

## NF- $\kappa$ B 調節을 통한 菴蔚子の 염증억제효과

박성규<sup>1</sup> · 제갈경환<sup>1,2</sup> · 정지윤<sup>1,2</sup> · 백영두<sup>3</sup> · 변성희<sup>1</sup> · 김영우<sup>1,2</sup> · 조일제<sup>1,2</sup> · 박상미<sup>1,2\*</sup> · 김상찬<sup>1,2\*</sup>

1: 대구한의대학교 한의과대학, 2: 방제과학글로벌 연구센터, 3: 대구보건대학교 임상병리과

### Leonuri Fructus Ameliorates Acute Inflammation via the Inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokine Production

Seong Gyu Park<sup>1</sup>, Kyung-Hwan Jegal<sup>1,2</sup>, Ji Yun Jung<sup>1,2</sup>, Young Doo Back<sup>3</sup>, Sung Hui Byun<sup>1</sup>, Young Woo Kim<sup>1,2</sup>,  
Il Je Cho<sup>1,2</sup>, Sang Mi Park<sup>1,2\*</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2\*</sup>

1: College of Korean Medicine, Daegu Haany University,

2: MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 3: Department of Clinical Pathology, Daegu Health College

Leonuri Fructus, a semen of Leonuri Herba, has been used for the treatment of menstrual disorders such as amenorrhea, dysmenorrhea and leukorrhea and for the remedy of hyperemia. The present study was conducted to evaluate the anti-inflammatory effects of the Leonuri Fructus extract (*Leonurus japonicus* Houtt. EtOH extract; LJE) *in vivo* and *in vitro*. *In vitro* study, the MTT assay for cell viability was conducted to determine the non-cytotoxic concentration of LJE treatment in media. The levels of NO were measured with Griess reagent. Pro-inflammatory cytokines were detected by ELISA method. The inflammation-related proteins of this study were detected by immunoblot analysis. The increases of NO production and iNOS expression were detected in LPS-treated cells compared with control, but LJE attenuated the increases of NO and iNOS by LPS. LJE reduced the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induced by LPS stimulation. LJE suppresses the signaling pathways of NF- $\kappa$ B and MAPKs in LPS-induced macrophage cells. *In vivo* study, carrageenan-induced hind paw acute edematous inflammation rat model was used for evaluation of anti-inflammatory activity of LJE. LJE significantly inhibited the increases of hind paw swelling, skin thicknesses and inflammatory cell infiltrations, and decreased the numbers of mast cell induced by carrageenan injection. These results suggest that LJE has an anti-inflammatory therapeutic potential, which is mediated through modulating NF- $\kappa$ B activation and MAPK phosphorylation. Inhibition of the rat paw edema induced by carrageenan is considered as direct evidence that LJE may be a useful source to treat inflammation.

Key words : Leonuri Fructus, anti-inflammation, iNOS, NF- $\kappa$ B, MAP kinases

## 서 론

菴蔚子 (*Leonurus japonicus* Houtt.)는 甘微寒 無毒하고, 心包, 肝에 주로 작용하며, 活血調經, 淸肝明目的 효능이 있어, 月經不

\* To whom correspondence should be addressed at : Sang Mi Park,

College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea

· E-mail : miya38@nate.com, · Tel : 053-819-1864

\* Sang Chan Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University,

1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea

· E-mail : miya38@nate.com, · Tel : 053-819-1863

· Received : 2014/01/23 · Revised : 2014/03/17 · Accepted : 2014/03/31

調, 痛經, 經閉, 崩中帶下, 産後瘀血作痛, 肝熱頭痛, 目赤腫痛, 目生翳膜을 치료한다<sup>1)</sup>. 菴蔚子에는 leonurinine, oleic acid, linoleinic acid 및 비타민 A 등이 함유되어 있으며, 그 중 leonurinine은 鎮靜作用, 血壓降下作用, 強心利尿作用, 子宮收縮作用이 있음이 증명되었다<sup>2)</sup>. 최근에는 菴蔚子の 항균효과<sup>3)</sup>, 고지혈억제효과<sup>4)</sup> 및 지질운반단백질로써의 효과<sup>5)</sup>, 간보호효과<sup>6)</sup> 등이 보고되고 있다. 그러나, 충울자의 염증억제효과에 관한 연구는 매우 제한적인 실정이다.

염증은 손상, 괴사조직이나 미생물과 같은 이물질을 제거하는 숙주의 반응으로 감염, 허혈, 외상, 물리적, 화학적 상해, 이물질 및 자가면역반응 등에 의해 발생하며<sup>7)</sup>, 염증반응이 유발되면 대식세포(macrophage)가 활성화되어 염증매개물질 및 cytokine

을 생산한다<sup>8)</sup>. 감염부위에 대한 염증반응은 과도할 경우 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 유도과 이를 통한 nitric oxide (NO)에 의해 만성염증질환 및 종양이 발생하기도 한다<sup>9)</sup>.

Lipopolysaccharide (LPS)는 gram-negative bacteria의 세포 벽 외층의 절편혼합물로서, 인체 내에서 내독소로 작용하여 국소 및 전신의 염증반응을 유발하며<sup>10)</sup>, 대식세포의 TLR4 (toll-like receptor 4)와 결합하고 MyD88을 통하여 IRAK의 인산화 및 TRAF6의 활성화를 통하여, I- $\kappa$ B kinase cascade를 통하여 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증연구에서 다용되는 모델이다<sup>11)</sup>. 활성화된 대식세포는 interleukin, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 cytokine을 생산하고, NO 및 prostaglandins (PG)를 생산하여 감염초기의 염증반응에 중요한 역할을 한다<sup>12,13)</sup>. Carageenan은 홍조류에서 추출된 것으로, 생체에 주사하면 부종과 염증세포의 침윤 등을 수반하는 급성염증반응을 유도하므로, 동물염증연구모델에서 다용된다<sup>14,15)</sup>.

