에 미치는 영향 및 MAPKs family인 ERK 1/2, JNK, p38와 NF-kB를 관찰하였다.

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성 분자로서, iNOS에 의해 L-arginine이 변성되어 생성된다¹⁹. NO는 대식세포의 종양, 박테리아 파괴와 같은 면역 반응에 중요한 역할을 하기도 하지만, LPS가 인체에 유해한 작용을 하게 하는 주된 원인이 되기도 한다²⁰. NO의 과잉생성은 폐혈증, 류마티즘 같은 면역질환을 유발하는데²¹, 蟬蛻 추출물은 NO의 생성을 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과가 있었다(Fig. 2).

IL-1b, IL-6는 저농도에서는 국소 염증 반응을 매개하지만, 고농도에서는 열을 발생시키면서 간에서 급성기 단백질(acute phase protein)의 합성을 유도한다²². TNF-a는 혈관의 확장과 혈관투과성을 높이고 발적, 발열, 종창의 염증 반응을 일으켜 감염에 대한 면역반응을 돕지만, 과잉 생산되면 시상하부에 작용하여 열이 생기게 하는 내재성 발열원으로 체온을 상승시키며, 급성기 반응(acute phase response)을 일으키고, 응집계(coagulation system)를 활성화시킨다²³.

특히 IL-6와 TNF-a는 패혈증과 같은 염증성 질환이 발생했을 때, 신체 내에서 고농도로 발현이 되고, 이는 장기손상과 부전의 원인이 된다고 보고된 바 있다^{24,25}. 이번 연구의 결과에 의하면, 蟬蛻 추출물은 LPS로 유도한 IL-1b와 TNF-a의 생성 억제에 유효한 것으로 나타났고(Fig. 3), IL-1b와 TNF-a의 mRNA 발현도 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

LPS는 혈액에 존재할 경우, 즉각적으로 LBP, CD14와 복합체를 형성하는데 이렇게 형성된 복합체는 세포표면에 작용하여 MAPKs의 인산화 및 NF-kB의 활성화를 일으킨다²⁶⁻²⁸).

MAPKs는 주로 ERK, JNK, p38로 이루어지는데, 인산화 되지 않은 불활성 상태에서는 세포질에 머물다가 인산화에 의하여 활성화되면 핵으로 이동하면서 cytokine 생성에 관여한다²⁹.

NF-kB는 전사인자(transcriptional factor)로서, 염증 반응과 면역 반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하여 종양 형성, 자가 면역 질환, 염증 질환에 중요한 역할을 담당한다^{30,31}. NF-kB는 세포질 내에서 억제분자 IκB와 결합된 불활성형으로 존재하며 IκB가 인산화(phosphorylation)되고 분해(degradation)되면서 NF-kB가 활성화되어 핵 안으로 이동한다^{32,33}.

LPS-LBP-CD14의 복합체로 인해 MAPKs가 인산화 되고, NF-kB가 활성화 되면서 NO, TNF-a, IL-1b, IL-6 등이 생성되는데, 이번 실험 결과에 따르면, 蟬蛻 추출물에 의해 MAPKs 인산화도 억제되었고(Fig. 5), 또한 IκB의 인산화로 인한 NF-kB의 활성화 역시 억제된 걸 알 수 있었다(Fig. 6).

이러한 결과는, 蟬蛻 추출물이 MAPKs

의 인산화와 NF- κ B의 활성화를 억제함으로써 전염증성 세포활성 물질을 조절할 수 있다는 것을 의미한다.

In vitro에서 얻은 결과를 토대로, in vivo에서 蟬蛻 추출물을 경구 투여 하였을 때 CLP로 유도한 endotoxin shock에서 유의한 효과가 있는지 확인한 실험에서, 蟬蛻 추출물을 투여한 마우스 생존율의 증가를 보여줬고, 이는 蟬蛻의 항염 효과로 인해 염증 반응이 억제 될 수 있다는 것을 시사한다.

이상의 실험 결과를 볼 때, 蟬蛻는 항염 효과를 가지고 있어 염증 질환 치료에 유효하다고 판단되며, 또한 문헌에 나타난 부인과 염증 질환 치료에 활용하기 위한 근거가 된다고 사료된다. 그리고 이는 향후 추가적인 실험과 고찰로 이어져야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는, 蟬蛻의 항염증 효과를 연구하기 위하여, in vitro에서 마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 cell을 LPS로 자극하여 염증반응을 일으켰을 때, 蟬蛻 추출물이 NO, IL-1b, IL-6, TNF-a의 생성, MAPKs의 인산화, NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 관찰하였고, in vitro뿐만 아니라 in vivo에서도 CLP로 유도한 endotoxin shock에서 생존율을 조사한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 蟬蛻 추출물은 대식세포에서 세포독성이 거의 나타나지 않았다.
2. 蟬蛻 추출물은 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.

