

敗醬 물 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 mouse 염증모델에서 cytokine 및 NF-κB의 활성화에 미치는 효과

¹원광대학교 한의과대학 부인과학교실, ²원광대학교 의과대학 산부인과학교실
류익한¹, 조해중², 송미화¹, 최창민¹

ABSTRACT

Effects of *Patrinia Scabiosaefolia* Aqueous Extract on Cytokine and NF-κB Activation in LPS-induced RAW 264.7 Cells and Mouse

Ik-Han Ryu¹, Hae-Joong Cho², Mi-Hwa Song¹, Chang-Min Choi¹

¹Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Won-Kwang University

²Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Won-Kwang University

Objectives: The object of this study was to identify the anti-inflammatory effects of *Patrinia scabiosaefolia* aqueous extract (PSE).

Methods: RAW 264.7 cells were pre-treated with PSE and then incubated with or without lipopolysaccharide (LPS). Cell viability, production of nitric oxide (NO), secretion of pro-inflammatory cytokine, activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) were measured. In addition, we observed mice survival rate after LPS and their cytokine levels of serum. We also observed inflammatory and hemorrhagic change on the histological sections of the liver.

Results: PSE inhibited LPS-induced NO production, interleukin (IL)-6 secretion, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and NF-κB activation. In addition, PSE reduced the death rate of LPS-induced mice and IL-6 production on the serum of mice. PSE inhibited inflammation and hemorrhage on liver tissue as well.

Conclusions: The results suggest that PSE have anti-inflammatory effects by inhibited NF-κB and JNK activation, IL-6 secretion, and NO production. So PSE may be effective treatment for the inflammatory disease.

Key Words: *Patrinia Scabiosaefolia* (PS), Inflammation, NO, Cytokine, MAPKs, NF-κB

I. 서 론

염증 반응은 조직에 가해진 손상을 회복하기 위한 일련의 과정으로, 이 과정에서 부종, 발적, 열, 통증, 기능상실 등이 나타나며, 이를 해소하기 위해 다양한 약물들이 개발되었다. 현재 사용되고 있는 약물들은 위장관계 및 심혈관계 등에 부작용을 보여, 이를 대체하기 위한 효과적이고 부작용이 없는 새로운 약물의 개발이 필요한 실정이다¹⁻³⁾.

패장(敗醬)은 패장과(미타리과: Valerianaceae)에 속한 多年生草本으로 썩는 냄새가 있기에 敗醬이라는 이름이 생겼다고 한다. 淸熱解毒 消癰排膿 活血行瘀 등의 효능이 있어 腸癰, 肺癰, 瘡癰, 腫毒, 胸腹疼痛 등의 병증을 치료하며, 鎮靜, 抗菌 및 抗病毒 작용 등이 있다고 하였다⁴⁻⁶⁾.

지금까지 보고된 패장에 관한 연구로는 기원^{7,8)}, 급성 췌장염⁹⁾, 골반염증성 질환¹⁰⁾, 부종¹¹⁾ 등을 포함한 항염증 작용¹²⁻⁶⁾, 전립선암^{17,18)}, 대장암¹⁹⁾ 등을 포함한 항암 작용²⁰⁻²⁾, 골관절염²³⁾, 막성신증²⁴⁾, 천식²⁵⁾ 등에 관한 연구 등이 보고되었다.

부인과 영역에 있어 帶下를 유발할 수 있는 염증성 질환이나 골반염증성질환에 주로 활용되고 있으며, 기존의 연구에서 패장이 항염증 효과가 있음이 보고되었으나, 염증을 억제하는 기전에 대한 체계적인 연구는 부족한 실정이다. 이에 저자는 패장의 항염증 작용을 究明하기 위하여 *in-vitro*와 *in-vivo* 실험을 진행하였다. 패장 물 추출물(*Patrinia scabiosaefolia* Aqueous Extract, PSE)이 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide(NO), interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor alpha(TNF- α)의

생성과 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) family인 extracellular signal-regulated kinase1/2(ERK1/2), p38 kinases (p38), c-Jun NH2-terminal kinase(JNK)와 nuclear factor-kappa B(NF- κ B)의 활성화에 미치는 영향을 관찰하고, 마찬가지로 LPS로 자극한 mouse의 생존률, cytokine 발현, 간조직의 염증 및 출혈 반응에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

패장은 (주)음니허브(영천, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 패장 물 추출물(*Patrinia scabiosaefolia* aqueous extract, PSE)을 얻기 위해 증류수 1 l에 패장 100 g을 넣고 150분 동안 전탕하여 여과한 후, 동결 건조시켰다. 16.8 g의 분말을 얻었으며, 수율은 16.8%였다. 분말은 -80 $^{\circ}$ C에 보관하고 실험 시 3차 증류수에 녹여 필터한 후 사용하였다.

