

木槿花 물추출물의 항염효능에 관한 연구

이동민^{1#}, 한효상², 이영종^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Effect of Hibisci Flos on Inflammatory Cytokines Production in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 Macrophages

Dong-Min Lee^{1#}, Hyo-Sang Han², Young-Jong Lee^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

2 : Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University Geumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : Hibisci Flos has long been used for inflammatory diseases in traditional Korean medicine. However, little scientific investigation has been carried out. The aim of the present study is to investigate the effect of Hibisci Flos water extract (HF) on inflammatory cytokines production in Raw 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS).

Method : HF was prepared by extracting with boiling water for 2 hours. We observed the cell viability of mouse macrophage Raw 264.7, the production of nitric oxide (NO) and the inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10, IL-15, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), vascular endothelial growth factor (VEGF), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in Raw 264.7 cells stimulated by LPS.

Result : The MTT assay was carried out to check the cellular toxicity of HF. No significant toxicity was observed in the experiment. HF significantly inhibited the increase of NO in the macrophages induced by LPS after 24 hour treatment. HF significantly inhibited the production of IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, TNF- α , IFN- γ , VEGF, GM-CSF and M-CSF in the Raw 264.7 cells induced by LPS in the concentration of 25 μ g/mL or higher.

Conclusion : These results suggest that HF might have regulatory effects on LPS-induced inflammatory cytokine production, which might explain its beneficial effect in the treatment of inflammatory disease.

Key words : Hibisci Flos, inflammation, macrophage, cytokine.

서 론

木槿花는 “아욱과(Malvaceae) 식물인 무궁화 *Hibiscus syriacus* L.의 꽃이며, 여름에서 가을까지 맑은 날을 택해 이른 아침 꽃이 절반 피었을 때 뜯어서 햇볕에 말려 사용한다¹⁾.

木槿花는 『日華子本草』²⁾에 “木槿花, 凉, 無毒, 治腸風瀉血并赤白痢, 炒用. 作湯代茶吃, 治風.” 이라 처음 收載되었으며, 한의학 임상에서 淸熱利濕, 涼血解毒하는 효능으로써

腸風瀉血, 赤白下痢, 痔瘡出血, 肺熱咳嗽, 咳血, 白帶, 瘡癤腫腫, 燙傷 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다^{1,3)}.

木槿花의 성분으로는 lutein-5, 6-epoxide, cryptoxanthin, chrysanthemaxanthin, antheraxanthin, taxifolin-3-O- β -D-glucopyranoside, herbacetin-7- β -D-glucopyranoside, kaempferol-3- α -L-arabinoside-7- α -L-rhamnoside, delphinidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, petunidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-glucoside,

*교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342. 가천대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 031-750-5415 · E-mail : garak@gachon.ac.kr

#제1저자 : 이동민, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342. 가천대학교 한의과대학 본초학교실

· HP : 016-812-8182 · E-mail : axlemin@yahoo.co.kr

· 접수 : 2013년 8월 15일 · 수정 : 2013년 9월 13일 · 채택 : 2013년 9월 17일

peonidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-glucoside, 그 외 다양한 glucopyranoside 등이 있다^{1,4)}.

약리 효능에 대한 연구로 Yun 등⁵⁾은 무궁화 꽃의 해열, 구충의 효과를 보고하였고, Kwon 등⁶⁾은 뿌리껍질과 줄기, 뿌리의 항산화효과에 대해, 그리고 최 등⁷⁾ 및 박 등⁸⁾은 木槿皮 추출물이 기억력과 Alzheimer's disease에 미치는 영향에 대해 보고하였다.

염증(inflammation)의 정의는 균의 감염과 열, 외상, 항원 항체반응 등 생체 조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전이라고 할 수 있으며, 염증의 발생 부위에는 발열, 발적, 종창, 동통, 기능장애와 같은 염증의 5대 징후가 발생되는데, 이 염증을 병리조직학적 관점으로 볼 때에는 혈관 투과성 항진과 과립구, 또 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라 할 수 있다⁹⁾.

