

# Lipopolysaccharide로 유발된 마우스 대식세포의 염증매개성 Cytokine 생성증가에 대한 참당귀 물추출물의 효능 연구

한효상\*

중부대학교 보건행정학과

## Anti-inflammatory Effect of Angelicae Gigantis Radix Water Extract on LPS-stimulated Mouse Macrophages

Hyo-Sang Han\*

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

### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to investigate the effects of Angelicae Gigantis Radix Water Extract(AG) on the production of proinflammatory mediators in RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide(LPS).

**Method** : RAW 264.7 cells were cotreated with AG(50 and 100 ug/mL) and lipopolysaccharide(LPS; 1 ug/mL) for 24 hours. After 24 hour treatment, using Bead-based multiplex cytokine assay, concentrations of various cytokines such as interleukin(IL)-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ ), granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), interferon inducible protein-10(IP-10), leukemia inhibitory factor(LIF), lipopolysaccharide-induced chemokine(LIX), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage colony-stimulating factor(M-CSF), macrophage inflammatory protein(MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted(RANTES) and vascular endothelial growth factor(VEGF) were measured.

**Result** : AG significantly inhibited LPS-induced production of TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , G-CSF, RANTES, IL-10, and M-CSF from LPS-stimulated RAW 264.7 cells at the concentrations of 50 and 100 ug/mL. AG significantly inhibited LPS-induced production of MIP-1 $\beta$ , MIP-2, GM-CSF, and IL-6 from LPS-stimulated RAW 264.7 cells at the concentrations of 50 ug/mL. AG significantly inhibited LPS-induced production of VEGF from LPS-stimulated RAW 264.7 cells at the concentrations of 100 ug/mL. But AG did not show any significant effect on the production of MCP-1, LIF, LIX, IP-10 and IL-1 $\beta$  from LPS-induced RAW 264.7 cells.

**Conclusion** : These results suggest that AG has anti-inflammatory effect related with its inhibition of proinflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , G-CSF, RANTES, IL-10, MIP-1 $\beta$ , MIP-2, GM-CSF, IL-6, VEGF and M-CSF in LPS-induced macrophages.

**Key words** : Angelica gigantis Radix, Water Extract, macrophage, lipopolysaccharide, anti-inflammation, cytokine

### 서론

최근 면역 매개물질인 사이토카인(cytokine)의 염증 및 면역반응 조절기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있고 한약을 대상으로 한 항염연구에 대한 보고도 많이 이루어지고 있다.

여러 가지 사이토카인 중 패혈증과 관련되는 것은 인터루킨-6, 종양괴사인자 등이며, 폐렴이나 천식 등은 케모카인이 관여되며, 염증성 혈관신생은 성장인자들과 관련된다.

한의학에서 많이 사용되고 있는 참당귀 또한 염증질환치료에도 많이 응용되고 있으므로, 대식세포(macrophage)에서 분

\*교신저자 : 한효상, 충남 금산군 추부면 대학로 201, 중부대학교 보건행정학과

· Tel : 041-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

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

비되는 염증매개인자들(proinflammatory mediators)에 대한 참당귀의 항염 효과를 충분히 검토할 필요가 있다고 사료된다.

當歸는 『神農本草經』<sup>1)</sup> 中品에 “味甘溫。主咳逆上氣。溫瘡寒熱洗洗在皮膚中。婦人漏下絕子。諸惡瘡瘍。金瘡。煮飲之。”라고 처음 收載된 이후, 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능이 있어 月經不調, 經閉腹痛, 癥瘕結聚, 崩漏, 血虛頭痛, 眩暈, 痿痺, 腸燥便難, 癰疽瘡瘍, 跌打損傷을 치료하는 약물로 사용되어 왔다<sup>2)</sup>.

현재 한국, 중국, 일본 3국에서 사용하는 당귀는 그 기원 식물이 각각 달라 한국에서는 참당귀 *Angelica gigas* Nakai(산형과 Umbelliferae), 중국에서는 *A. sinensis* (Oliv.) Diels를, 일본에서는 大和當歸 *A. acutiloba* Kitag.의 根을 자국의 약전에 규정하고 있는 실정이며 당귀의 기원에 따른 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>.