본 연구에서는 충출자 추출물의 항염증기전 및 염증관련 cytokine의 발현에 대한 연구를 *in vitro*로 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포모델에서의 염증매개물의 억제효과, *in vivo*로 carrageenan으로 유도된 rat의 족부종 및 조직검사를 통하여 항염증효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 충출자 추출물 (LJE) 제조

芫薊子 (대원약업사, 대구) 에탄올 추출물 (*Leonurus japonicus* Houtt. EtOH extract; LJE)은 충출자 300 g에 3 L의 100% 에탄올을 가하고 상온에서 72시간 동안 추출한 후, 상층액만을 취하여 No.2 filter paper (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과한 후 여액을 진공회전농축기 (Rotary evaporator; EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축액은 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)로 동결건조하고 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다. 芫薊子의 최종 수율은 0.694%이었고 *in vitro* 실험 시 dimethyl-sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였으며, *in vivo* 실험에서는 polyethylene glycol (PEG)에 녹여 사용하였다.

### 2. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), *E. coli* LPS, Griess reagent, DMSO, PEG, dexamethasone 및 carrageenan은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin 및 streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. iNOS 항체는 BD biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고, I- $\kappa$ B  $\alpha$ 와 NF- $\kappa$ B 및 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Phospho-I- $\kappa$ Ba (p-I- $\kappa$ Ba), phospho-p38 (p-p38) mitogen-activated protein kinase (MAPK),

phospho-p44/42 (p-p44/42) MAPK, phospho-SAPK/JNK (p-SAPK/JNK) 항체와 lamin A/C 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Nitrocellulose (NC) paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다.

### 3. 세포 배양

Raw 264.7 (murine macrophage cell line) 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기 (Sanyo, Japan)에서 배양하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 세포를 24 well plates에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 LJE를 농도별로 처리하고 18시간 동안 배양한 후 MTT (0.5 mg/ml) 용액을 넣고 4시간 배양하였다. 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO로 용해시켜 microplate reader (Tecan, Infinite 200 PRO, Tecan Group Ltd, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로서 Griess reagent시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 50  $\mu$ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 50  $\mu$ l를 96 well plates에 혼합하고 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. Cytokine과 PGE<sub>2</sub> 측정

LJE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하고 18시간 후에 상등액을 회수하여 -70°C에 보관하였다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 각각 ELISA kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, PGE<sub>2</sub>는 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)의 PGE<sub>2</sub> assay kit를 사용하여 측정하였으며, 실험은 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

### 7. Immunoblot 분석

전세포 추출액 (whole cell lysate), 핵 분획 (nuclear fraction)은 본 실험실에서 기존에 확립된 방법에 따라 분리하였다<sup>10)</sup>. 정량한 단백질을 취하여 10% SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 NC membrane으로 단백질을 전이시켰다. iNOS, I- $\kappa$ Ba, p-I- $\kappa$ Ba, NF- $\kappa$ B, p-p38 MAPK, p-p44/42, p-SAPK/JNK, 및 actin 1차 항체와 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시키고 ECL detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis는 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

### 8. 실험동물 및 처치

실험동물은 6주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (140-160 g)를 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23℃, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 아무런 처치를 하지 않은 normal군, carrageenan (100 µl/rat)만을 피하주사한 carrageenan군, carrageenan과 dexamethasone (1 mg/kg, p.o.)을 투여한 dexamethasone군, carrageenan과 0.3 g/kg의 LJE를 투여한 0.3 g/kg LJE군, carrageenan과 1.0 g/kg의 LJE를 투여한 1.0 g/kg LJE군으로 나누고, 각 군당 수는 6마리로 하였다.

### 9. Paw edema의 유도 및 측정

LJE와 dexamethasone은 4일 동안 매일 1회 투여하였으며, 마지막 약물투여 1시간 후 carrageenan을 rat의 오른쪽 발바닥에 주입하여 paw edema를 유도하였다. Paw edema의 측정은 carrageenan을 주입한 후 시간별로 (0, 1, 2, 3, 4시간) 부종측정기 (Plethysmometer, Ugo Basile; Comerio, VA, Italy)를 이용하여 부종의 정도를 측정하였다.

### 10. 조직처리

후지 (後肢)의 발등 (dorsum pedis) 및 발바닥 (ventrum pedis)의 피부 실질조직을 분리하여 10% 중성 포르말린에 고정시킨 다음 일반적인 방법으로 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3-4 µm의 longitudinal 절편을 제작하여 일반 조직병리학적 변화를 관찰하기 위하여 HE 염색을 실시하였으며, 비만세포 관찰을 위하여 toluidine blue 염색을 실시하였다. 또한 발등 및 발바닥 피부 (상피에서 진피)의 두께를 자동영상분석장치 (DMI-300, DMI, Daegu, Korea)를 이용하여 µm 단위로 40배 현미경 시야에서 각각 측정하였고, 침윤된 염증세포 및 비만세포의 수는 200배 현미경 시야에서 측정하였다.

### 11. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance (one-way ANOVA)로 검정한 후 Newman - Keuls test로 검정하였다. 통계적 유의성은 p<0.05 또는 p<0.01로 판단하였다.