이에 저자는 木槿花가 한의학에서 肺熱咳嗽 등에 사용된 것으로 보아 염증과 면역기능과 관련이 있을 것으로 사료되어 木槿花를 열수 추출하여 제조한 시료(HF=Hibisci Flos water extract)를 대상으로 LPS로 유발된 마우스 대식세포 Raw 264.7 cells의 NO 생성증가, 그리고 IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, TNF- α , IFN- γ , VEGF, GM-CSF, M-CSF의 cytokine 생성증가에 미치는 영향을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 木槿花(Hibisci Flos)는 경기도 성남시 남한산성 일대에 식재된 무궁화 *Hibiscus syriacus* L.의 꽃을 2009년 4월에 채취하였으며, 모든 약재는 실험 전에 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 mouse macrophage (Raw 264.7 cells)이며 한국 세포주 은행 (KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 ethyl alcohol (Samchun Chemical, Korea), DMSO (Sigma, USA), DMEM (Sigma, USA), 1×PBS (Sigma, USA), EDTA (Sigma, USA), trypsin-EDTA (Sigma, USA), isopropanol (Sigma, USA), bio-plex cytokine assay kit (Bio-Rad, USA), procarta cytokine assay kit (Panomics, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO2 incubator (Nuair, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), air compressor (Tamiya, Japan), homogenizer (Omni, USA), research microscope (Becton dickinson, USA), refrigerated centrifuge (Hanil, Korea), fume hood (Hanil, Korea), clean bench (Jeio thec, Korea),

ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader 680 (Bio-Rad, USA), vortex mixer (Vision Scientific Co, Korea), water bath (Intron Biotech, Korea), ice-maker (Vision Scientific Co, Korea), bio-plex 200 (Bio-Rad, USA) 등이다.

2. 방법

1) 시료의 제조

木槿花 50 g의 중량을 정확히 측정한 뒤 환류추출기에 1차 증류수 2,000 mL와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper (Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 22.5 g을 얻었으며, 수율은 45%였다.

2) 세포 배양

Raw 264.7 cells는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells는 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3 일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin 용액을 버리고 37°C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 mL culture flask)에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) 세포독성 검사(cytotoxicity assay)

준비된 시료가 Raw 264.7 cells에 유발시키는 세포독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 세포를 100 μ l씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 (0, 25, 50, 100, 200 μ g/mL)를 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 100 μ l씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 후 2 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μ l 처리하고 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability(\%)} = \text{AT} / \text{AC} \times 100$$

AC : absorbance of control

AT : absorbance of tested extract solution.

4) Nitric oxide(NO) 생성 측정

Weissman 등¹⁰⁾의 실험방법을 참조하여 다음과 같이 시행하였다. LPS를 단독처리(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 μl 을 채취하여 여기에 그리스 시약 100 μl 을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 nitric oxide 생성은 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{Productions of Nitric oxide(\%)} = \text{AT} / \text{AC} \times 100$$

AC : absorbance of control

AT : absorbance of tested extract solution.

5) Cytokine 생성측정

면역단백질 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Politch¹¹⁾을 참조하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 96 well plate에 1×10^5 cells/mL의 세포를 100 μl 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 $1 \times \text{PBS}$ 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 배지에 담아 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액 (cell culture supernatant)을 채취하여 filter plate(96 well type)에 미리 준비되어 있던 antibody-conjugated capture beads와 결합시킨다. 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150 μl 의 wash buffer로 세척한다. 세척이 끝난 뒤 각 well에 detection antibody를 추가한 후 30 분간 배양한다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 streptavidin-PE를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30 분간 진동배양 (shaking)한다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 120 μl 의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5 분간 진동배양(shaking)한 후 bio-plex array reader (Bio-Plex 200)을 이용, 측정코자 하는 cytokine의 양을 조사·비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 분석하여 p -value가 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포 생존율

HF가 대식세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 유의한 감소는 없었다(Fig. 1).

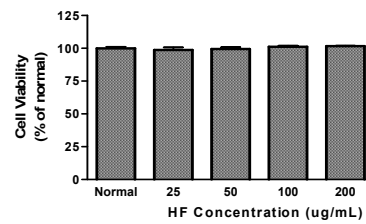


Fig. 1. Effect of HF on cell viability in Raw 264.7 cells for 24 h, incubation.

