

LPS로 유도된 마우스 복강 대식세포에서 甘遂추출물의 염증억제 효과

김정범* · 경혁수 · 강 희¹

세명대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 경희대학교 동서의학대학원 동서의과학과

Anti-inflammatory Effect of *Euphorbiae kansui* Radix Extract in Lipopolysaccharide-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages

Jeung Beum Kim*, Hyuk Su Kyung, Hee Kang¹

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Semyung University,

1: Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medicine, KyungHee University

This study is aimed to investigate the anti-inflammatory effect of *Euphorbiae kansui* radix methanol extract (ERE) in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were obtained from thioglycollate-injected Balb/c mice. Cells were stimulated with LPS or LPS plus interferon-gamma (IFN- γ) in the presence of ERE and various inflammatory markers were assayed. Finally, LPS-induced signaling molecules were measured. ERE up to 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was not cytotoxic to ERE inhibited LPS/IFN- γ -induced nitric oxide (NO), inducible NO synthase. ERE also reduced the levels of cyclooxygenase-2 and the proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α , interleukin(IL)-6 and IL-12. The inhibitory effect of ERE on LPS-induced I κ B α degradation was weak but phosphorylation of JNK, p38 and ERK1/2 was strongly suppressed. Our data indicated that the anti-inflammatory effect of ERE in LPS-stimulated macrophages was partly mediated by its inhibition of JNK, p38 and ERK1/2.

keywords : *Euphorbiae kansui* radix, anti-inflammatory effect, macrophages, lipopolysaccharide

서 론

염증(inflammation)이란 생체 조직이 손상에 대해 반응하는 능동적인 과정이다. 이 과정은 특히 혈관과 결합조직이 관여하며 급성, 아급성, 만성으로 구분된다¹⁾. 염증은 해로운 병인들을 희석시키고, 파괴하고 또는 중화시켜 보호 임무를 달성하며 급성 염증은 해로운 자극을 제거하며 반응을 감소시키고 손상된 조직을 수복하지만, 손상이 지속되면 만성 염증으로 진행된다^{2,3)}.

대식세포(macrophage)는 감염된 조직에서 미생물을 제거하거나 노화된 세포들을 제거하는 역할을 함으로써 인체 방어 역할을 감당한다. 또한 lipopolysaccharide(LPS)나 interferon(IFN)- γ 등에 의해 활성화되는데, 그 활성화되는 정도가 지나치면 염증을 유발하기도 한다^{4,5)}. LPS는 대식세포를 활성화시키는 요소로서 인체에서는 내독소(endotoxin)로 작용하며, 주로 Gram 음성균에 존재하는 외막을 형성하는 거대 분자이며⁶⁾ 외인성 발열원(exogenous pyrogen)의 일종이다⁷⁾.

염증 반응에서는 다양한 염증매개물질이 관여하는데, 대식세포가 만들어내는 nitric acid(NO)는 염증이거나 자가면역 등의 반응에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. iNOS는 염증성 질환이 있는 환자의 국소 염증반응을 하향시키는 방어에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되었다⁹⁾. cyclooxygenase-2(COX-2)는 염증반응 과정에서 발현되는 유도성 효소이며¹⁰⁾, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), IL-12는 사이토카인에 속한 염증과 면역반응의 중요한 매개물질이다¹¹⁾. 이러한 사이토카인의 유전자 발현은 NF- κ B와 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)와 같은 단백질이 관여한다. NF- κ B가 활성화하기 위해서는 I κ B α 가 분해되어야 하며⁵⁾ MAP kinase는 여러 전사인자들의 인산화를 일으킨다. MAP kinase에 속하는 대표적인 단백질은 extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38, c-Jun N-Terminal kinase(JNK) 등이 있으며, 다양한 염증성 매개물질을 생산하거나 세포 소멸에 관여하는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

韓醫學에서는 염증에 대해서『靈樞·癰疽篇』에서 “營氣가 경맥

* Corresponding author

Jeung Beum Kim, Department of Korean Pathology, College of Korean Medicine, Semyung University, 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

E-mail : omdkjb@naver.com · Tel : +82-43-649-1342

Received : 2014/04/21 · Revised : 2014/06/17 · Accepted : 2014/07/01

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.17208/kjopp.2014.12.28.6.593>

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

속에 머물러 있으면 營血이 응체되어 순행하지 못하고 순행하지 못하면 衛氣가 이를 따라 통하지 않으니, (衛氣가) 막혀 순행할 수 없으므로 熱이 난다. 심한 熱이 멎지 않으면서 熱이 왕성하면 肌肉이 腐爛되고 肌肉이 腐爛되면 化膿된다¹³⁾고 하여 營氣와 衛氣의 不通을 염증의 기전으로 제시하고 있다.

甘遂는 峻下逐水藥의 일종으로서 瀉水逐飲, 消腫散結하는 작용이 있어 水腫脹滿, 胸腹積水, 痰飲積聚, 氣逆咳喘, 二便不利, 濕熱腫毒등을 치료하는 약이다¹⁴⁾. 비교적 寒性이 맹렬하고 有毒하여 임상에서 다용되는 약제는 아니다. 주로 흉수나 복수 등에 사용되며, 간경화나 삼출성 늑막염, 신염으로 인한 水腫 등에 사용한다¹⁵⁾. 甘遂에 대한 연구는 많지 않은 편인데 임상적인 연구로는 홍¹⁶⁾이 발표한 연구가 있으며, 실험적인 연구로는 주로 甘遂의 성분분석^{17,18)}이나 독성 연구¹⁹⁻²¹⁾가 있다. 항염 효과에 대해서Chang등²²⁾은 甘遂가 IL-6에 미치는 영향을 관찰하였으나, 염증에 대한 종합적인 고찰이 없었고, Li 등²³⁾은 甘遂의 항보체계 활동을 중심으로 연구하여 항염증효과가 있음을 관찰하였다.