3. 蟬蛻 추출물은 IL-1b, IL-6, TNF-a 생성 및 mRNA 수준에서의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.
4. 蟬蛻 추출물은 MAPKs의 인산화와 NF- κ B의 활성화를 농도 의존적으로 억제하였다.
5. 蟬蛻 추출물은 in vivo에서, CLP 로 유도된 endotoxin shock에서 마우스의 Survival time을 증가시키고, Survival rate을 향상시켰다.

이상의 결과에서, 蟬蛻 추출물은 대식 세포에서 MAPKs의 인산화와 NF- κ B의 활성화를 억제하여 NO와 전염증성 cytokine의 생성을 억제하였다.

- 투 고 일 : 2011년 1월 31일
- 심 사 일 : 2011년 2월 7일
- 심사완료일 : 2011년 2월 9일

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1998 :65-6.
2. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cellular Signal. 2001;13:85-94.
3. Kubes P, Mccafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. American J Medicine. 2000;109:150-8.
4. Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. Current Rheumatology Report. 2000;2:216-24.
5. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林社. 1997

- :351-2.
6. Lee JK et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Effect of *Scutellaria Baicalensis*. *Korean Journal of Oriental Medicine*. 2007;28(4):124-35.
 7. 조은호, 이태희. LPS에 의해 유발된 염증(炎症) 스트레스에 대한 황련(黃蓮)과 부자(附子)의 효과. *대한본초학회지*. 2006;21(2):77-85.
 8. 이동연 등. 금은화(金銀花) 및 금은화전초(金銀花全草)가 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. *동의생리학회지*. 2005;19(2):481-9.
 9. 하현희 등. Inhibitory Effect of *Taraxacum mongolicum*(蒲公英) on NO Production in LPS-stimulated Macrophages. *한방안이비인후피부과학회지*. 2007;20(3):98-106.
 10. 박병모, 김광모. 蟬蛻가 알레르기의豫防에 미치는 영향. *동의병리학회지*. 1993;8(1):225-34.
 11. 한범수 등. 곤충 생약으로부터 항응고 및 항혈전 물질의 탐색. *생약학회지*. 1999;30(4):409-12.
 12. 許浚, 東醫寶鑑國譯委員會 譯. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:489, 1420, 1610-40.
 13. 송병기. 漢方婦人科學. 서울:행림출판사. 1984:315-6, 573.
 14. Peter P. The immune system. 2nd ed. Seoul:Lifescience Publishing Co. 2006 :1-33, 223-73.
 15. Janeway CA. : Immunology. 6th ed. Seoul:Lifescience Publishing Co. 2005 :37-103, 214-56, 434-89.
 16. 임병우, 최동국, 석경호. 기초면역학. 서울:효일. 2006:201-11.
 17. Horwood et al. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6 production. *J Immunol*. 2006;176(6):3635-41.
 18. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
 19. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269. 1994:13725-28.
 20. Ajizian SJ et al. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis* 179. 1999:939-44.
 21. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems based review. *Free Radic Biol Med* 41. 2006:691-701.
 22. Janeway, Charles A. Immunology. 6th ed. Seoul:Lifescience Publishing Co. 2005:37-103, 214-56, 434-89.
 23. 김광혁 등 譯. 세포·분자 면역학. 서울:정문각. 1998:297-330.
 24. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Reviews of Medicine* 45. 1994:491-503.
 25. Tracey KJ et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human

- cachectin. *Science* 232. 1986:977-80.
26. Zhao Q et al. The role of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J Biol Chem* 280. 2005:8101-8.
27. Ajizian SJ et al. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis* 179. 1999:939-44.
28. Dong Z et al. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity. *J Leukoc Biol* 53. 1993:53-60.
29. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* 25. 2000:7-9.
30. Lawrence T et al. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med*. 2001;7(12):1291-7.
31. Riehemann K et al. Plant extracts from stinging nettle(*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett*. 1999;442(1):89-94.
32. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:141-79.
33. Zandi E et al. The IkappaB kinase complex(IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*. 1997;91(2):243-52.