HF : Water extract of Hibisci Flos.

Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.

Normal : Treated with media only.

2. NO 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 ($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 2).

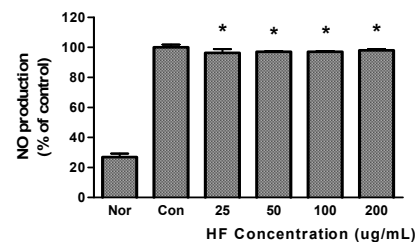


Fig. 2. Effect of HF on NO production in Raw 264.7 cells for 24 h, incubation with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.

Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.

Normal : Treated with media only.

Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only.

* represents $P < 0.05$ compared to the control.

3. IL-4 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-4 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-4 생성증가를 유의하게 ($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 3).

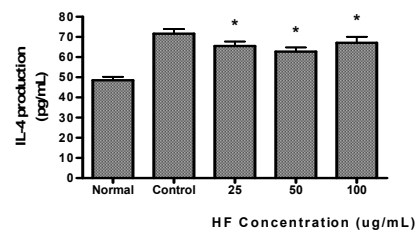


Fig. 3. Effect of HF on IL-4 production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.

Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.

Normal : Treated with media only.

Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only.

* represents $P < 0.05$ compared to the control.

4. IL-5 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-5 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-5 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 4).

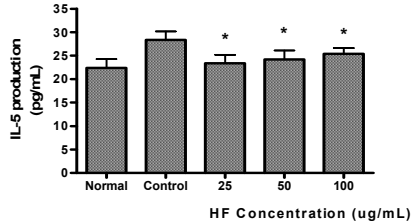


Fig. 4. Effect of HF on IL-5 production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

5. IL-10 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-10 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-10 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 5).

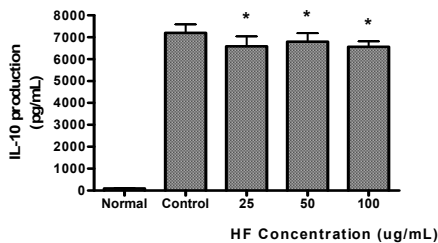


Fig. 5. Effect of HF on IL-10 production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

6. IL-15 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-15 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-15 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 6).

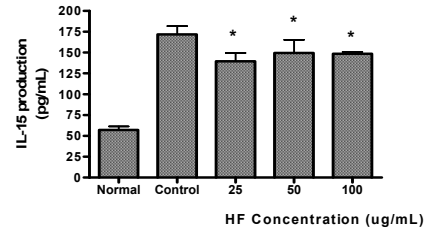


Fig. 6. Effect of HF on IL-15 production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

7. TNF- α 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 TNF- α 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 TNF- α 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 7).

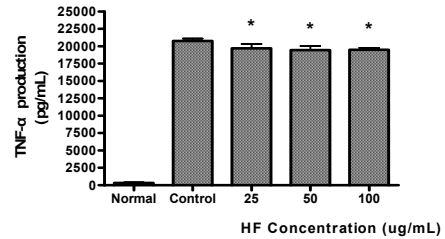


Fig. 7. Effect of HF on TNF- α production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

8. IFN- γ 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IFN- γ 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IFN- γ 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 8).

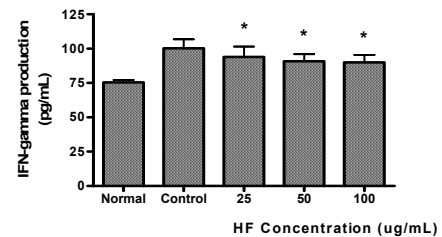


Fig. 8. Effect of HF on IFN- γ production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean \pm SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

9. VEGF 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 VEGF 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 9).

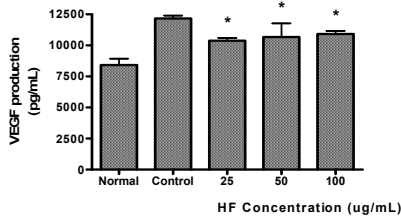


Fig. 9. Effect of HF on VEGF production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean±SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 µg/mL) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

10. GM-CSF 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 GM-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 GM-CSF 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 10).