## 결 과

#### 1. LJE의 NO 생성 저해능

LJE의 세포독성을 확인하기 위하여 LJE를 1, 3, 10, 30 µg/ml의 농도로 세포에 전 처치하고 18시간 후에 MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 측정하였다. Control군과 비교하여 LJE 1, 3, 10, 30 µg/ml 처치군은 Raw 264.7세포에서 유의한 세포독성을 나타내지 않았으므로 LJE 10, 30 µg/ml의 농도를 실험에 사용하였다(Fig. 1A). LPS 존재하에서 세포생존율의 경우, LPS 단독 처치군은 control군에 비교하여 77%의 세포 생존율을 나타

내었다. 그러나 LPS에 LJE 10, 30 µg/ml을 처리한 군은 LPS 단독 처치군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1B). LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 LJE의 NO 생성 저해능을 관찰하기 위하여 LJE를 10, 30 µg/ml의 농도로 세포에 처리한 후 생성되는 NO의 양을 측정하였다. LPS군은 control군과 비교하여 NO 생성량이 LPS를 처리한 18시간 후 유의하게 증가하였으며, 10, 30 µg/ml LJE에 의해 통계적으로 유의한 NO 생성 저해능을 나타내었다(Fig. 1C).

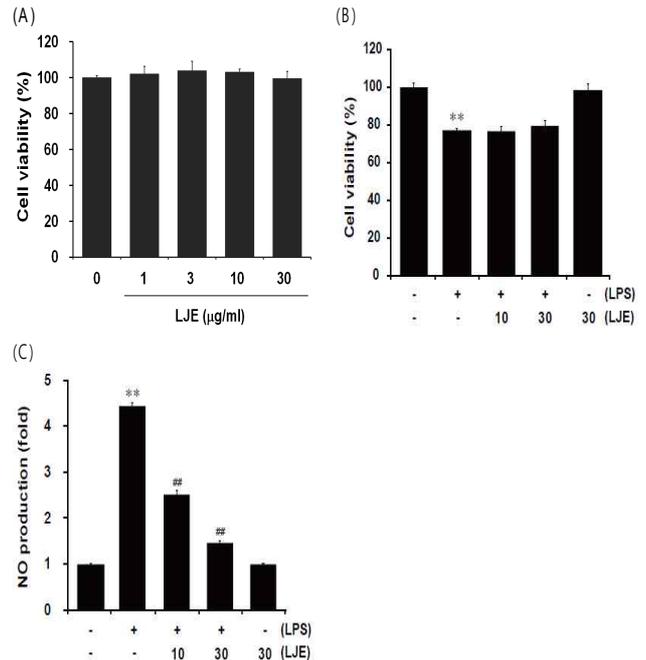


Fig. 1. Inhibitory effect of LJE on cell viability and NO production. Raw 264.7 cells were treated with 1-30 µg/ml of LJE dissolved in DMSO for 18 h (A) or incubated with 10 or 30 µg/ml LJE for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 18 h (B). Cell viability was measured by MTT assay. The concentrations of nitrite in culture medium were measured by Griess reagent as described in the methods section (C). Values represent mean ± S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, \*\*p<0.01, significant as compared to LPS alone, ##p<0.01). LJE, *Leonurus japonicus* Houtt. EtOH extract; NO, nitric oxide; LPS, Lipopolysaccharide.

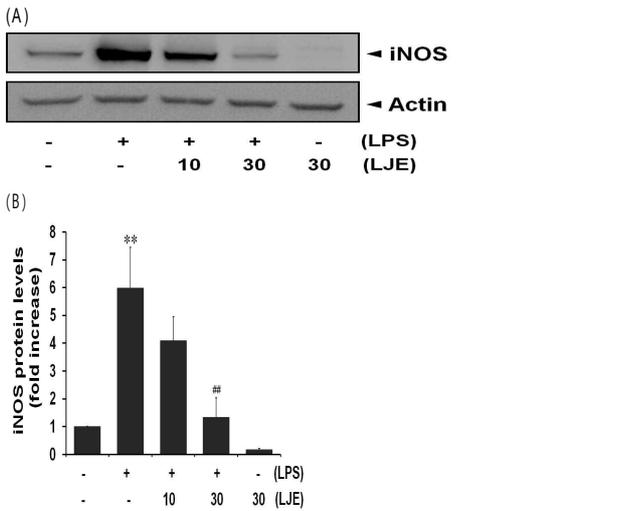
#### 2. LJE의 iNOS 발현 저해

NO 생성 저해에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현을 조사하였다. LPS는 iNOS 단백질의 발현을 유의하게 증가시켰으나, LPS에 LJE 30 µg/ml을 전 처치한 세포에서는 iNOS 단백질의 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 2A, B).

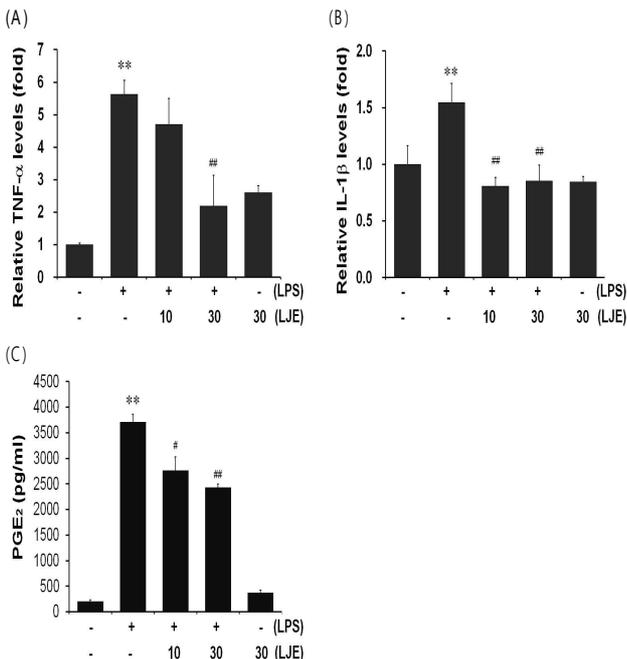
#### 3. LJE의 cytokine 생성 저해능

LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 LJE의 TNF-α, IL-1β 및 PGE<sub>2</sub> 생성 저해능을 관찰하기 위하여 LJE를 10, 30 µg/ml의 농도로 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 세포배양액 중의 cytokine 생성 정도를 측정하였다. 실험결과 LPS군은 염증성 cytokine들의 생성을 유의성 있게 증가시켰다. TNF-α는 30 µg/ml LJE 전처치에 의해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3A),

IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub>는 10, 30  $\mu$ g/ml LJE 전처치에 의해 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 3B, C).