저자는 임상에서 甘遂의 항염증 효과를 경험한 바 있어 실험을 통해 검증해 보고자 마우스 대식세포를 분리하여 甘遂추출물(Euphorbiae kansui radix methanol extract:ERE)을 투여한 세포 생존률, NO, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-12, I κ B α , JNK, p38, ERK를 측정된 결과 다수의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 약제 추출

본 실험에서 사용된 甘遂의 원산지는 중국산이다. 甘遂를 분쇄한 후 100% 메탄올을 용매로 하여 3시간씩 2회 환류냉각장치를 이용하여 열탕추출을 하였다. 추출액을 감압농축기로 농축한 후에 여과액을 동결건조하였다(수율 13.02 %). 세포실험에 사용된 甘遂 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma, USA)에 녹인 후 0.5 μ m hydrophobic syringe filter(Advantec, Japan)를 이용하여 여과한 후 사용하였다.

2. 실험 동물

생후 8주령의 Balb/c 수컷 마우스(샘타코, 한국)를 항온항습이 유지되는 사육실에서 일주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사료는 방사선 처리가 된 실험동물용 사료(샘타코)를 구입하여 사용하였고 사료와 음용수는 제한없이 공급하였다. 본 연구에 사용된 동물실험 프로토콜은 ○○대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다(KHUASP (GC)-10-001).

3. 복강대식세포 배양

Balb/c 마우스의 복강에 2 mL의 thioglycollate medium(BD, USA)를 주사하고 3일 후에 마우스를 경추탈골한 후 복강에서 8mL의 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(GenDEPOT, USA)을 주사하여 세포를 수집하였다. 원심분리 후 10% fetal bovine serum(FBS)(GenDEPOT)과 1% penicillin-streptomycin(GenDEPOT)이 함유된 DMEM에 suspension한 후 2시간 동안 3

7°C, 5% CO₂인큐베이터에 배양하였다. Non-adherent cell을 제거한 후 세포 실험에 사용하였다.

4. 세포 생존률 측정

甘遂추출물의 대식세포에 대한 생존율을 MTT 방법을 이용하여 formazan으로 환원하는 세포내 효소활성을 통해 간접적으로 측정하였다. 세포를 4 \times 10⁵ cells/mL의 농도로 96 well plate에 0.1 mL 접종하고 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후에 약제 추출물을 농도별(0, 2, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/mL)로 처리하였다. 24시간 후 5 mg/mL MTT 용액(AMRESCO, USA)을 0.01 mL씩 첨가하여 4시간 반응시킨 후 상등액을 제거하고 0.1 mL DMSO를 가하였다. 96 well microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. NO 측정

2 \times 10⁶ cells/mL의 농도로 세포를 6 well plate에 접종한 후 2 ng/mL IFN- γ (BD Pharmingen, USA)와 100 ng/mL LPS(Sigma)를 처리하였다. 동시에 甘遂추출물을 농도별로 처리하고 24시간 후에 상등액을 회수하였다. 상등액 0.05 mL와 동량의 Griess reagent(Sigma)를 더하여 상온에 15분간 반응한 후 96 well microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

6. iNOS 단백질 분석

iNOS 단백질 분석은 Western blot 분석법으로 수행하였다. 먼저 2 \times 10⁶ cells/mL의 농도로 마우스 복강 대식세포를 6 well plate에 접종한 후 2 ng/mL IFN- γ 과 100 ng/mL LPS를 甘遂추출물과 동시에 처리하고 24 시간 후에 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 cold PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 첨가한 lysis solution {50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM NaF, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100}으로 파괴한 후 Bradford 방법에 준하여 단백질 농도를 정량하였다. SDS sample buffer를 넣고 3분간 boiling한 후에 8% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 단백질을 분리하였다. 젤은 polyvinylidene fluoride membrane으로 transfer하였으며 transfer가 제대로 되었는지를 확인하기 위해 ponceau S staining을 실시하였다. 5% skim milk가 함유된 0.1% Tween in Tris-buffered saline (TBST)으로 membrane을 상온에서 한 시간 blocking한 후 anti-iNOS antibody(BD Pharmingen)와 tubulin(Santa Cruz, USA)을 blocking buffer에 1:1000으로 희석하여 4°C에 overnight 반응시켰다. TBST로 세척 후 1:5000으로 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit antibody, HRP-conjugated anti-mouse antibody로 상온에서 한 시간 반응시켰다. TBST로 세척한 후 chemiluminescent substrate (ECL, GE healthcare, UK)로 밴드를 확인하였다.

7. COX-2 측정

1 \times 10⁶ cells/mL의 농도로 2.0 mL의 세포를 6 well plate에 접종한 후 시료와 LPS 100 ng/mL을 처리하였다. 24 시간 지나서 세포

를 회수하여 iNOS 측정과 같은 방법으로 Western blot 분석법을 수행하되 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하였다. Internal control로 GAPDH를 사용하였다.

8. TNF- α , IL-6, IL-12 분석

2 \times 10⁶ cells/ml의 농도로 세포를 6 well plate에 접종한 후 100 ng/ml LPS를 처리하였다. 동시에 감초추출물을 처리하고 24 시간 후에 상등액을 회수하였으며 상등액의 TNF- α , IL-6, IL-12는 ELISA 방법으로 분석하였다. 제조사(OptEIA, mouse IFN- γ , IL-6, IL-12 ELISA, BD Pharmingen)의 protocol에 따라 수행하였다. 각각의 capture antibody를 phosphate buffered saline (PBS)에 희석하여 96 well immunoplate에 0.1 ml씩 분주한 후 상온에서 overnight 반응하였다. 각 well을 세척용 완충용액(0.5% Tween/PBS)으로 세척한 후 시료와 스탠더드 사이토카인을 blocking buffer(10% FBS가 함유된 PBS)에 희석하여 well 당 0.2 ml 넣고 2시간 동안 상온에 두어 반응하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 5회 세척한 후 biotin이 결합된 2차 항체와 Streptavidin-HRP를 blocking buffer에 희석하여 well 당 0.1 ml씩 처리하여 1 시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척 후에 TMB (BD Pharmingen) 용액을 well 당 0.1 ml 씩 처리한 후 30분 동안 상온에서 반응하였다. 반응을 정지시키기 위해 2N H₂SO₄ 용액을 well 당 0.05 ml씩 첨가하였고, 570 nm에서 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 시료의 농도는 표준 사이토카인 농도와 흡광도에 의해 산출된 공식을 통해 결정되었다.