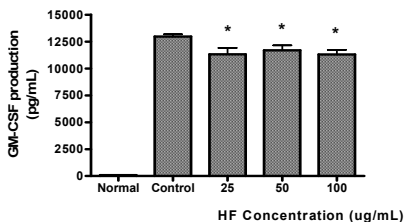


Fig. 10. Effect of HF on GM-CSF production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean±SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 µg/mL) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

11. M-CSF 생성증가에 대한 영향

HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 M-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 M-CSF 생성증가를 유의하게($P < 0.05$) 억제하였다(Fig. 11).

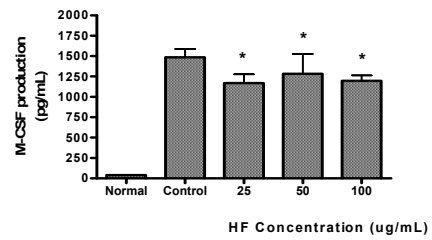


Fig. 11. Effect of HF on M-CSF production in Raw 264.7 cells treated with LPS.

HF : Water extract of Hibisci Flos.
Cells were incubated for 24 h. Results are represented as mean±SD.
Normal : Treated with media only.
Control : Treated with LPS (1 µg/mL) only.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

고찰

무궁화 *Hibiscus syriacus* L.는 아욱과(Malvaceae)에 속하는 낙엽활엽 관목이다¹²⁾. 『日華子本草』²⁾에 “木槿花, 凉, 無毒, 治腸風瀉血并赤白痢, 炒用, 作湯代茶吃, 治風.”이라 처음 收載되었으며, 한의학 임상에서 淸熱利濕, 凉血解毒하는 효능으로써 腸風瀉血, 赤白下痢, 痔瘡出血, 肺熱咳嗽, 咳血, 白帶, 瘡癤癰腫, 燙傷 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다^{1,3)}.

『약재는 大暑부터 處暑 사이에 맑은 날을 택해 이른 아침 꽃이 절반 피었을 때 뜯어서 햇볕에 말려 사용한다. 말린 꽃은 말려 들어 달걀 모양 또는 원기둥 모양의 덩어리 모양으로 길이는 약 3 cm이며 지름은 1.5 cm이다. 밑부분에 회녹색의 꽃받침이 있고 표면에는 가늘고 부드러운 털이 조밀하게 나 있으며 가장자리는 5개로 갈라져 있다. 꽃받침의 외면에는 회녹색을 띤 실 모양의 꽃떡잎이 몇 개 있다. 대부분 짧은 꽃자루가 붙어 있다. 꽃잎은 희고 5 개이거나 혹은 여러 개가 몇 겹으로 겹쳐 있고 주름이 잡혀 말려들어 있다. 중간에 노란 꽃술이 있고 여러 개의 수술이 모여 원통형으로 되어 암술의 주위를 둘러싸고 있다. 질은 가볍고 약간 향기가 있으며 꽃이 크고 흰 것이 좋다^{13,14)}.

木槿花의 성분으로 유 등¹⁵⁾은 무궁화의 품종 6계통별 flavonoid 성분 분포에 관한 비교에 대하여 보고하였다.

약리 및 효능에 대한 연구로는 최 등⁷⁾은 木槿皮 열수추출물과 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태 모델에 미치는 영향을 보고하였고, 박 등⁸⁾은 木槿皮 추출물이 CT105와 β A로 유도된 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향을 보고하였다.

木槿花가 한의학에서 淸熱利濕, 凉血解毒하는 효능을 가지고 있으며, 肺熱咳嗽 등의 증상에 사용된 것으로 미루어 염증 및 면역기능과 관련이 있을 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 木槿花를 열수 추출하여 제조한 시료(HF)를 대상으로 마우스 대식세포 Raw 264.7 cells의 cell viability와 LPS로 유발된 마우스 대식세포 Raw 264.7 cells의 NO 생성증가, 그리고 IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, TNF-α, IFN-γ, VEGF, GM-CSF, M-CSF의 생성을 측정하여 木槿花의 항염증 효과를 살펴보고자 하였다.