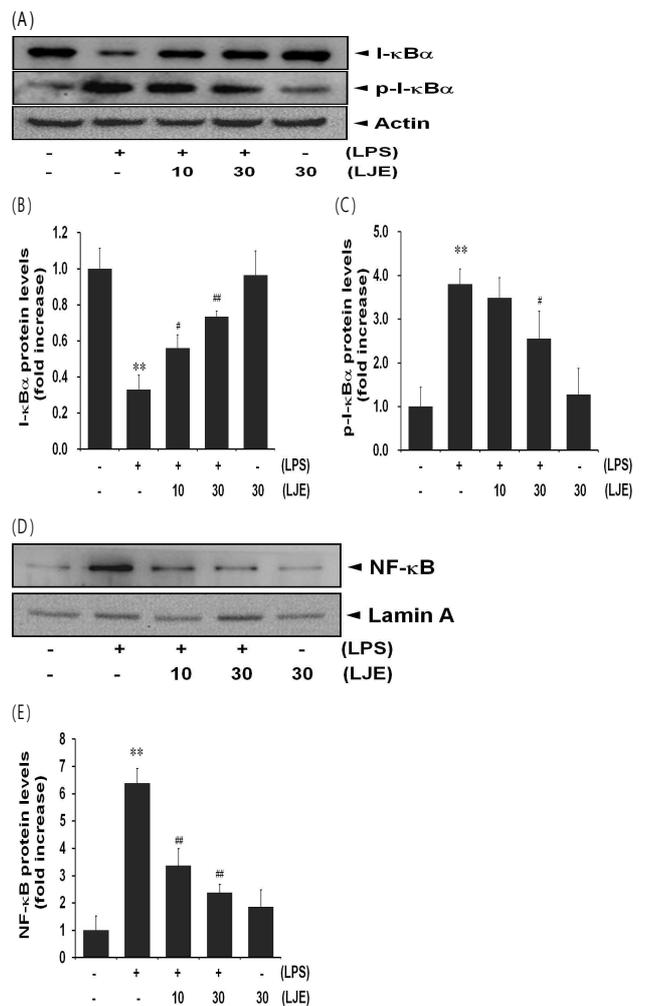
**Fig. 2. Inhibitory effect of LJE on the LPS-induced iNOS expressions in Raw 264.7 cells.** Lysates were prepared from control, 18 h LPS (1  $\mu$ g/ml) stimulated cells or from LPS plus LJE (10, 30  $\mu$ g/ml). Equal amounts of total protein (50  $\mu$ g/lane) were separated by SDS-PAGE. Expressions of iNOS protein were determined by immunoblot using specific anti-iNOS antibody. Actin is used as a loading control. The relative levels of protein bands were measured by scanning densitometry. Values represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, \*\* $p$ <0.01, significant as compared to LPS alone, ## $p$ <0.01). iNOS, inducible nitric oxide synthase.



**Fig. 3. Inhibitory effect of LJE on the LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokines.** Raw 264.7 cells were treated with 10 or 30  $\mu$ g/ml of LJE for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml), and the cells were further incubated for 18 h. The concentrations of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) and PGE<sub>2</sub> (C) in culture medium were measured by ELISA as described in methods. Values represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, \*\* $p$ <0.01, significant as compared to LPS alone, ## $p$ <0.01, # $p$ <0.05). IL, Interleukin; TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>.

4. LJE의 p-I- $\kappa$ Ba 및 NF- $\kappa$ B 단백질 발현 저해

염증반응에 관여하는 I- $\kappa$ Ba, p-I- $\kappa$ Ba 및 NF- $\kappa$ B의 단백질 발현 정도를 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서 NF- $\kappa$ B의 억제 단백질인 I- $\kappa$ Ba와 I- $\kappa$ Ba의 인산화된 형태인 p-I- $\kappa$ Ba 단백질 발현 및 핵 내에서의 NF- $\kappa$ B 단백질 발현을 관찰하였다. I- $\kappa$ Ba의 발현은 LPS에 의해 감소하였고, 10, 30  $\mu$ g/ml LJE 전처치는 LPS에 의하여 감소된 I- $\kappa$ Ba 단백질의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 이와 더불어 LJE는 LPS에 의해 증가된 I- $\kappa$ Ba의 인산화를 감소시켰다(Fig. 4A, B, C). 이러한 결과와 마찬가지로 LPS에 의해 증가하는NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동이 10, 30  $\mu$ g/ml LJE 전처치에 의해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4D, E).



**Fig. 4. Inhibitory effect of LJE on the LPS-induced p-I- $\kappa$ Ba and NF- $\kappa$ B protein expressions in Raw 264.7 cells.** The level of I- $\kappa$ Ba protein was monitored 15 min after treatment of cells with LPS (1  $\mu$ g/ml) with or without LJE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The level of p-I- $\kappa$ Ba and nuclear NF- $\kappa$ B protein was monitored 30 min after treatment of cells with LPS (1  $\mu$ g/ml) with or without LJE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). Antibody against actin or lamin A/C was used for verifying equal protein loading of cell lysates or nuclear fractions, respectively. The relative levels of I- $\kappa$ Ba, p-I- $\kappa$ Ba (A) and nuclear NF- $\kappa$ B (D) were measured by scanning densitometry (B, C, E). Values represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (significant as compared to control, \*\* $p$ <0.01, significant as compared to LPS alone, ## $p$ <0.01, # $p$ <0.05). I- $\kappa$ Ba, inhibitor- $\kappa$ Ba; p-I- $\kappa$ Ba, phospho-inhibitor- $\kappa$ Ba; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B.