9. 신호전달 단백질 분석

신호전달에 관여하는 단백질 분석을 위해서는 세포를 2 \times 10⁶ cells/ml의 농도로 세포를 6 well plate에 2 ml씩 접종하고 감초추출물을 농도별로 30분 전처리한 후에 100 ng/ml LPS로 30분간 자극하였다. 세포를 회수한 후 protease inhibitor cocktail과 phosphatase inhibitor (Sigma)를 더한 lysis buffer (조성은 iNOS 단백질 분석에 기술됨)를 이용하여 세포를 파괴하였다. 이후에는 iNOS 단백질 분석과 동일한 Western blot 분석법으로 수행하되 10% SDS-PAGE를 이용하였다. 사용한 일차 항체는 anti-I κ B α (Santa Cruz), anti-phospho-p38, anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK/SAPK (Cell Signaling Technology, USA)이며 1:1000으로 희석하여 4°C에 overnight 반응시켰다.

10. 통계처리

모든 결과는 평균 \pm 표준편차(Mean \pm S.D.)로 표현하였으며 SPSS 20.0 버전을 이용하여 군간의 평균차이는 non-paired Student's t-test나 ANOVA를 이용하였으며 후자의 방법을 사용했을 때는 Dunnet's test로 사후 분석하였다. P 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 감수 추출물의 세포독성에 미치는 영향

마우스 복강에서 분리한 대식세포를 이용하여 감초추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 후에 MTT 방법을 이용하여 세포 생존율을 관찰하였다. 실험 결과 최고 농도인 400 μ g/ml까지 세포독성은 관찰되지 않았으며 400 μ g/ml에서는 흡광도가 증가하였다(Fig. 1).

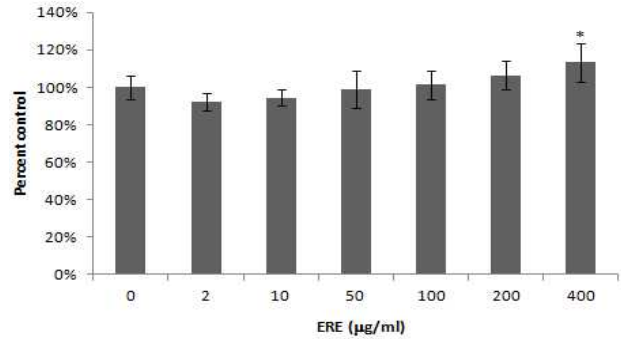


Fig. 1. Effect of ERE on cell viability. Mouse peritoneal macrophages were treated with varying concentrations of ERE for 24 hours. Cell viability was measured by the MTT assay. Data are presented as mean \pm SD (n=6). * : P<0.05 compared with control cells (0 μ g/ml)

2. 활성화된 대식세포의 NO 분비에 대한 감수의 영향

세포가 배지로 분비한 NO는 반감기가 짧기 때문에 다른 대사 산물인 nitrite의 양을 대신 측정하였다. Nitrite 양은 LPS와 IFN- γ 만 처리한 세포에 비해 10 μ g/ml에서 200 μ g/ml 농도의 감초를 처리한 실험군에서는 약 20 %의 감소를 보였고, 400 μ g/ml의 농도에서는 약 37%의 감소를 보였으며, 모두 통계적으로 유의성이 있었다(Fig. 2).

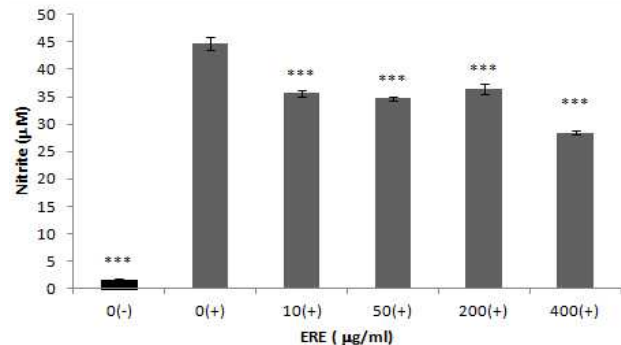


Fig. 2. Effect of ERE on LPS/IFN- γ -stimulated NO production. Mouse peritoneal macrophages were stimulated with 2 ng/ml IFN- γ plus 100 ng/ml LPS and ERE was treated as indicated for 24 hours. At the end of the incubation, the culture medium was collected for nitrite assay. Data represent mean \pm S.D. (+) refers to the addition of LPS and IFN- γ . *** : P<0.001 vs. cells treated with LPS/IFN- γ only (0 μ g/ml).

3. 감수의 활성화된 대식세포의 iNOS 단백질 합성에 미치는 영향

감초추출물이 LPS/IFN- γ 에 의한 iNOS 단백질 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 Western blot 분석법을 수행한 결과 자극을 하지 않은 세포에서는 iNOS가 거의 발현되지 않았으나 LPS와 IFN- γ 로 활성화한 대식세포에서는 강하게 발현되었다(Fig. 3). 감수추출물은 농도의존적으로 억제하였으며 200, 400 μ g/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS 단백질 합성이 강하게 억제되었다.

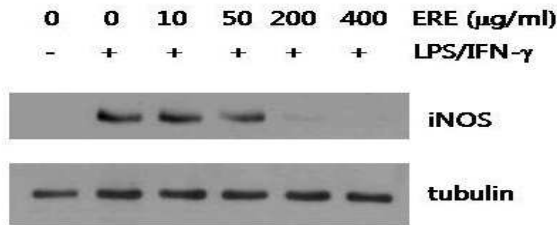


Fig. 3. Effect of ERE on LPS/IFN- γ -stimulated iNOS synthesis. Mouse peritoneal macrophages (2×10^6 cells) were stimulated with 100 ng/ml LPS plus 2 ng/ml IFN- γ in the presence of ERE for 24 hours. Total protein was extracted and subjected to Western blot analysis. tubulin was used as an internal control.