염증반응은 생체나 조직에 물리적 충격이나 화학물질, 세균감염 등과 같은 자극이 가해져서 발생하는 손상부위를 정상

상태로 복구 및 재생하는 활성기전으로, 염증이 일어나면 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid, leukotriene과 같은 혈관활성물질이 유리되어 혈관확장, 혈관세포막 투과성 및 부종 등이 증가된다¹⁶⁾.

LPS는 그람-음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 알려져 있으며, Raw 264.7 cells 등의 대식세포 혹은 단핵구에서 TNF- α 혹은 각종 interleukin과 같은 염증성 cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{17,18)}.

본 연구에서는 한국 세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 분양받은 마우스 대식세포 Raw 264.7 cells에 HF를 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 뒤에 24 시간 동안 37°C에서 배양한 후, 세포의 증식을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 normal군에 비하여 HF가 Raw 264.7 cells에 유의한 세포증식을 감소시키지 않았으며 이는 HF가 대식세포에 유의한 세포독성을 유발하지 않는다는 것으로 볼 수 있다.

어떠한 염증이 발생되면 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 만들어지는 NO와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등과 같은 염증관련인자들이 생성되고, 이러한 염증매개물질의 형성은 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κB (NF- κB)를 활성화시키고 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin (PG)으로 전환되어 NO를 생성한다고 알려져 있다^{19,20)}. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 LPS와 함께 24시간동안 배양한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 억제시켰다. 이와 같이 HF가 LPS에 의해 유발된 대식세포의 NO 생성증가를 억제함은 HF가 NO 과잉에 의한 염증악화를 억제할 수 있는 효능이 있음을 의미한다.

IL-4는 B cell에서 IgE 혹은 IgG1(마우스의 경우) 항체 생성을 유도하고 이 항체들이 비만세포 또는 호산구 표면에 존재하는 수용체에 결합함으로써 이들 세포를 활성화시켜 각종 알레르기성 질환 발현에 관여되는 각종 매개물질이 분비되게 된다²¹⁾. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-4 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-4 생성증가에 대해 유의하게 억제시켰다.

인체에서 IL-5는 Th2에서 분비되는 cytokine으로서 조혈모세포를 호산구로 분화시키는 작용을 하며 또한 호산구를 활성화하고 생존을 연장시키는 작용이 있다. 그리고 IL-5의 이러한 기능은 호산구에게만 특이적으로 작용한다고 알려져 있다²²⁾. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-5 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-5 생성증가에 대해 유의하게 억제시켰다.

IL-10은 림프구와 대식세포에 의해 생산되는 강력한 항염증 cytokine으로서 이식거부, 염증, 자가면역의 특징을 갖는 많은 질환에서 치료적인 특징뿐만 아니라 병인적인 특징을 갖는 것으로 알려져 있다²³⁾. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-10 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서

LPS에 의한 IL-10 생성증가에 대해 유의하게 억제시켰다.

IL-15는 14-kDa의 당단백질로서 IL-2 수용체의 β - γ -chain에 작용하여 T cell을 증식시키고 apoptosis를 막아주며, NK cell의 세포독성 및 IFN- γ 생산을 증가시키고, B cell의 증식과 iso-type switching을 유도하는 등 다양한 면역반응을 일으킨다고 알려져 있다^{24,25)}. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-15 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-15 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

TNF- α 는 세포의 성장과 분화, apoptosis, necrosis 등의 기능에 관여하고 혈관투과성을 증가시킨다²⁶⁾. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 TNF- α 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 TNF- α 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

IFN- γ 는 T 림프구와 NK cell에서 분비되는 glycoprotein으로서 대식세포의 hydrogen peroxide 생산을 증가시켜 결핵균의 세포내 제거와 결핵균 복제 억제능력을 촉진하며 대식세포를 감작시켜 TNF- α 및 cytokine의 분비를 촉진시킨다. 그러나 과다생성시 국소적인 염증과 조직의 파괴를 초래하기도 한다²⁷⁾. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IFN- γ 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IFN- γ 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