5. LJE의 MAP Kinases 인산화 저해

LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 LJE에 의한 MAPK 활성화 변화를 측정하기 위하여 인산화된 형태의 p38 MAPK, p44/42 MAPK 및 SAPK/JNK 단백질의 인산화 정도를 immunoblot 분석을 통하여 관찰하였다. LPS에 의해 증가하는 MAPK의 인산화가 10, 30 µg/ml LJE 전처치에 의해 감소됨을 확인하였다(Fig. 5).

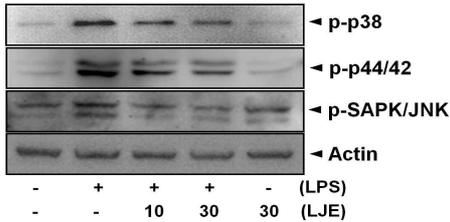


Fig. 5. Inhibitory effect of LJE on the LPS-induced phosphorylation of MAPKs in Raw 264.7 cells. Lysates were prepared from control or 30 min LPS (1 µg/ml) stimulated cells or from LPS plus LJE (10, 30 µg/ml). Equal amounts of total protein (50 µg/lane) were separated by SDS-PAGE. Expressions of MAPK protein were determined by immunoblot using specific anti-p-p38 MAPK, anti-p-p44/42 MAPK and anti-p-SAPK/JNK antibodies. Immunoblot against actin is used as a loading control. SAPK, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinases.

6. LJE의 발부종 억제

Paw edema를 측정한 결과, carrageenan을 주입한 군에서는 Normal군에 비교하여 1, 2, 3, 4시간에 유의한 발부종이 유발되었다. 그러나 발부종유도 후 dexamethasone을 처치한 군에서는 2, 3, 4시간에서 유의한 발부종 억제를 나타내었다. LJE 0.3 g/kg를 투여한 군에서는 3, 4시간에 각각 유의한 발부종 억제를 나타내었으며, LJE 1.0 g/kg를 투여한 군에서는 2, 3, 4시간에서 유의성 있는 발부종 억제를 나타내었다(Fig. 6).

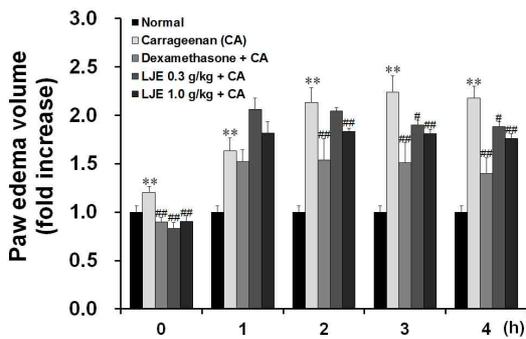


Fig. 6. Inhibition of carrageenan-induced paw edema volume by LJE. LJE, dissolved in 40% PEG, was orally administered to rats at 0.3 or 1.0 g/kg/day prior to the induction of paw edema for three days. Paw edema was induced by subcutaneous injection of 1% carrageenan solution as described in methods. The swelling volume of paw was measured up to 4 h after 0 h carrageenan injection at intervals of 1 h by using plethysmometer. Dexamethasone (1 mg/kg, p.o.) was used as a positive drug. Data represent mean ± SD of six animals (Significant as compared to normal group, \*\*p<0.01, significant as compared to carrageenan-treated group, ##p<0.01, #p<0.05). PEG, polyethylene glycol.

7. LJE에 의한 조직학적 변화

Carrageenan 유도로 침윤 염증세포 수의 현저한 증가 및 부종성 변화에 의한 발등 (Fig. 7) 및 발바닥 (Fig. 8) 피부 두께의

증가가 인정되었으며, 이러한 carrageenan 유도 급성 부종성 소견 및 염증세포 침윤은 dexamethasone 및 1.0 g/kg LJE 투여에 의해 유의성 있게 현저히 억제되었다. 한편 0.3 g/kg LJE 투여군에서도 carrageenan 대조군에 비해 유의성 있는 부종 억제가 인정되었으나, 침윤 염증세포의 수는 carrageenan 대조군과 유사하게 관찰되었다. 이러한 결과는 LJE의 투여 용량 의존적인 항염 효과를 나타내는 직접적인 증거로 판단된다. 비만 세포는 다양한 급만성 염증성 질환에서 염증의 증가자로서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 실험 결과, carrageenan에 의한 비만 세포의 수적 감소 및 탈과립 (degranulation) 현상이 dexamethasone 및 1.0 g/kg LJE 투여에 의해 유의성 있게 억제된 점은 LJE가 비만세포의 탈과립을 조절하여, 국소 항염 효과를 나타내는 직접적인 증거로 판단되나, 0.3 g/kg LJE 투여군에서는 carrageenan 대조군과 유사한 비만세포의 수적 변화를 나타내었다(Table 1).