4. 감수의 대식세포 COX-2 발현에 미치는 영향

간遂추출물이 LPS 자극에 의한 COX-2 단백질 합성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Western blot 분석법으로 측정하였다. 실험 결과 자극을 하지 않은 세포에서는 COX-2가 거의 발현되지 않았으나 LPS를 처리한 대식세포는 강하게 발현되었다(Fig. 4). 간遂추출물을 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 실험군에서는 대조군보다 COX-2 합성이 더 증가하였으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소하였고 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 강하게 억제되었다.

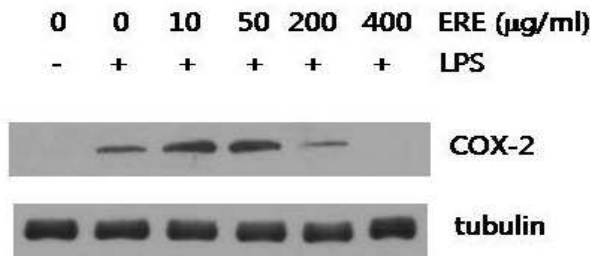


Fig. 4. Effect of ERE on LPS-stimulated COX-2 synthesis. Mouse peritoneal macrophages (2×10^6 cells) were stimulated with 100 ng/ml LPS in the presence of ERE for 24 hours. Total protein was extracted and subjected to Western blot analysis. tubulin was used as an internal control.

5. 감수의 대식세포 TNF- α 분비에 미치는 영향

간遂추출물이 LPS로 자극한 대식세포의 TNF- α 분비를 ELISA 분석법으로 측정된 결과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 간遂추출물을 처리한 경우 대조군에 비해 약 31% TNF- α 분비가 억제되었고, 50과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 간遂추출물에 의해 각각 40%의 TNF- α 분비가 억제되었으며 최고 농도인 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 간遂추출물에 의해서는 약 31.6%의 감소를 보였다(Fig. 5).

6. 감수의 대식세포 IL-6 분비에 미치는 영향

대식세포를 분리하여 LPS로 자극한 세포가 분비한 IL-6을 ELISA 분석법으로 측정된 결과 농도의존적으로 억제되어 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 간遂추출물을 처리한 실험군에서는 43% IL-6의 분비가 억제되었고, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 간遂추출물을 처리한 실험군에서는 93%의 억제를 보였다(Fig. 6).

7. 감수의 대식세포 IL-12 분비에 미치는 영향

대식세포를 LPS로 자극하고 간遂추출물을 농도별로 처리한

후 24시간 동안 배양하였다. 상등액에 함유된 IL-12 농도를 ELISA 분석법으로 측정된 결과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 간遂추출물을 처리한 실험군에서부터 농도의존적으로 IL-12를 억제함을 알 수 있었고 최고 농도인 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 간遂추출물을 처리한 실험군에서는 95%나 억제되었다(Fig. 7).

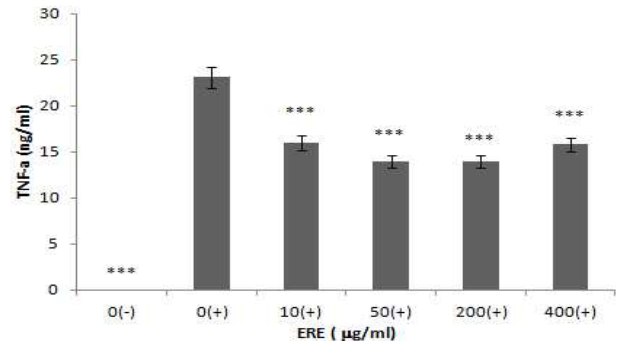


Fig. 5. Effect of ERE on LPS-stimulated TNF- α release. Mouse peritoneal macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS in the presence of ERE for 24 hours. At the end of the incubation, the culture medium was collected and the levels of TNF- α were measured using the ELISA method. Data represent mean \pm SD. (+): LPS treatment. *** : $P < 0.001$ vs. cells treated with LPS only (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

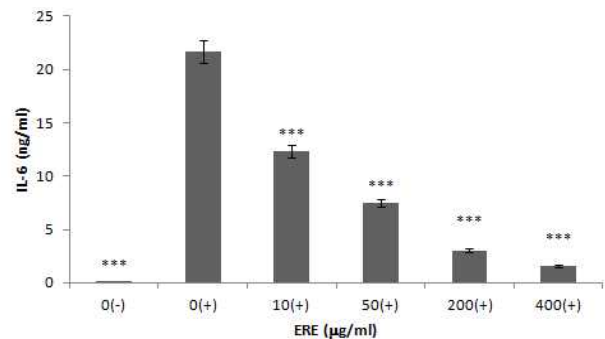


Fig. 6. Effect of ERE on LPS-stimulated IL-6 release. Mouse peritoneal macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS in the presence of ERE for 24 hours. At the end of the incubation, the culture medium was collected and the levels of IL-6 were measured using the ELISA method. Data represent mean \pm SD. (+): LPS treatment. *** : $P < 0.001$ vs. cells treated with LPS only (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

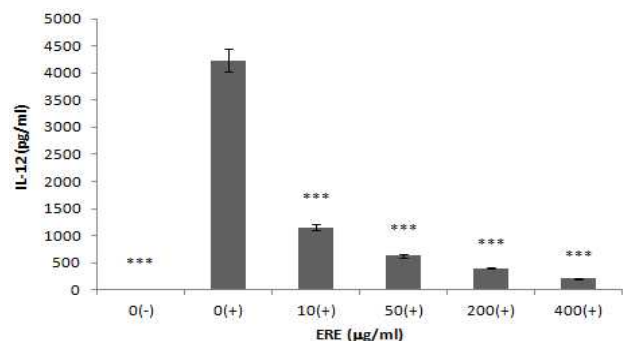


Fig. 7. Effect of ERE on LPS-stimulated IL-12 release. Mouse peritoneal macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS in the presence of ERE for 24 hours. At the end of the incubation, the culture medium was collected and the levels of IL-12 were measured using the ELISA method. Data represent mean \pm SD. (+): LPS treatment. *** : $P < 0.001$ vs. cells treated with LPS only (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

8. 감수가 활성화된 대식세포의 IκBα 분해에 미치는 영향

甘遂 추출물이 IκBα 분해에 미치는 영향을 확인하기 위해 대식세포에 50, 200, 400 μg/ml의 농도로 甘遂추출물을 30분간 전처리한 후에 LPS로 30 분간 자극하였다. 세포를 회수하여 Western blot 분석법으로 측정된 결과 LPS만 넣은 세포는 IκBα가 완전히 분해되었으며 甘遂 추출물을 처리한 세포에서는 IκBα 분해가 약하게 억제되었다(Fig. 8).