當歸의 성분으로 Coumarin 유도체로서 decursinol이 참당귀의 주성분으로 분리되어 있고, 기타 7-de-methyl-suberosine, umbelliferone, isoimperatorin, xanthyletin, nodakenin 등이 알려져 있다<sup>3)</sup>. 이외에도 참당귀 정유는  $\beta$ -eudesmol이 9.49%,  $\alpha$ -pinene이 9.47%, limonene이 3.16%, elemol이 1.47%의 조성을 이루고 있다<sup>4)</sup>.

참당귀의 약리작용에 대해서 박 등<sup>5)</sup>은 당뇨 개선 효과를, 함 등<sup>6)</sup>은 항암 및 혈압 조절 효능을, 허 등<sup>7)</sup>은 항산화 효과를, 이 등<sup>8)</sup>은 항미생물 효과를 보고하였다. 또한 안 등<sup>9)</sup>은 면역증강효능을, 박 등<sup>10)</sup>은 미백효과를, 김 등<sup>11)</sup>은 심혈관 질환의 개선과 치료 효과를, 신 등<sup>12)</sup>은 간효소 억제효과를, 김 등<sup>13)</sup>은 퇴행성신경질환에서 신경보호 효능을 보고하였다.

이에 저자는 참당귀의 항염 효과에 대하여 알아보기 위하여 참당귀를 열수추출하여 얻은 시료(AG)를 대상으로 lipopolysaccharide (LPS; 지질다당체)로 유발된 RAW 264.7 cells의 인터루킨(interleukin; IL), 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ), 성장인자(growth factor), 케모카인(chemokine) 등의 사이토카인(cytokine) 생성증가에 대한 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 참당귀(*Angelica gigantis* Radix; *Angelica gigas*의 뿌리)는 한국 대구의 옴니허브 주식회사로부터 2012년 5월에 구입(NO; 2012-0507)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

#### 2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 마우스 복강 대식세포(mouse macrophage line)인 Raw 264.7 cells로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Dulbecco's modied essential medium(DMEM, Sigma, USA), penicillin(Sigma, USA), streptomycin(Sigma, USA), FBS(Sigma, USA), Multiplex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 deep freezer(Ilshin Lab Co, Korea), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(In-Tron biotech., Korea), ice-maker(Vision Scientific Co, Korea), 원심분리기(Hanil, Korea), 세포배양기(NUAIRE, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), Bio-Plex 200(Bio-Rad, USA), 생물현미경(Olympus, Japan), fume hood(Hanil, Korea), 무균작업대(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner(Branson, USA) 등이다.

## 2. 방법

### 1) 참당귀 열수추출물 제조

참당귀 50 g을 정확하게 중량을 측정된 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 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 21.2 g을 얻었으며, 수율은 42.4 %였다.

### 2) 세포 배양

RAW 264.7 cells는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL, streptomycin(100 ug/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 세포배양기에서 배양되었다. Raw 264.7 cells를 75 cm<sup>2</sup> 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-EDTA용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin용액을 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 세포배양기에서 배양하였다.

### 3) 사이토카인(Cytokine) 분비 측정

사이토카인 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Politch 등<sup>14)</sup>을 참조하여 Bio-Plex Cytokine Assay를 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/mL의 cell을 100 uL씩 넣고 세포배양기에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS 1 ug/mL를 단독 혹은 다양한 농도의 시료와 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 결합시켰다. 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150 uL의 wash buffer로 세척하였다. 세척이 끝난 뒤 각 well에

detection antibody를 추가한 후 30 분간 배양하였고, 배양이 끝난뒤 wash buffer로 3 회 세척하고 각 well에 streptavidin-PE를 분주한 뒤 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30 분간 진동배양(shaking)하였다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3 회 세척한 뒤 각 well에 120 uL의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5 분간 진동배양(shaking)한 후 Bio-Plex array reader(Bio-Plex 200)을 이용, 측정하고자 하는 사이토카인(cytokine)의 양을 조사, 비교하였다. 조사된 사이토카인(cytokine)들은 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), interferon inducible protein-10(IP-10), leukemia inhibitory factor(LIF), lipopolysaccharide-induced chemokine(LIX), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage colony-stimulating factor(M-CSF), macrophage inflammatory protein(MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted(RANTES), vascular endothelial growth factor(VEGF) 등이다.