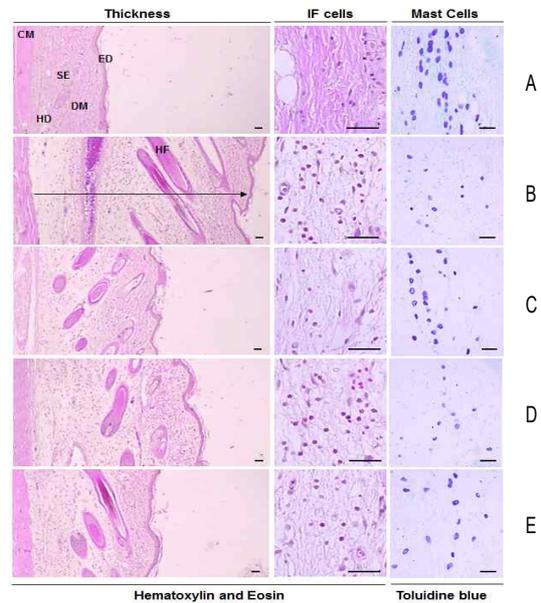
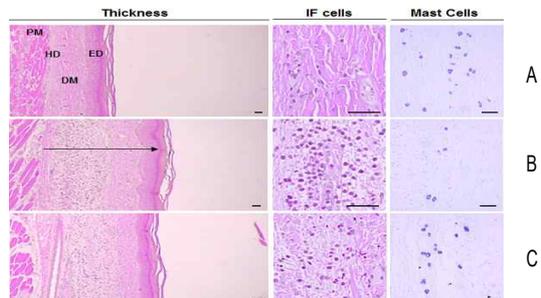
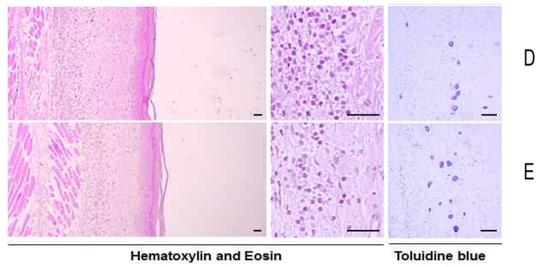


Fig. 7. Represent histological profiles of the dorsum pedis skins. Changes on histological profiles of the dorsum pedis skin in normal (A), carrageenan (B), dexamethasone (C), 0.3 g/kg LJE (D) and 1.0 g/kg LJE (E) treated groups. After 4 h of carrageenan treatment, dorsum pedis skins were separated and fixed in 10% neutral buffered formalin, then embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin. Arrow indicated total thicknesses measured and mast cells were stained by 1% toluidine blue (Scale bars = 80 µm. IF, infiltrated inflammatory cells; ED, epidermis; DM, dermis; HD, hypodermis; CM, cutaneous trunci muscle; SE, sebaceous gland; HF, hair follicle).





**Fig. 8.** Represent histological profiles of the ventrum pedis skins. Changes on histological profiles of the ventrum Pedis skin in normal (A), carrageenan (B), dexamethasone (C), 0.3 g/kg LJE (D) and 1.0 g/kg LJE (E) treated groups. Tissue sections were prepared as described in Figure 7. Arrow indicated total thicknesses measured (Scale bars = 80 μm. IF, infiltrated inflammatory cells; ED, epidermis; DM, dermis; HD, hypodermis; PM, paw muscle).

**Table 1.** Changes on the Histomorphometrical Analysis of Hind Paw Skins

Groups	Total thickness (μm)	Infiltrated inflammatory cell numbers (cells/mm <sup>2</sup> )	Mast cell numbers (cells/mm <sup>2</sup> )
<b>Dorsum pedis skin</b>			
Normal	869.65±150.08	29.20±11.97	56.80±10.99
Carrageenan	2303.46±380.10**	295.60±16.30**	19.20±2.39**
Dexamethasone	1318.17±107.77**	110.80±25.39**	39.20±12.24**
LJE 0.3 g/kg	1703.58±208.33**	282.40±18.45	20.20±3.27
LJE 1.0 g/kg	1446.96±224.88**	164.60±23.83**	29.00±6.12*
<b>Ventrum pedis skin</b>			
Normal	595.59±53.71	19.00±5.24	35.20±4.97
Carrageenan	1386.70±157.00**	466.00±44.76**	12.20±2.17**
Dexamethasone	952.12±143.77**	193.40±20.60**	27.20±4.87**
LJE 0.3 g/kg	1110.19±127.14*	462.00±44.63	13.80±1.30
LJE 1.0 g/kg	897.19±231.21**	341.60±78.72**	24.80±5.26**

All values are expressed as mean ± SD of six rat hind paws (Significant as compared to normal group, \*\*p<0.01, significant as compared to carrageenan-treated group, ##p<0.01, #p<0.05).

## 고찰

芫蔚子 (Leonuri Fructus)는 순형과 (꿀풀과, Labiatae)에 속한 1년생 초본인益母草의 성숙한 종자를 채취하여 건조한 것으로, 풀과 종자가 充盛하고 密蔚하기 때문에 芫蔚이라 명명하였으며<sup>16,17)</sup>, 小胡麻, 芫玉子, 苦草子, 野黃, 野黃麻, 六角天麻, 益母草子, 芫鬱子 등<sup>1)</sup>으로 불리기도 한다. 芫蔚子は 活血調經, 涼肝明目<sup>18)</sup>의 효능으로 月經不調, 痛經, 經閉, 崩中帶下, 產後瘀血作痛, 肝熱頭痛, 目赤腫痛, 目生翳膜을 주치하며, 甘微寒無毒하다. 본 연구에서는 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포모델 및 carrageenan 유도 족부종 동물모델을 통하여 충울자 추출물의 항염증효과를 평가하였다.