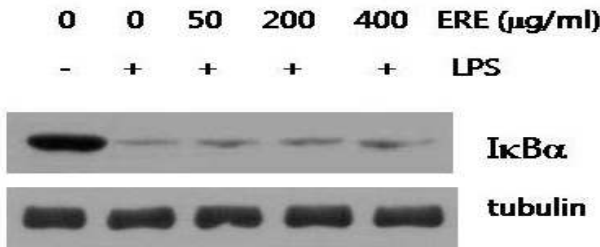


Fig. 8. Effect of ERE on LPS-stimulated IκBα degradation. Mouse peritoneal macrophages (3×10⁶ cells) were pre-treated with ERE for 30 min followed by stimulation with LPS (100 ng/ml). The whole cell protein was extracted and subjected to Western blot analysis. tubulin was used as an internal control.

9. 감수가 활성화된 대식세포의 JNK, p38, ERK 활성화에 미치는 영향

甘遂 추출물이 LPS의 자극으로 인한 MAPK활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 대식세포에 50, 200, 400 μg/ml의 농도로 甘遂추출물을 30분간 전처리한 후에 LPS를 30 분간 자극하였다. 세포를 회수하여 Western blot 분석법으로 분석한 결과 LPS만 넣은 세포에서는 JNK, p38, ERK의 인산화가 나타났다(Fig. 9). JNK 인산화의 경우 모든 농도에서 甘遂 추출물을 처리한 실험군에서 완전히 억제되었고, p38의 인산화는 400 μg/ml의 甘遂추출물을 처리한 실험군에서 억제되었다. ERK 활성화도 JNK와 마찬가지로 모든 농도에서 억제되었다.

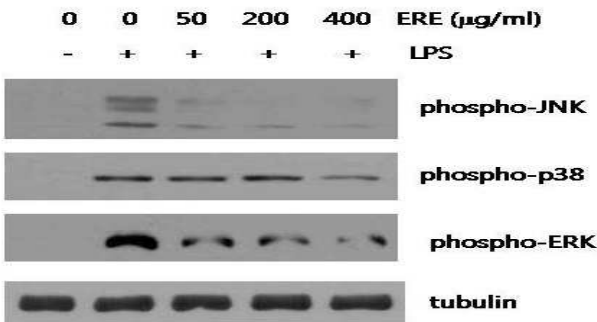


Fig. 9. Effect of ERE on LPS-stimulated IκBα degradation. Mouse peritoneal macrophages were pre-treated with ERE for 30 min followed by stimulation with LPS (100 ng/ml). The whole cell protein was extracted and subjected to Western blot analysis. tubulin was used as an internal control.

고찰

甘遂(*Euphorbiae kansui radix*)는 大戟科에 속한 다년생 육질 초본인 甘遂의 塊根을 건조한 것으로, 봄에 開花前 혹은 늦가을에

莖葉이 枯萎한 후 채취하여 外皮를 제거하고 晒乾한 것이다¹⁴). 약리적으로 甘遂는 瀉下, 利尿 작용을 나타내며 주로 胸水, 腹水, 간경화나 삼출성늑막염, 腎炎의 水腫 등에 응용할 수 있다¹⁵). 또한 面目의 浮腫, 胸痛, 脇痛, 胸熱感, 短氣, 口燥 등의 증후와 腹水로 인한 腹滿, 腹痛 그리고, 水毒의 留滯로 인한 小便難, 脚氣 등도 甘遂가 치료한다²⁴)고 하였다. 이는 甘遂가 水毒이 胸腹에 結聚한 것을 破하고, 通利하며, 利尿에 의하여 이것을 제거하는 逐水의 효능이 있기 때문이다. 『傷寒論』에서 甘遂는 結胸證을 치료한다고 기술되어 있는데, 이는 염증성의 胸水나 腹水, 혹은 腸閉塞으로 장관에 가스나 삼출액이 저류한 것으로 볼 수 있다²⁵). 『神農本草經』에서는 甘遂를 下藥으로 분류하고 苦寒 有毒하며, 留飲宿食이 정체하여 형성된 소화기계통의 大腹疝腹滿을 풀고 水穀이 원활하게 통과하도록 한다²⁶)고 하였다.

甘遂는 문헌적으로 여러 저자들이 毒性을 제시하였다²⁷). 이에 따라 甘遂는 1996년부터 시행된 “한약재 품질 및 유통관리 규정”에 중독 우려 한약재 품목에 분류되어²⁸), 임상에서는 다용되지 못하고 있는 실정이다. 한편 최근 국내에서 진행된 연구에서는 실험용 쥐에게 90일간 甘遂추출액을 경구 투여하여 甘遂의 독성을 분석한 결과 유독하지 않은 것으로 결과가 나오기도 하였다¹⁹). 홍¹⁶)은 임상적으로 1g까지 사용하여 설사를 한 후 몸이 가벼워지는 효과를 확인하였다.

염증은 일종의 보호반응으로서 세포손상을 일으키는 원인을 제거할 뿐만 아니라, 손상의 결과로 생긴 괴사세포와 조직을 제거함으로써 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어기전이다²⁹). 급성 염증으로 해로운 자극이 제거되어 손상된 조직이 수복되지만, 손상이 지속되면 만성 염증으로 진행된다. 이 과정에서 생기는 화학매개체에는 히스타민, 세로토닌, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 사이토카인(cytokines), NO 등이 있다^{7,30}).