### 3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 mean $\pm$ SD로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 student's t-test로 분석하여 P-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. TNF- $\alpha$ 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 모두 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

### 2. MIP-1 $\alpha$ 의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 모두 LPS에 의한 MIP-1 $\alpha$  생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

### 3. G-CSF의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 모두 LPS에 의한 G-CSF 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

### 4. RANTES의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 모두 LPS에 의한 RANTES 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

### 5. M-CSF의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 모두 LPS에 의한 M-CSF 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

### 6. VEGF의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

### 7. MIP-1 $\beta$ 의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 MIP-1 $\beta$  생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

### 8. MIP-2의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 MIP-2 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

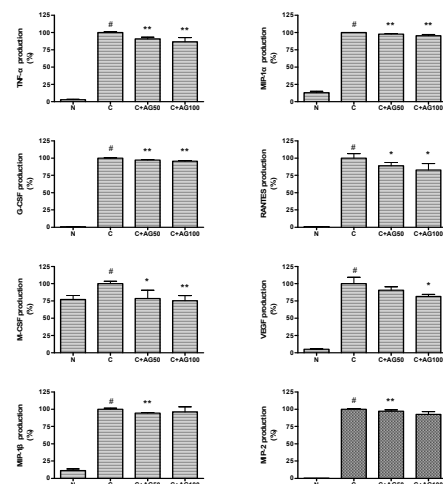


Fig. 1. Effects of AG on cytokine production (TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , G-CSF, RANTES, M-CSF, VEGF, MIP-1 $\beta$ , MIP-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells measured by Multiplex bead-based cytokine assay after 24 h incubation. Normal group (N) was treated with media only. Control group (C) was treated with LPS (1 ug/mL) only. C+AG50 group was cotreated with LPS and 50 ug/mL of Angelicae Gigantis Radix water extract. C+AG100 group was cotreated with LPS and 100 ug/mL of Angelicae Gigantis Radix water extract. Values are the mean  $\pm$  SD of more than three independent experiments. #  $P < 0.05$  vs. Normal, \*  $P < 0.05$  vs. Control, \*\*  $P < 0.01$  vs. Control.

## 9. GM-CSF의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 GM-CSF 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

## 10. IL-6의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

## 11. IL-10의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-10 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 2, ).

## 12. MCP-1, LIF, LIX, IP-10, IL-1 $\beta$ 의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)에 의해서 유발된 RAW 264.7 cells의 MCP-1, LIF, LIX, IP-10, IL-1 $\beta$ 의 생성증가에 대해서 AG는 별다른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2).

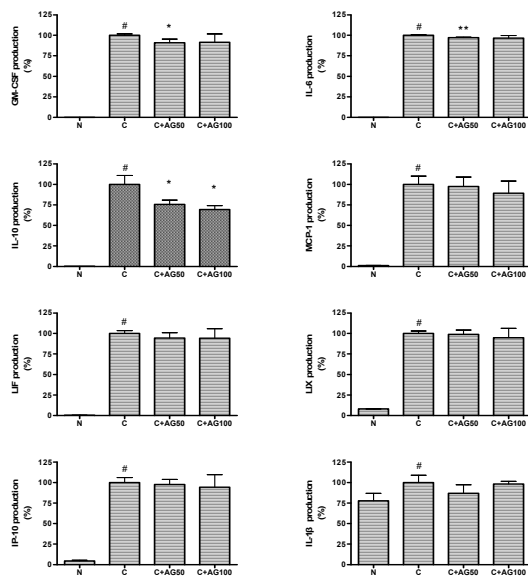


Fig. 2. Effects of AG on cytokine production (GM-CSF, IL-6, IL-10, MCP-1, LIF, LIX, IP-10, IL-1 $\beta$ ) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells measured by Multiplex bead-based cytokine assay after 24 h incubation. Normal group (N) was treated with media only. Control group (C) was treated with LPS (1 ug/mL) only. C+AG50 group was cotreated with LPS and 50 ug/mL of Angelicae Gigantis Radix water extract. C+AG100 group was cotreated with LPS and 100 ug/mL of Angelicae Gigantis Radix water extract. Values are the mean  $\pm$  SD of more than three independent experiments. #  $P < 0.05$  vs. Normal. \*  $P < 0.05$  vs. Control. \*\*  $P < 0.01$  vs. Control.