2) 시 약

Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, RPMI Medium 1640 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, Chloroform, TRI-zol, Acrylamide, Sodium dodesyl sulfate(SDS), Tris-HCL, LPS 등의 시약은 SIGMA(St.Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK, anti-phospho-p38은 Cell Signaling(MA, USA)사에서 구입하였고, Anti-inhibitory kappa B alpha (I κ -Ba)는 Santa Cruz(CA, USA)사에서

구입하였다. 모든 시약은 분석용 등급 이상을 사용하였다.

3) 세포주

Mouse의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)에서 분양받았다. 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지에서, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포를 배양하였다.

4) 실험동물

모든 실험동물은 원광대학교에서 정해 놓은 동물관리규정에 따라 관리되었다. 실험에 사용한 C57BL/6 Mouse(체중 15-20 g, female)는 오리엔트 바이오(성남, 대한민국)에서 구입하였다.

2. 연구 방법

1) MTT assay

RAW 264.7 세포의 생존율은 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 3-(4,5-Dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 환원을 바탕으로 측정하였다. 세포들을 RPMI-1640 배지에서 2×10^5 /ml의 밀도로 현탁하고, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml의 농도로 PSE를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤, MTT 용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. 생성된 MTT-formazan은 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 용해하고, 용해액을 96-well plate에 loading한 후, spectrophotometer(MD, USA)를 사용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정하였다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다.

[viability(%) = $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$]

2) NO 농도의 측정

NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다. NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulin과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(Griess reagent: 0.5% sulphanilamide, 2.5% phosphoric acid 및 0.5% naphthylethylenediamide)은 아질산염과 반응하여 보라색의 아조염을 형성하는데, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 NO의 농도를 계산하였다. 세포들을 RPMI-1640 배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하고, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml의 농도로 PSE를 처리하였다. 1시간 후, LPS(500 ng/ml)로 자극하여 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 µl의 그리스 시약을 첨가하고, 혼합물의 흡광도를 spectrophotometer로 540 nm에서 측정하였다.

3) Cytokine(IL-1β, IL-6, TNF-α) 측정

Cytokine 생성에 미치는 PSE의 효과를 알아보기 위하여, RAW 264.7 세포를 PSE(0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 1시간 전 처리한 후, LPS(500 ng/ml)로 24시간 동안 자극하였다. cytokine의 염증매개물질은 세포 상층액에서 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 정량하였다. ELISA는 Mouse ELISA kit for IL-1β, IL-6, TNF-α를 BD pharmingen (CA, USA)에서 구입하여 시행하였다.

4) RNA 추출

Total RNA는 Easy Blue(Intron Biotechnology, USA) 시약을 사용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 PSE(0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml)를 1시간 전 처리한 뒤, LPS(500 ng/ml)로 자극하여 24시간 동안

배양하였다. 배양한 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척한 다음, PBS를 1 ml씩 가해 세포를 포집하였다. 포집한 세포를 원심분리하여 PBS는 제거하고 바닥에 남은 세포에 Easy Blue 용액 1 ml를 넣어서 용해시켰다. 여기에 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 섞어 준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여, 상층액은 버리고 남은 침전물을 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 건조된 침전물에 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어

RNA를 용해시키고 정량하였다.

5) 실시간 정량적 역전사 중합 효소 연쇄반응(Quantitative RT-PCR)

mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, Real time PCR master mix 4 μ l(Roche, Switzerland), primer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응 시켰다. PCR 조건은 92 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초, 그 후에 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 40 cycle로 하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 forward(f)와 reverse(r) primer 및 TaqMan probe는 Roche에서 합성하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

Table 1. Primer for Quantitative RT-PCR

Gene	Primer
IL-1 β	5' -TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3' (forward)
	5' -GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3' (reverse)
	Universal probe, M15131.1V (probe)
IL-6	5' -TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3' (forward)
	5' -GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3'(reverse)
	Universal probe, M20572.1V (probe)
TNF- α	5' -TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3' (forward)
	5' -ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3' (reverse)
	5' -CCC GAC TAC GTG CTC CTC ACC CA-3' (probe)

6) Western blot analysis

RAW 264.7 세포를 60 mm culture dish에 5 \times 10⁶ cells/dish로 배양하고 serum free media(RPMI 1640)에서 12시간 starvation 시킨 후, PSE(0.5 mg/ml)를 1시간 전 처리 하고 LPS(500 ng/ml)로 자극하여 0, 15, 30, 60분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 세포를 획득하였다. 이를 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer(RIPA buffer 1 ml+phosphatase

inhibitor 10 μ l+protease inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis시키고, 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 membrane에 옮기고 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. ERK1/2, JNK, p38의 phosphorylation과 I κ -Ba를 enhanced chemiluminescence detection 용액(Amersham, USA)으로 확인하였다.

mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 증합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, Real time PCR master mix 4 μ l(Roche, Switzerland), primer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응 시켰다. PCR 조건은 92°C에서 30초, 60°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초를 40 cycle로 하였다. 정량 증합 효소 반응에 쓰인 forward(f)와 reverse(r) primer 및 TaqMan probe는 Roche에서 합성하였다. 사용한 primer는 다음과 같다(Table 1).