대식세포는 염증 반응에서 중요한 역할을 하는데 항원을 탐식하고 동시에 항원제시의 역할을 담당하고 있다⁴). 기능적으로는 염증매개물질인 TNF-α를 분비시킴으로써 신경병증성 통증을 증가시키는 것으로 여겨지고 있다³¹). 대식세포가 활성화되면 세포 크기가 증가하고, 용해소체 효소의 함량이 증가하고, 더 활발한 대사과 섭취한 미생물을 살균하는데 더 큰 능력을 갖는다. 활성화 신호에는 LPS, 다른 미생물의 생산물, 활성화된 T 림프구에서 분비된 사이토카인, 급성 염증 과정에서 생산된 다양한 매개체, 섬유결합소와 같은 세포외바탕질 등이 있다. 활성화 이후에는 생물학적으로 활발하고 다양한 생산물을 분비하는데, 분비가 억제되지 않으면 만성 염증의 특징인 조직손상과 섬유증을 초래할 수 있고, 이러한 결과로 생기는 생산물은 중성 단백질 분해효소, 활성산소종(ROS)과 NO, 아라키돈산(AA) 대사물(eicosanoids), IL-1과 TNF-α와 같은 사이토카인, 다양한 성장인자 등이 있다⁷). 이러한 대식세포는 내독소(endotoxin)인 LPS에 의해 활성화되는데, 이는 내인성발열원(endogenous pyrogen)인 TNF-α와 IL-1에 대비하여 외인성 발열원(exogenous pyrogen)이라 부르며, 백혈구를 자극함으로써 사이토카인을 분비하도록 자극하여 아라키돈산을 프로스타글란딘으로 전환하는 COX의 수치를 증가시킨다⁷). IFN-γ는 사이토카인의 일종으로서 대식세포, NK 세포, 혈관내피세포 등을 활성화 시키며, 모든

세포에서 MHC class I 및 class II의 분자발현을 증강시키는 역할을 한다⁴⁾. 이러한 배경하에 본 실험에서는 LPS와 IFN- γ 를 대식세포에 처리하여 염증을 유발하도록 하였고, 이 과정에서 유발되는 여러 가지 화학 매개체와 염증 반응시에 나오는 신호전달물질들을 측정하여, 감초의 항염증효과를 살펴보고자 하였다.

감초추출액 투여 후의 대식세포의 생존률을 MTT방법으로 측정하였다. 감초추출액을 2, 10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 투여한 결과 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서 유의성 있게 생존률이 낮게 측정되었다. 복강세포는 ex vivo 조건에서 숫자가 증가하지 않으므로 MTT 방법에 의한 흡광도 증가는 세포내 dehydrogenase 활성의 증가를 의미하는 것으로 보인다. 따라서 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 나타난 formazon 흡광도의 증가는 세포 활성의 증가를 의미하는 것인지 세포독성이 있는 것은 아닌 것으로 보인다.

NO는 기체형태의 무기 저분자 라디칼로서 신경전달 기능, 혈액 응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면역 기능 등의 역할이 알려져 있으며, 반감기가 매우 짧고, NOS에 의해 L-arginine으로부터 합성되며³²⁾, 다양한 기능을 매개한다. 중추신경계에서는 혈류와 신경전달물질 분비를 조절하며, 탐식세포에서는 미생물과 종양세포를 죽이는데 사용되고, 내피세포에서는 평활근을 이완시키고 혈관을 확장시킨다⁷⁾. NOS는 1형(nNOS), 2형(iNOS), 3형(eNOS)의 세가지 형태가 있으며, 이 중 주로 염증과 관련된 것은 2형인 iNOS로서 IL-1, TNF- α , IFN- γ 와 같은 염증성 사이토카인과 LPS에 의해서 유도된다^{7,33)}. Lawand 등³⁴⁾은 실험을 통해 말초 조직에서 NOS를 억제하여 염증성 통증을 줄일 수 있음을 증명하였다. 실험에서 감초의 항염증효과를 보기 위해 NO 분비량을 측정한 결과, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. iNOS 측정 결과 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 실험군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이것으로 보아 감초 추출물에는 항염증효과가 있음을 알 수 있었고, NO 억제제인 iNOS 억제제와 관련이 있다고 판단된다.

COX는 세포막의 주성분인 arachidonic acid의 대사에 관여하는 효소로서³⁵⁾, 프로스타글란딘E₂(PGE₂), 프로스타글란딘D₂(PGD₂), 프로스타글란딘F₂ α (PGF₂ α), 프로스타사이클린(PGI₂)와 트롬복산A₂(TXA₂)를 생산한다⁷⁾. COX는 COX-1과 COX-2로 구분되며, COX-1은 내재적으로 존재하는 효소로 아교세포를 포함해서 신장, 위, 혈소판과 중추신경계에 존재하는 다양한 세포조직을 구성하는 요소가 되며 항상성을 조절하기 위한 prostaglandin 합성에 관여한다⁷⁾. COX-2는 주로 염증이 진행되는 동안에 microglia cell이나 astrocyte에서 유도되어 통증과 발열을 가져오는 매개물을 생성한다³⁶⁾. Western blot 분석법으로 COX-2의 발현량을 관찰한 결과 감초추출물을 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서 COX-2의 단백질의 발현량이 더 강하게 나타났으나, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 많이 억제된 것을 관찰할 수 있었고, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 단백질 발현이 완전히 억제되었다. 이는 농도의존적으로 감초가 항염증효과를 나타낸 것으로 판단된다.

사이토카인(cytokines)은 백혈구가 분비하는 물질 중 항체 외의 모든 화학물질을 집합적으로 총칭하며³⁷⁾, 선천면역과 적응면역에 관여하는 세포에서 분비되는 단백질로서 미생물과 여러 가지 항원에

대한 반응으로 생성된다⁵⁾. LPS와 같은 세균 성분에 의해 자극을 받은 대식세포는 TNF- α , IL-6, IL-12와 같은 염증성 사이토카인을 만들어내며 이들 사이토카인은 혈관내피세포를 활성화하여 백혈구의 누출을 유도하고, 간에서 급성기 단백질을 합성하도록 유도한다³⁸⁾.