## 고찰

補血藥에 속하는 當歸(Angelicae Gigantis Radix)의 기원 식물은 『대한약전』<sup>15)</sup>에 “참당귀 Angelica gigas Nakai (산형과 Umbelliferae)의 뿌리”라고 收載되었으며, 李時珍<sup>16)</sup>은 當歸라는 이름은 “古人娶妻爲嗣續也. 當歸調血爲婦人要藥, 有思夫之意, 故有當歸之名.”이라고 하였다. 性은 溫하고, 味는 甘辛하다.

참당귀의 함유성분으로는 coumarin계의 decursin, decursinol angelate 와 nodakentin, umbelliferon,  $\beta$ -sitosterol 등이 알려져 있다<sup>17)</sup>. 약리작용으로는 최근에 파골세포 형성 저해효과<sup>18)</sup>, 베타아밀로이드에 의한 기억력 장애에 대한 보호효과<sup>19)</sup>, 뇌경색보호효과<sup>20)</sup> 등이 보고되었다.

염증의 반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 관계없이 아주 유사한 변화를 보이는데 이런 현상은 조직 손상 직후에 일어나는 변화로 손상에 의하여 생체 내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정하게 하며, 염증의 반응을 증가하는 물질인 화학적 매개체로는 프로스타글란딘(prostaglandin, PG), 산화질소(nitric oxide, NO), 염증을 유발하는 여러 가지 사이토카인(cytokine) 등이 있다<sup>21)</sup>. 또한 염증반응을 유도하는 주요한 화학 전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(serotonin, histamine 등)와 kinin류(bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 사이토카인(cytokine)류 등으로 분류 할 수 있다<sup>22)</sup>.

LPS는 그람음성 박테리아에서 유래하는 내독소(endotoxin)의 일종으로 대식세포(macrophage) 등의 면역세포를 자극하여 일산화질소(nitric oxide, NO)와 사이토카인(cytokine) 등 각종의 전염증성인자들(proinflammatory mediators)의 생성증가를 유도하며<sup>23)</sup>, 면역세포 특히 대식세포(macrophage)로 하여금 염증 촉발 물질의 급격한 생성증가를 유발한다<sup>24)</sup>.

본 연구에서는 참당귀의 항염 효과를 알아보기 위해, 참당귀를 열수 추출하여 제조한 시료(AG)를 대상으로 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 interleukin(IL)-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), interferon inducible protein-10(IP-10) leukemia inhibitory factor(LIF), lipopolysaccharide-induced chemokine(LIX), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage colony-stimulating factor(M-CSF), macrophage inflammatory protein(MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted(RANTES), vascular endothelial growth factor(VEGF) 등의 사이토카인(cytokine) 생성 증가를 유발하고, 이에 대한 참당귀 물추출물(AG)의 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 본 연구진은 AG가 100 ug/mL의 농도까지 마우스 대식세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않음을 확인하고 다음 실험을 진행하였다.

TNF- $\alpha$ 는 LPS에 의해 활성화된 대식세포(macrophage), 단핵백혈구(monocyte), 비만세포(mast cell), 호중구(neutrophil), 성상세포(astrocyte), 섬유아세포(fibroblast) 등의 많은 세포에서 분비되는 사이토카인(cytokine)으로 세포성 면역반응이나 세포 성장, 분화 등에 관련되어 있다<sup>25)</sup>. AG가 LPS로 유발된

마우스 대식세포의 TNF- $\alpha$  생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성증가를 유의하게 억제시켰다.

MCP-1은 염증반응을 개시하는 중요한 요소로서 섬유아세포, 내피세포, 혈관 내 평활근세포, 단핵구, T-세포 등 염증과 관련된 여러 세포에서 분비된다고 알려져 있다<sup>26)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 MIP-1 $\alpha$  생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 MIP-1 $\alpha$  생성증가를 유의하게 억제시켰다.