7) mouse 모델 실험군 설정

실험실 환경에 적응시킨 mouse는 어떠한 처리도 하지 않은 정상군, LPS로 급성 염증을 유발한 대조군, PSE 투여 농도에 따라 PSE 0.1 mg/kg 투여군(PSE 0.1)과 1 mg/kg 투여군(PSE 1) 두 종류의 실험군을 설정하였다. 대조군과 실험군을 실험 횟수별로 6마리, 6마리, 8마리로 나누어 총 3회, 군별 20마리씩 실험을 진행하였다.

In-vivo 실험에서 LPS 처리는 37.5 mg/kg 수준으로 동일하게 복강 주사하였으며, LPS 주사 1시간 전에 PSE를 두 실험군에 각각 0.1 mg/kg, 1 mg/kg 복강 주사 하였다. 주사 후 24시간 마다 mouse의 생존율을 조사하였다.

8) Mouse 혈청의 cytokine 측정

PSE(1 mg/kg)를 복강주사 한 후, 한 시간 뒤에 LPS(37.5 mg/kg)를 복강 주사하였다. 3시간 뒤에 mouse를 마취시키고, syringe를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 혈청만 분리한 후, ELISA법을 통해 cytokine을 측정하였다.

9) Mouse 간 조직의 조직학적 관찰 및 분석

PSE(1 mg/kg)를 복강주사 한 후, 한 시간 뒤에 LPS(37.5 mg/kg)를 복강 주사하였다. 3시간 뒤에 간 조직을 분리하여, 10% formalin 용액을 사용하여 고정시킨 다음, Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 시행하였다. 카메라를 부착한 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다. 조직 손상 정도는 면적을 통해 판단하였으며, 0=normal, absent; 1=uncommon, detectable; 2=multifocal, moderate; 3=extensive, severe으로 설정한 후, 임상병리사 세 명의 blind test를 통해 평가하였다.

3. 통계 처리

모든 실험은 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D.로 나타내었다. 결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석 프로그램의 one way ANOVA에 준하였고, p-value<0.05 일 경우 유의한 것으로 판정하였다. 이상의 통계 처리는 SPSS for windows 12.0을 사용하였다.

III. 결 과

1. 세포독성

PSE 무처리군의 생존율을 100%로 설정하였을 때, PSE 0.1 mg/ml 처치군은 96.36 \pm 1.20%, 0.25 mg/ml 처치군은 94.65 \pm 0.58%, 0.5 mg/ml 처치군은 92.34 \pm 1.95%의 생존율을 보여 세포독성을 보이지 않았다. 반면 PSE 1 mg/ml 처치군은 17.54 \pm 3.53%의 생존율을 보여 무처리군과 유의한 차이를 보였다(Fig. 1).

PSE 1 mg/ml의 농도는 세포독성을 나타내어 차후 *in-vitro* 실험에서 제외하였다.

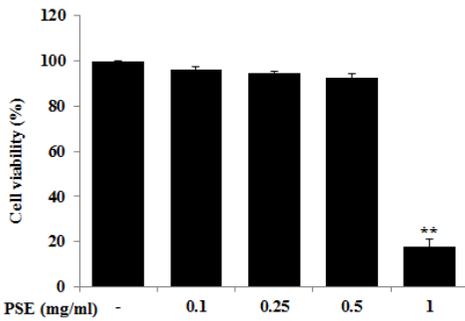


Fig. 1. The cytotoxicity of PSE in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with or without PSE as indicated concentrations. After 24 hrs, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

**p<0.001 : in comparison with saline

2. NO 생성에 미치는 영향

NO의 농도는 LPS로 자극하지 않은 무처치군에서 1.43 ± 0.21 μ M이었으며, LPS로 자극한 경우 11.02 ± 1.05 μ M로 증가하였다. PSE 0.1 mg/ml 처리군에서는 8.45 ± 1.10 μ M, 0.25 mg/ml 처리군에서는 7.20 ± 1.04 μ M, 0.5 mg/ml 처리군에서는 4.85 ± 0.77 μ M으로 PSE는 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2).