충울자 추출물이 Raw 264.7 cell에 미치는 세포생존율을 평가한 결과, LJE는 단독처리 및 LPS와의 동시 처리에서 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. LJE의 NO 생성 저해 정도를 관찰한 결과, LJE 10, 30 μg/ml은 LPS에 의하여 증가된 NO의 생성량을 유의하게 감소시켰다. NO는 NOS에 의해 생성되며, 염증과정 중에는 과량의 NO가 생성되어 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 I형, II형, III형의 3종류가 있는데, 이 중 II형은 iNOS로 cytokine이나 LPS에

의해 세포에서 생성되며, iNOS는 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용한다<sup>19)</sup>. 3가지 NOS중 iNOS에 의한 NO 생성이 상대적으로 많으며 이는 염증반응에 핵심적 역할을 한다. 일반적인 대식세포, 내피세포, 심근세포 등에서 다량 생성되는 것으로 알려진 NO는 감염 박테리아를 죽이거나 중양을 제거하는 역할도 하지만, 통제되지 못한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 유발한다<sup>20-22)</sup>. NO는 L-arginine으로부터 iNOS에 의하여 생성되므로<sup>23)</sup>, LJE 10, 30 μg/ml가 iNOS 단백질의 발현을 조절할 수 있는지 평가하였다. LPS는 iNOS 단백질의 발현을 유의하게 증가시켰으나, LPS에 LJE 30 μg/ml를 전처리한 세포에서는 iNOS 단백질의 발현이 유의하게 감소한 것을 관찰할 수 있었으며, 이는 LJE의 NO억제는 iNOS의 억제에서 기인함을 의미한다.

한편, 대식세포는 LPS에 의해 다양한 TNF-α, IL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF 등의 cytokine, IL-8, MCP-1 등의 chemokine의 분비를 증가시킨다<sup>24)</sup>. 이 중 TNF-α는 pro-inflammatory cytokine으로서 단핵구, 대식세포, 비만세포 등으로부터 분비되며 많은 자가면역질환에 있어서 염증의 개시 및 유지에 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>25,26)</sup>. 1980년대 말 1990년대 초에 걸쳐 류머티스성 관절염은 TNF-α가 핵심적인 병리적 인자로 밝혀졌다. Anti-TNF-α 제제로 류머티스성 관절염에 대한 성공적인 임상시험 후, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriasis 등의 면역매개 염증질환에도 TNF-α가 관련되어 있음이 밝혀졌다<sup>27)</sup>. IL-1은 화상 등의 경우에 PG, leukotrienes, platelet-activating factor, NO 등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타내며<sup>28)</sup>, 특히 IL-1β는 단핵구, 대식세포, B림프구, 수지상세포 등에서 분비되며, T림프구의 활성화, B림프구의 성숙, 자연살해세포를 활성화하고 시상하부에 작용하여 발열을 유도한다<sup>26)</sup>. 본 연구에서 LPS는 Raw 264.7 cells에서 TNF-α와 IL-1β의 분비를 유의하게 촉진시켰으며, LJE는 TNF-α 및 IL-1β의 생성을 유의성있게 감소시켰다. 또한 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성되는 PGE<sub>2</sub> 역시 LJE는 유의하게 억제하였다.

또한, iNOS 및 염증성 cytokine의 발현에는 전사인자 NF-κB가 핵심적 역할을 하므로, 세포질에서 p-IκBa, 핵 내에서의 NF-κB의 발현을 평가하였다. 대식세포는 LPS 자극에 의해 I-κB kinase가 활성화되며 I-κBa의 인산화에 의해 I-κBa로부터 유리된 NF-κB가 핵으로 전위하여 iNOS, COX-2 등을 포함한 염증 매개 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 유도한다<sup>29)</sup>. LJE의 전처리는 세포질에서 LPS에 의해 증가된 p-IκBa의 발현을 유의하게 감소시켰으며, I-κBa의 발현은 유의하게 증가시켰다. LJE의 전처리는 핵분획에서의 NF-κB를 유의하게 감소시켜 NF-κB의 핵으로의 이동이 감소하였음을 관찰할 수 있었다. 이는 LJE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF-κB 신호 네트워크를 억제할 수 있음을 시사한다.

NF-κB의 활성화는 세포 내 다양한 신호분자에 영향을 주고 있으며, NF-κB의 활성화에 영향을 미치는 대표적인 신호가 MAPK이다<sup>24)</sup>. MAPK는 extracellular signal-regulated kinase

(ERK), p38 MAPK, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinases (SAPK)의 3종이 보고되고 있으며, JNK의 경우 I- $\kappa$ B kinase의 직접적인 인산화를 통하여 NF- $\kappa$ B 신호 네트워크를 활성화시키는 것으로 보고되었다<sup>30)</sup>. 이와 더불어 MAPK는 activator protein-1, activating transcription factor-2, cAMP-responsive element binding protein을 포함한 다양한 전사인자들의 활성화에 관여하는 핵심 신호전달 분자이다<sup>31)</sup>. 본 연구에서는 LPS에 의해 증가하는 3종의 MAPK 인산화가 LJE 10, 30  $\mu$ g/ml의 전처치에 의해 감소하였으며, 이러한 결과는 LJE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 MAPK 신호 네트워크를 억제할 수 있음을 시사한다.

LJE가 *in vitro*에서 염증억제작용이 있음을 확인하고, *in vivo*에서 carrageenan으로 유도된 rat의 발 부종에 대한 LJE의 염증억제효과를 평가하였다. Carrageenan의 국소적용은 염증세포 침윤을 동반한 급성부종을 초래하고, 조직학적으로는 투여부위에 국소적 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 부종이 관찰되는 것으로 알려져 있다<sup>10,32)</sup>. Paw edema를 측정한 결과, LJE 0.3 g/kg를 투여한 군에서는 3, 4시간에 각각 유의한 발부종 억제를 나타내었으며, LJE 1.0 g/kg를 투여한 군에서는 2, 3, 4시간에서 유의성 있는 발부종 억제를 나타내었다. 조직평가에 있어서도 carrageenan은 침윤 염증세포의 현저한 수적 증가 및 부종성 변화에 의한 발등 및 발바닥의 피부 두께가 증가되었으며, 이러한 급성 부종성 소견 및 염증세포 침윤은 dexamethasone 및 LJE 투여에 의해 유의성 있게 현저히 억제되었다. 또한, carrageenan에 의한 비만세포의 수적 감소 및 탈과립 현상이 dexamethasone 및 LJE 투여에 의해 유의성 있게 억제된 점은 LJE가 비만세포의 탈과립을 조절하여, 국소 항염 효과를 나타내는 직접적인 증거로 판단된다.