VEGF는 혈관내피세포에서 형성되고, 헤파린에 결합하는 당단백질로 외상이나 신생물에서 혈관생성을 촉진하는 인자로서²⁸⁾ 내피세포의 증식, 혈관신생 및 모세혈관 투과성을 증가시킨다²⁹⁾. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 VEGF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

GM-CSF는 성숙된 조혈세포에서 분화된 세포의 기능을 항진시킴으로서 중성구나 호산구의 생존을 연장시키고 식균작용을 나타내는 대식세포, 중성구, 호산구의 활성을 증강시킬 뿐만 아니라 암세포에 대한 대식세포, 중성구, 호산구의 항체 의존성 세포독성능을 증가시킨다^{30,31)}. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 GM-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 GM-CSF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

M-CSF는 단핵구 식세포(mononuclear phagocytes)의 성장, 분화, 그리고 활성화도에 영향을 주며 또한 거식세포의 활성화도 및 이동에도 영향을 준다고 알려져 있다^{32,33)}. HF가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 M-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 HF를 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 M-CSF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

이처럼 HF가 LPS에 의해 유발된 대식세포의 각종 cytokines의 생성증가를 유의하게 감소시키는 것은 HF가 대식세포의 cytokines 과분비로 인한 염증을 악화할 수 있는 항염효능이 있음을 의미한다.

이상의 결과, 木槿花 물 추출물은 LPS로 유발된 대식세포

의 NO 증가 및 IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, TNF- α , IFN- γ , VEGF, GM-CSF, M-CSF의 생성증가를 억제하는 것으로 보아 유의한 항염효능을 가지고 있는 것으로 생각된다. 앞으로 木槿花 추출물을 이용한 대식세포 연관 면역질환 치료제도의 개발을 위하여 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

木槿花(Hibisci Flos)의 항염효능을 연구하고자 HF를 대상으로 마우스 대식세포 Raw 264.7 cells의 cell viability와 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 NO 생성증가, 그리고 IL-4 등의 cytokines 생성증가에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 木槿花 물추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 木槿花 물추출물을 농도별로 처리했을 때 대식세포에 유의한 독성을 유발하지 않았다.
2. 木槿花 물추출물은 24시간의 배양에서 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성증가를 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제하였다.
3. 木槿花 물추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, TNF- α , IFN- γ , VEGF, GM-CSF, M-CSF 생성증가를 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제하였다.

이상의 결과, 木槿花 물 추출물은 LPS로 유발된 대식세포의 NO 증가 및 IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, TNF- α , IFN- γ , VEGF, GM-CSF, M-CSF의 생성증가를 억제하는 것으로 보아 항염효능을 가지고 있는 것으로 생각된다.

References

1. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China, Zhonghuabencaocao, Vol. 9, Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 354-6.
2. Wu Y, Rihuaizibencaocao, Hefei : AnhuiKexuejishu publisher, 2005 : 148-9.
3. Choi GY, Yoon TS, Choo BK, Lee AY, Chae SU, Ju YS, Kim HK, Study on the Medicinal Parts and Expected Efficacy of the Hibiscus syriacus by Literature Review on the Classics of Oriental Medicine, Kor J Orient Med, 2007 ; 13(2) : 27-36.
4. Tian DH, Shiyongzhongyaoacidian, Beijing : Renminweisheng publisher, 2002 : 291-2.
5. Yun BS, Lee IK, Ryoo IJ, Yoo ID, Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarins-lignans from *Hibiscus syriacus*, J Nat