G-CSF는 골수의 과립백혈구 전구세포와 줄기세포의 증식과 분화를 촉진하며<sup>27)</sup>, G-CSF-receptor는 골수의 미성숙세포에 존재하며, G-CSF에 의해 자극되면 성숙 과립구로 증식·분화하기 시작하며, 의학적으로 G-CSF는 백혈구 생성을 촉진하여 혈중 조혈모세포의 수를 증가시키고, 암환자의 chemotherapy 이후 호중구 감소 증을 회복시키는데 사용한다<sup>28)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 G-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 G-CSF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

RANTES는 호산구가 혈중에서 기도 표면으로 이동하는데 관여하는 케모카인들 중 하나로 IL-5와 함께 천식, 폐에서 호산구에 대한 주요한 화학주성인자이다<sup>29)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 RANTES 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 RANTES 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

사람의 M-CSF는 지방단백질(lipoprotein)의 일종으로 단핵구, 중성구 및 혈소판의 생산을 자극하는 조혈인자로서의 작용 외에도 혈중 콜레스테롤(cholesterol)치를 낮춰주고 태반형성, 임신유지, 단핵구의 항종양활성 증폭 등의 작용을 가지고 있다<sup>30)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 M-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 M-CSF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

VEGF는 주요한 성장인자로서 34-45 kD homodimeric glycoprotein이며 혈관 내피세포에서 발현되는 매우 특이한 유사분열 촉진인자로서<sup>31)</sup> 배아발육(embryonic development), 창상 치유, 고형종양의 성장 및 복수생성 등의 정상 및 비정상적인 과정에 주요한 역할을 한다<sup>32)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 VEGF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

MIP-1 $\beta$ 는 CC chemokine의 하나로서 면역반응과 염증반응에 있어서 작용을 하며, 특히 단핵구, T림프구, 호산구 등에 대한 화학주성작용을 하여 여러 질환에서 역할을 한다<sup>33)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 MIP-1 $\beta$  생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 MIP-1 $\beta$  생성증가를 유의하게 억제시켰다.

MIP-2는 호중구의 모집과정에서 중요한 역할을 하는 mouse C-X-C chemokine이며 MIP-2 유전자의 전사가 빠르게 LPS 대식 세포 계통의 세포 자극에 의해 유도된다<sup>34)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 MIP-2 생성증가에

미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 MIP-2 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

GM-CSF는 국소에서 작용하는 사이토카인으로 활성화된 T 세포와 단핵식세포, 혈 관내피세포, 섬유아세포 그리고 점막과 결합조직의 비만세포들이 생성하는 당단백이다. GM-CSF는 정상 과립구와 대식세포의 전구세포 분화에 필요한 성장인자일 뿐만 아니라 과립구, 단핵구 그리고 호산구의 전구세포에 작용하여 이들 세포들에 대한 성장인자 분비, 수명연장 그리고 기능향진 등을 나타낸다<sup>35)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 GM-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 GM-CSF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

IL-6는 항원, IL-4, IL-5에 의해 활성화되어 증식하는 B 임파구의 분화의 최종시기에 작용해서 분비형의 다량의 항체를 생성시킨다. 또한 T 임파구의 증식과 분화를 유도해서 혈액간세포와 형질세포를 증식시켜 간세포의 급성기단백 생성과 신경세포의 분화를 촉진하는 등의 다양한 생물활성을 나타낸다<sup>36)</sup>. AG가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

이 밖에 LPS에 의한 MCP-1, LIF, LIX, IP-10, IL-1 $\beta$ 의 사이토카인(cytokine) 생성증가는 폐손상과 같은 호흡기염증질환에 악화작용을 하는 것으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 AG가 별다른 유의성을 나타내지 않았다. Fig. 1에는 주로 인터루킨류의 결과를 표시하였고, Fig. 2에는 성장인자들의 결과를 표시하였다.

이와 같이 AG가 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포의 다양한 사이토카인(cytokine) 생성증가를 유의하게 억제함은 AG가 대식세포의 염증매개인자과잉생성으로 인한 각종의 염증성질환악화, 예를 들면 류마티스성관절염 악화<sup>37)</sup>, 폐렴 및 급성 호흡기질환의 악화<sup>38)</sup>, 자궁내막증식증(endometriosis) 유발촉진<sup>39)</sup> 등을 완화할 수 있는 항염효능이 있는 것으로 해석될 수 있다. 향후 참당귀 물추출물을 이용한 항염치료제 개발을 위하여 분자수준의 기전연구 등 더욱 세심한 연구가 요구되어지는 바이다.