## 결 론

본 연구에서는 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 LPS에 의해 활성화된 염증 매개 유전자와 관련 신호 네트워크의 변화에 菴蔚子 에탄올 추출물이 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

菴蔚子 에탄올 추출물 (LJE)은 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 증가한 NO 생성을 억제하였으며, NO 생성에 관계되는 iNOS의 발현을 억제하고, LPS에 의해 유도된 염증성 cytokine 류의 생성을 억제하였다. 또한 LJE는 LPS에 의해 활성화된 NF- $\kappa$ B 신호 네트워크와 MAPK의 인산화를 억제하며, carrageenan으로 유도된 실험동물의 발부종 억제, 침윤 염증세포의 수적 감소 및 비만세포의 수적 감소를 나타내었다. 이상의 결과로 菴蔚子 에탄올 추출물의 항염증 효과를 확인할 수 있었으며, 이는 급성 염증성 질환에서 면역억제 및 소염작용을 통하여 천연물 면역조절제로서의 개발 가능성을 제시한다. 향후 다양한 염증연구 모델에서 菴蔚子에 관한 연구가 계속된다면 菴蔚子를 염증성 질환에 사용할 수 있는 객관적인 근거 확보에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 대구한의대학교 기원연구비 (2012-901-36)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울:도서출판 정담. pp 4327-4328, 1997.
2. 한의학대사전 편찬 위원회. 한의학대사전. 서울:도서출판 정담. p 1589, 1997.
3. Xiong, L., Peng, C., Zhou, Q.M., Wan, F., Xie, X.F., Guo, L., Li, X.H., He, C.J., Dai, O. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. *Molecules*. 18(1):963-973, 2013.
4. 이영중, 김선제, 한효상. 익모초(益母草)와 총울자(菴蔚子)의 고지혈증(高脂血症) 억제 효능. *대한본초학회지* 25(3):73-80, 2010.
5. Yang, X., Li, J., Li, X., She, R., Pei, Y. Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides*. 27(12):3122-3128, 2006.
6. Li, Y., Chen, Z., Feng, Z., Yang, Y., Jiang, J., Zhang, P. Hepatoprotective glycosides from *Leonurus japonicus* Houtt. *Carbohydrate Research*. 348: 42-46, 2012.
7. Abbas, A., Kumar, V., Fausto, N. Robbins & Cotran Pathologic Basis of disease. 8th ed. Philadelphia:W.B. Saunders. pp 44-56, 2011.
8. 전용필, Mohammad Lalmoddin Mollah, 박창호, 홍주현, 이기동, 송재찬, 김길수. Raw 264.7세포에서 lipopolysaccharide로 유발시킨 염증반응에 대한 *Bulnesia sarmienti* 열수추출물의 억제효과. *Journal of Life Science*. 19(4):479-485, 2009.
9. 박상미, 조용걸, 이종록, 이철원, 김학주, 권영규, 김상찬. 모려로부터 추출된 conchiolin의 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서의 항염증 효과. *동의생리병리학회지* 22(4):878-883, 2008.
10. Kim, Y.W., Zhao, R.J., Park, S.J., Lee, J.R., Cho, I.J., Yang, C.H., Kim, S.G., Kim, S.C. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *British Journal of Pharmacology*. 154(1):165-173, 2008.
11. 국윤범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지* 10(1):113-129, 2002.
12. Lee, Y.S., Kim, H.S., Kim, S.K., Kim, S.D. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *Journal of*

- Microbiology and Biotechnology. 10: 8-15, 2000.
13. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *Journal of Immunology*. 144: 1425-1431, 1990.
  14. Di Rosa, M. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 24: 89-102, 1972.
  15. Holt, S., Comelli, F., Costa, B., Fowler, C.J. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*. 146: 467-476, 2005.
  16. 이상인. 본초학. 서울, 수서원, pp 453-454, 1981.
  17. 한대석. 한국전통과학기술의 국제화에 관한 연구. 한국과학재단 연구보고서. p 13, 1997.
  18. 신민교. 임상본초학. 서울, 영림사, p 529, 1997.
  19. Yun, H.Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M. Neurobiology of nitric oxide. *Critical Reviews in Neurobiology*. 10: 291-316, 1996.
  20. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in Raw 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 76: 119-123, 2001.
  21. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in Raw 264.7 macrophages. *Life Sciences*. 69: 625-635, 2001.
  22. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated Raw 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *The American Journal of Chinese Medicine*. 28: 217-226, 2000.
  23. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333: 664-666, 1988.
  24. Guha, M., Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling*. 13(2):85-94, 2001.
  25. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by sauchinone effects on I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British Journal of Pharmacology*. 139: 11-20, 2003.
  26. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 37(6):355-361, 2003.
  27. Taylor, P.C., Williams, R.O., Feldmann, M. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Current Opinion in Biotechnology*. 15: 557-563, 2004.
  28. Takabayashi, T., Shimizu, S., Clark, B.D., Beinborn, M., Burke, J.F., Gelfand, J.A. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery*. 135(5):544-554, 2004.
  29. Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell*. 78(5):773-785, 1996.
  30. Ki, S.H., Choi, M.J., Lee, C.H., Kim, S.G. Galphai2 specifically regulates COX-2 induction by sphingosine 1-phosphate. Role for JNK-dependent ubiquitination and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*. 282: 1938-1947, 2007.
  31. Dong, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. MAP kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology*. 20: 55-72, 2002.
  32. Beloeil, H., Ababneh, Z., Chung, R., Zurakowski, D., Mulkern, R.V., Berde, C.B. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. *Anesthesiology*. 105: 128-138, 2006.