TNF- α 는 내피세포와 호중구를 활성화하고, 시상하부에 작용하여 열생산을 자극하며, 근육과 지방의 이화작용을 주관하고, 세포자멸사(apoptosis)를 이끄는 것이다⁵⁾. IL-6는 선천면역과 적응면역 모두에서 기능하는 사이토카인이며 단핵 포식세포, 혈관 내피세포, 섬유아세포 등에서 생성되며, 미생물이나 다른 사이토카인 특히, IL-1과 TNF- α 에 자극받는 세포에서 생성되고, 간세포의 급성단계 단백질 합성을 자극하여 염증의 전신적 효과를 야기시키며, 호중구의 생산을 유도한다. 적응면역에서는 항체 생성자로 분화되어가는 B 림프구의 성장을 자극하고, 종양성 형질세포(골수종)에 대한 성장 인자로서 작용한다⁵⁾. IL-12는 세포내 미생물에 대한 초기 선천면역반응의 주요 매개자이고, 미생물에 대한 적응면역반응의 중요한 유도자이다. NK세포와 T세포를 자극하여 IFN- γ 를 분비하게 하며, CD4+ 보조 T 세포를 IFN- γ -생산TH1세포로 분화하도록 자극하고, 활성화된 NK세포와 CD8+ 세포 용해성 T세포의 세포 용해 기능을 증진시키는 역할을 한다⁵⁾. TNF- α , IL-6, IL-12의 분비량을 측정한 결과, 감초추출물은 모든 실험군에서 대조군에 비해 TNF- α 의 분비를 유의성 있게 감소시켰다. IL-6분비량 측정결과, 모든 실험군에서 유의성 있게 IL-6의 분비를 억제하는 것이 나타났고, 그 효과는 농도의존적이었다. 이는 감초의 성분 중 일부인 Kansuinin A 와 B로 IL-6의 억제 효과를 측정하여 항염증 효과를 측정한 Chang²²⁾ 등의 결과와도 일치하였다. IL-12 분비량 측정 결과, IL-6와 유사하게, 모든 실험군에서 유의성 있는 감소가 나타났으며, 그 효과는 농도의존적이었다.

I κ B α 는 세포질 내에서 κ B의 억제제(inhibitors of κ B)라 불리며, 이는 세포질에서 기능적으로 NF- κ B와 결합하여 그 기능을 불활성화시킨 상태로 유지시키다가 LPS나 TNF- α , IL-1 같은 염증성 cytokine을 비롯하여 바이러스, 자외선 등의 자극에 의해 활성화된다³⁹⁾. 이러한 자극은 NF- κ B에 결합된 I κ B α 가 인산화되고, 이어서 ubiquitin ligase complex에 의해 I κ B α 의 lysine 잔기가 ubiquitination이 되어 26S proteasome에 의해 분해되면서 NF- κ B는 핵내로 자유롭게 이동하게 된다⁴⁰⁾. 이렇게 전사된 NF- κ B는 T세포의 활성화에 관여하고, 미생물 산물 및 TNF- α 나 IL-1 같은 염증성 사이토카인의 합성을 촉진한다^{5,40)}. I κ B α 함량을 측정하여 NF- κ B의 작용이 저해되는지를 살펴 본 결과, I κ B α 는 대조군에서는 완전히 분해되었으나 감초추출물을 처리한 모든 농도의 실험군에서는 I κ B α 분해가 억제되었으며 특히, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 감초추출물을 처리한 실험군에서는 강하게 억제되었다.

ERK, JNK, p38은 대표적인 MAP kinase(mitogen-stimulated protein kinase) 경로에서 발현되는 효소나 단백질이다¹²⁾. MAP kinase는 진핵세포의 신호전달에서 중심적인 역할을 하는 일련의 단백질 인산화효소를 말한다. 고등 진핵세포에서 MAP kinase는 세포의 성장 및 분화에 모두 관여하는 조절인자이다⁴¹⁾. 활성화된 ERK는 Elk라 불리는 단백질을 인산화하고, 이는 AP-1(activation protein-1) 전사 인자의 성분인 Fos의 전사를 자극한다. JNK는

AP-1 전사 인자의 두 번째 성분인 c-Jun을 인산화한다. 이후 Fos와 인산화된 c-Jun이 결합하여 활성화된 AP-1을 형성하고 이것이 NF- κ B와 결합하여 핵내에서 각종 염증 반응에 관여하게 된다. p38은 그 기전이 명확하지는 않으나, 흔히 염증 반응과 세포 죽음에 관여된다고 알려져 있다^{5,41-43}. 실험에서 JNK 인산화의 경우 감초추출물을 50 μ g/ml의 농도로 처리한 실험군부터 완전히 억제되었고, p38의 인산화는 400 μ g/ml의 농도로 처리한 실험군에서 억제되었다. ERK 활성화 또한 모든 실험군에서 강하게 억제되었다.

감초의 항염증효과를 살펴보기 위하여 다양한 염증성 화학 매개체와 신호 전달 물질에 미치는 영향을 다양한 항목으로 측정된 결과, 모든 항목에서 염증이 유효한 효과를 확인할 수 있었다. 향후, 이러한 결과를 바탕으로 후속의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

감초의 항염증 효과를 살펴보기 위해 LPS로 활성화된 마우스 복강 대식세포의 감초에 대한 생존률 및 NO, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-12의 발현과 세포내 염증 반응에 필요한 신호전달과 관련된 I κ B α , ERK, p38, JNK의 활성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

감초추출물은 400 μ g/ml 까지 세포독성을 나타내지 않았다.

감초추출물은 LPS와 IFN- γ 로 대식세포를 활성화했을 때 iNOS 발현 억제를 통해 NO 분비를 감소하였다.

감초추출물은 LPS로 자극한 COX-2 합성을 억제하였다.

감초추출물은 LPS로 활성화된 대식세포의 TNF- α , IL-6, IL-12 분비를 억제하였다.

감초추출물은 LPS에 의한 I κ B α 분해를 약하게 억제하였고 JNK, ERK 및 p38 단백질 활성을 강하게 억제하였다.