## 결론

본 연구에서 참당귀를 열수추출하여 얻은 시료(AG)를 대상으로 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, IP-10, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES, VEGF 등의 사이토카인(cytokine) 생성증가에 대한 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264,7 cells를 24 시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , G-CSF, RANTES, M-CSF, IL-10의 생성증가를 50, 100 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였다.

2. LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells를 24 시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 VEGF의 생성증가를 100 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였다.
3. LPS(1 ug/mL)와 함께 AG(50 and 100 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells를 24 시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 MIP-1 $\beta$ , MIP-2, GM-CSF, IL-6의 생성증가를 50 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였다.

이상의 실험결과는 AG가 LPS에 의해 유발된 마우스 대식 세포의 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 성장인자(growth factor) 등의 염증매개물질 생성증가를 유의하게 억제함을 나타내는 것이며, 이는 AG가 염증매개물질의 증가로 인한 종창(腫脹), 통증(痛症) 등을 개선할 수 있는 염증완화제로서의 응용가능성이 있음을 나타내는 것이며, 앞으로 참당귀 물추출물의 항염효능에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

## References

1. Wu B. Shennongbencaojing. Beijing : Renminweishengchubanshe, 1982 : 64.
2. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY. Boncho-Hak. Seoul : Young-Lim Press, 2007 : 629-31.
3. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Lim JP, Hong SH, Hanbangyakrihak, Seoul : Shinilbukseu, 2007 : 337-43.
4. Chi HJ, Kim HS. Studies on Essential Oils of Plants of Angelica Genus in Korea (I) Essential Oils of Angelicae gigantis Radix. Kor J Pharmacogn, 1988 ; 19(4) : 239-47.
5. Park MJ, Kang SJ, Kim AJ. Hypoglycemic Effect of Angelica gigas Naki Extract in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. Kor J Food Nutr. 2009 ; 22(2) : 246-51.
6. Ham MS, Kim SS, Hong JS, Lee JH, Chung EK, Park YS, Lee HY. Screening and Comparison of Active Substances of Angelica gigas Nakai Produced in Kangwon and Angelica acutiloba Kitogawa Produced in Japan. Kor J Appl Microbiol Biotechnol. 1996 ; 24(5) : 624-9.
7. Heo SJ, Yang MO, Cho EJ. Analysis of Umbelliferaeaceae Wild Plants and Antioxidative Activity of Pork Meat Products Added with Wild Plants. Kor J Soc Food Cookery Sci. 2001 ; 17(5) : 456-63.
8. Lee S, Shin DS, Kim JS, Oh KB, Kang SS. Antibacterial coumarins from Angelica gigas roots. Arch Pharm Res. 2003 ; 26(6) : 449-52.
9. Ahn KS, Sim WS, Kim HM, Han SB, Kim IH. Immunostimulating Components from the Root of Angelica gigas Nakai. Kor J Pharmacogn. 1986 ; 27(3) : 254-61.
10. Park SK, Hong SK, Kim HJ, Kim BY, Kim TG, Kang JS, Kim DU. Cosmetic Effect of Angelica gigas Nakai Root Extracts. Kor Chem Eng Res. 2009 ; 47(5) : 553-7.
11. Kim GS, Park CG, Jeong TS, Cha SW, Baek NI, Song KS. ACAT(Acyl-CoA:cholesterol Acyltransferase) Inhibitory Effect and Quantification of Pyranocoumarin in Different Parts of Angelica gigas Nakai. J Appl Biol Chem. 2009 ; 52(4) : 188-94.
12. Shin KH, Han JM, Lee IR. Effect of the Constituents of Angelicae gigantis Radix on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes. Kor J Pharmacogn. 1996 ; 27(4) : 323-7.
13. Kim YO, Ha NN, Boo YM, Park SY, Park JY, Yu YB, Shin JS, An DK, Kim HC. Neuroprotective Effect of Angelica gigas Extracts on the Brain Ischemia Induced by Four-Vessel Occlusion in Rats. Kor J Herbology. 2002 ; 17(2) : 151-7.
14. 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.
15. Korea Food and Drug Administration. The Korean Herbal Pharmacopoeia. Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2012 : 26-7.
16. Chen GT. Benchogangmutongshi. Beijing : Xueyuanchubanshe, 1992 : 615-21.
17. Ahn KS, Sim WS, Kim IH. Decursin a cytotoxic agent and protein kinase c activator from the root of angelica gigas. Planta medica. 1996 ; 62(1) : 7-9.
18. Kil JS, Kim MG, Choi HM, Lim JP, Boo Y, Kim EH, Kim JB, Kim HK, Leem KH. Inhibitory effects of Angelicae Gigantis Radix on osteoclast formation. Phytother Res. 2008 ; 22(4) : 472-6.
19. An JJ, Kim DH, Moon YS, Jung JS, Ahn EM, Baek NI, Song DK. Protection against beta-amyloid peptideinduced memory impairment with long-term administration of extract of Angelica gigas or decursinol in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2004 ; 28(1) : 25-30.
20. Kang SY, Kim YC. Neuroprotective coumarins from the root of Angelica gigas Structure-activity relationships. Arch Pharm Res. 2007 ; 30(11) : 1368-73.
21. Daehanbyeongrihakhoe. Byeongrihak. Seoul : Komoonsa, 1995 : 71-104.