- Prod, 2001 ; 64(9) : 1238-40.
6. Kwon SW, Hong SS, Kim JI, Ahn IH, Antioxidant properties of heat-treated *Hibiscus syriacus*, Izv Akad Nauk Ser Biol, 2003 ; (1) : 20-1.
7. Choi KW, Lee SR, Jung IC, Effects of ChongMyung-Tang and ChongMyung-Tang added Hibiscus syriacus Hot water extract & Ultra-fine Powder on Microglia and Memory Deficit Model, Kor J Orient Physiol Pathol, 2006 ; 20(5) : 1200-10.
8. Park JU, Jung IC, Lee SR, The Effects of ChongMyungTang(CMT) and ChongMyungTang added Hibiscus syriacus(MCMT) Extract on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT-105 and β A, J Orient Neuropsychiatry, 2006 ; 17(1) : 37-57.
9. Park GG, Gugangsaenghwahak, Seoul : Gunja publisher, 1999 : 318-25.
10. Weissman BA, Gross SS, Measurement of NO and NO synthase, Curr Protoc Neurosci, 2001 ; 7(7) : 13.
11. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ, Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men, Hum Reprod, 2007 ; 22(11) : 2928-35.
12. Gangsosinuihakwon, Jungyakdasajeon Vol. 4, Seoul : Jeongdam publisher, 1998 : 1766-7.
13. Lee CB, Wonsaekdaehansikmuldogam, Seoul : Hyangmunsa, 2006 : 736.
14. Lu GP, Liu LR, Changyongzhongyaoacichuantongjianbie, Beijing : Renminweisheng publisher, 2005 : 465-6.
15. Yoo KO, Lim HT, Kim JH, Studies on the flavonoids of the Hibiscus syriacus L. complex, Kor J Plant Res, 1996 ; 9(3) : 224-9.
16. Willoughby DA, Human arthritis applied to animal models, Toward a better therapy, Ann Rheum Dis, 1975 ; 34(6) : 471-8.
17. Lazarov S, Balutsov M, Ianev E, The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock, Vutr Boles, 2000 ; 32(4) : 33-40.
18. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW, Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages, Biol Pharm Bull, 2004 ; 27(5) : 617-20.
19. 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- κ B transactivation in LPS-activated Raw 264.7 cells, Mol Cells, 2007 ; 23(3) : 398-404.
20. 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.
21. Heo Y, Kim HA. Review on Experimental Methods for Investigation of Atopic Dermatitis. *Kor J public health*. 2007 ; 44(1) : 81-6.
22. Bagley CJ, Lopez AF, Vadas MA. Updates on cells and cytokines; New frontiers for IL-5. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 ; 99(6) : 725-8.
23. Pajkrt D, Camoglio L, Tiel-van Buul MC, de Bruin K, Cutler DL, Affrime MB, Rikken G, van der Poll T, ten Cate JW, van Deventer SJ. Attenuation of proinflammatory response by recombinant IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration. *J Immunol*. 1997 ; 158(8) : 3971-7.
24. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*. 1994 ; 13(12) : 2822-30.
25. Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- γ by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest*. 1995 ; 96(6) : 2578-82.
26. Kim YH, Yoon HJ, Moon ME, Lee JH, Park HS, Kim JS. Production of NO, TNF- α and IL-6 by Squalene, Alkoxy Glycerol, Batyl and Chimyl Solutions in RAW 264.7 Macrophage Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2005 ; 34(10) : 1503-8.
27. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4+ T lymphocytes acquired in response to mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 1993 ; 151(1) : 518-25.
28. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 ; 161(2) : 851-8.
29. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995 ; 146(5) : 1029-39.
30. Costello RT. Therapeutic use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). A review of recent experience. *Acta Oncol*. 1993 ; 32(4) : 403-8.
31. Lopez AF, Eglinton JM, Lyons AB, Tapley PM, To LB, Park LS, Clark SC, Vadas MA. Human interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *J Cell Physiol*. 1990 ; 145(1) : 69-77.
32. Bukowski RM, Budd GT, Gibbons JA, Bauer RJ, Childs A, Antal J, Finke J, Tuason L, Lorenzi V, McLain D. Phase I trial of subcutaneous recombinant macrophage colony-stimulating factor: clinical and immunomodulatory effects. *J Clin Oncol*. 1994 ; 12(1) : 97-106.
33. Sakurai T, Suzu S, Yamada M, Yanai N, Kawashima T, Hatake K, Takaku F, Motoyoshi K. Induction of Tumor Necrosis Factor in Mice by Recombinant Human macrophage colony-stimulating Factor. *Jpn J Cancer Res*. 1994 ; 85(1) : 80-5.