이상의 결과로 보아 감초는 LPS로 활성화된 대식세포에서 NO, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-12의 생성 및 발현을 억제하는 항염증효과를 나타냈으며, 이는 I κ B α , MAP kinase의 인산화를 억제하는 기전과 관련이 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

1. Lee, J.D. Illustrated Pathology. Korea Medicine: Korea. p 29, 2004.
2. Monaco, C., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Feldmann, M., Paleolog, E. T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. 3(1):35-42, 2004.
3. Schwartsburd, P.M. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev*. 22(1):95-102, 2003.
4. Shin, G.T., Internal Medicine. Jung Dame:Korea. p 5, pp.10-11, 2005.
5. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. Cellular and Molecular Immunology. Bum Moon Sa:Korea. pp 180-186, 243-274, 2004.
6. Hutoshi, S., Internal Medicine. Jung Dam: Korea pp 8-9, 2002.
7. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R.N., Robbins, S.L. Pathology. EPUBLIC: Korea. pp 31-58, 2009.
8. Noh. K.M., Koh. J.Y. Induction and Activation by Zinc of NADPH Oxidase in Cultured Cortical Neurons and Astrocytes. 20(23):RC111, 2000.
9. Berlett. B.S., Stadtman. E.R. Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. 272(33):20313-20316, 1997.
10. Liao. C.H., Sang. S., Liang. Y.C., Ho. C.T., Lin. J.K. Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in Downregulating Nuclear Factor-Kappa B Pathway by Garcinol. *Mol. Carcinog*. 41(3):140-149, 2004.
11. Aggarwal. B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. 3(9):745-756, 2003.
12. Cooper, G.M. Molecular and Cellular Biology. Hanwoori, pp 445, 491-495, 2002.
13. Kim, D.H.I. Commentary on Nei-Jing, Yi Sung Dang. p 1432, 2002.
14. Korea's Association of Colleges of Korea Medicine. Herbology. Young Im Sa. pp 249-250, 1998.
15. Lee, S.I., Clinical Application of Herbal Medicine. Sung Bo Sa. pp 78-79, 1990.
16. Hong, S.Y., Clinical Use of Euphorbiae Kansui Radix. Dong-Guk University. 2009.
17. Peng. Q., Li. G., Ma. Y., Huang. J., Wei. X., Wang. J. Chemical constituents of Euphorbia kansui. *Biochem. Syst. Ecol*. 43: 64-66, 2012.
18. Shi. J.X., Li. Z.X., Nitoda. T., Izumi. M., Kanzaki. H., Baba. N., Kawazu. K., Nakajima. S. Three Antinematodal Diterpenes from Euphorbia kansui. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 71(4):1086, 2007.
19. Z.Z. Han, H.S. Zhang, K.H. Gil, J.Y. Lee, K.H. Kong, M.K. Han, H.J. Yang, H.S. Kim, D.H. Kim, T.H. Ahn, J.S. Bae, H.K. Ko, J.W. Lee, M.S. Kim, S.W. Song, K.H. Kim, H.K. Lee, C.K. Park. A 90-day Repeated-Dosed Toxicity Study of Euphorbiae kansui radix Extract in Fischer 344/N

- Rats. 24(4):543-553, 2008.
20. Zheng, W.F., Cui, Z., Zhu, Q. Cytotoxicity and antiviral activity of the compounds from *Euphorbia kansui*. *Planta Med.* 64(8):754-756, 1998.
 21. Zhang, L., Gao, L., Li, Z., Yan, X., Yang, Y., Tang, Y., Cao, Y., Ding, A. Bio-Guided Isolation of the Cytotoxic Terpenoids from the Roots of *Euphorbia kansui* against Human Normal Cell Lines L-O2 and GES-1. *Int. J. Mol. Sci.* 13(9):11247-11259, 2012.
 22. Chang, J.S., Lee, S.W., Park, M.H., Kim, M.S., Hudson, B.I., Park, S.J., Lee, W.S., Rho, M.C. Kansuinine A and Kansuinine B from *Euphorbia kansui* L. Inhibit IL-6-induced Stat3 Activation. *Planta Med.* 76(14):1544-1549, 2010.
 23. Anonymous Article: Anticomplement Activity of Compounds Isolated from the Roots of *Euphorbia kansui*. 54(2):159-162, 2011.
 24. Lee, J.H., Lectures on Herbal Medicine. Yui Bang: Korea. pp 434-435, 2003.
 25. Moon, J.J., Ahn, K.S., Kim, S.H., Eom, H.S., Ge, K.Y., Kim, J.B., Park, J.H., Sang Han Lon Jung Ha. Kyung Hee University: Korea. p284-295, pp 322-323, 1998.
 26. Ma, K.H., Commentary on Shin Nong Herbology. People's Health: China p 2, 4, 5, 294, 350, 383, 1995.
 27. Park, J.H., Sur, B.Y. A Philological study on Poisoning of *Euphorbiae Kansui Radix*. The Journal of Jehan Oriental Medical Academy. 7(1):37-50, 2009.
 28. Jee, H.J. Standardization of Herbal Medicine. Korea Medical Index: Korea. p 1007, 1998.
 29. Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5(10):971-974, 2004.
 30. Wall, P.D., Melzack, R. Pain, Jung Dam: Korea. pp 74-83, 2002.
 31. Wagner, R., Janjigian, M., Myers, R.R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF- α expression. *Pain.* 74(1):35-42, 1998.
 32. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2(10):907-916, 2001.
 33. Angus, J.A., Cocks, T.M. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* 41(1-2):303-352, 1989.
 34. Lawand, N.B., Willis, W.D., Westlund, K.N. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Neuroreport.* 8(4):895-899, 1997.
 35. Smith, W.L., Song, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 115-128, 2002.
 36. Bauer, M.K., Lieb, K., Schulze-Osthoff, K., Berger, M., Gebicke-Haerter, P.J., Bauer, J., Fiebich, B.L. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur. J. Biochem.* 243(3):726-731, 1997.
 37. Sherwood, L., Human Physiology. Life Science: Korea. p 418, 2011.
 38. Paul, W.E., Seder, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 76(2):241-251, 1994.
 39. Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260, 1998.
 40. D'Acquisto, F., May, M.J., Ghosh, S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol. Interv.* 2(1):22-35, 2002.
 41. Qi, M., Elion, E.A. MAP kinase pathways. *J. Cell. Sci.* 118(Pt 16):3569-3572, 2005.
 42. Keene, J.D. Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(1):5-7, 1999.
 43. Lai, W.S., Carballo, E., Strum, J.R., Kennington, E.A., Phillips, R.S., Blackshear, P.J. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19(6):4311-4323, 1999.