22. Moon TC, Chung KC, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW. Screening of Cyclooxygenase-2(COX-2) Inhibitors from Natural Products. *Yakhak Hoeji*. 1998 ; 42(2) : 214-9.
23. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 ; 420(6917) : 885-91.
24. Cho HY, Noh KH, Cho MK, Jang JH, Lee MO, Kim SH, Song YS. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of Genistein in BALB/c Mice Injected with LPS. *J Kor Soc Food Sci Nutr*. 2008 ; 37(9) : 1126-35.
25. Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem*. 1988 ; 57 : 505-18.
26. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1 $\alpha$  key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 ; 41(5) : 998-1001.
27. Metcalf D, Nicola NA. Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. *J Cell Physiol*. 1983 ; 116(2) : 198-206.
28. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Tamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, Ono M. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*. 1986 ; 319(6052) : 415-8.
29. Teran LM, Davies DE. The chemokines: their potential role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 1996 ; 26(9) : 1005-19.
30. Bartocci A, Pollard JW, Stanley ER. Regulation of colony-stimulating Factor 1 during pregnancy. *J Exp Med*. 1986 ; 164(3) : 956-61.
31. 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.
32. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 ; 219(4587) : 983-5.
33. Lee KS, Kim YS, Lee HN, O YJ, Shin SS, park KJ, Hwang SC. Interstitial lung disease, the significance of Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$ . The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases Fall Conference abstracts published. 2006 ; 103 : 77.
34. Kim DS, Han JH, Kwon HJ.. NF-kappaB and c-Jun-dependent regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression in response to lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. *Mol Immunol*. 2003 ; 40(9) : 633-43.
35. Han DH, Kwak MG, Choi BH, Ha Y, Park HS, Min BH, Woo ZH, Park SR. Effects of GM-CSF on the Mobilization of Bone Marrow Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2005 ; 2(3) : 274-9.
36. Nacajima yizeumi, Myeonyeokhakiymoon, Seoul : Jigumoonhwasa. 1997 : 126-7.
37. Jana M, Dasgupta S, Saha RN, Liu X, Pahan K. Induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. *J Neurochemistry*. 2003 ; 86 : 519-28.
38. Srivastava M, Jung S, Wilhelm J, Fink L, Bühling F, Welte T, Bohle RM, Seeger W, Lohmeyer J, Maus UA. The inflammatory versus constitutive trafficking of mononuclear phagocytes into the alveolar space of mice is associated with drastic changes in their gene expression profiles. *J Immunol*. 2005 ; 175(3): 1884-93.
39. Kyama CM, Mihalyi A, Simsa P, Mwenda JM, Tomassetti C, Meuleman C, D'Hooghe TM. Non-steroidal targets in the diagnosis and treatment of endometriosis. *Curr Med Chem*. 2008 ; 15(10) : 1006-17.