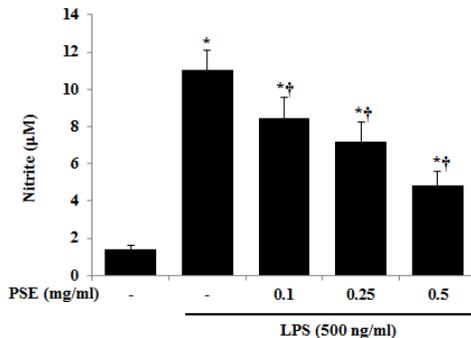


Fig. 2. The inhibitory effect of PSE on LPS-induced NO production.

The cells were pre-treated with PSE as indicated concentrations for 1 hr, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 hrs.

Detail methods were described in Materials and Methods.

NO release was measured by the method of Griess. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

*p<0.05 in comparison with saline

†p<0.05 in comparison with LPS alone

3. IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성에 미치는 영향

LPS 자극은 RAW 264.7 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 증가시켰으며, PSE는 IL-1 β , TNF- α 의 생성을 억제하지 못하였다. IL-6의 농도는 무처치군에서는 0.26 ± 0.06 ng/ml, LPS 자극시 67.81 ± 2.56 ng/ml으로 증가 하였다. PSE 0.1 mg/ml 처리군에서는 56.35 ± 5.38 ng/ml, PSE 0.25 mg/ml 처리군에서는 39.46 ± 0.65 ng/ml, 0.5 mg/ml 처리군에서는 26.19 ± 1.95 ng/ml으로 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, PSE 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도에서 통계적인 유의성이 있었다(Fig. 3).

4. mRNA 수준에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성에 미치는 영향

IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA를 측정 한 결과 LPS 자극은 mRNA의 발현을 증가시켰으며, PSE는 IL-1 β , TNF- α 에서 유의한 효과를 보이지 않았다. IL-6에서는 무처치군의 mRNA 양을 1로 설정하였을 때, LPS 자극시 62.17 ± 3.51 으로 증가하였으며, PSE 0.1 mg/ml 처리군에서는 56.39 ± 5.07 , PSE 0.25 mg/ml 처리군에서는 39.47 ± 3.37 , 0.5 mg/ml 처리군에서는 28.96 ± 2.96 으로 IL-6의 mRNA 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, PSE 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도에서 통계적인 유의성이 있었다(Fig. 4).

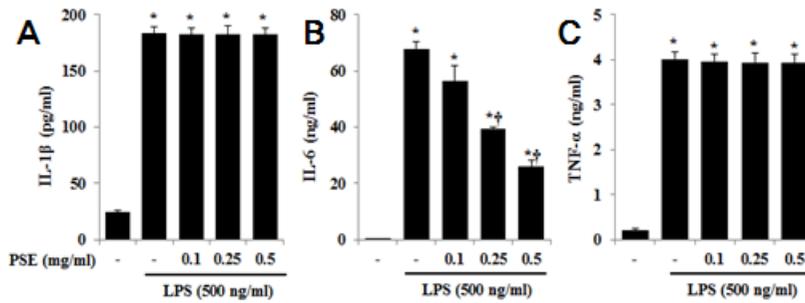


Fig. 3. Effects of PSE on the production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in RAW 264.7 cells.
 A. Effects of PSE on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cells
 B. Effects of PSE on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells
 C. Effects of PSE on the production of TNF- α in RAW 264.7 cells
 The cells were pre-treated with PSE as indicated concentrations for 1 hr, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 hrs. Detail methods were described in Materials and Methods. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.
 *p<0.05 in comparison with saline
 †p<0.05 in comparison with LPS alone

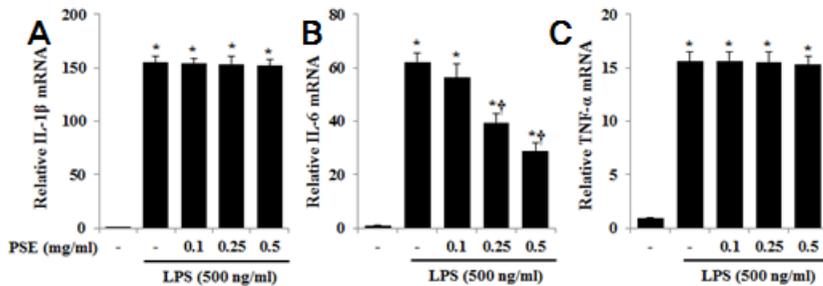


Fig. 4. Effects of PSE on the mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in RAW 264.7 cells.
 A. Effects of PSE on the mRNA expression of IL-1 β in RAW 264.7 cells
 B. Effects of PSE on the mRNA expression of IL-6 in RAW 264.7 cells
 C. Effects of PSE on the mRNA expression of TNF- α in RAW 264.7 cells
 The cells were pre-treated with PSE as indicated concentrations for 1 hr, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 hrs. Detail methods were described in Materials and Methods. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.
 *P<0.05 : in comparison with saline
 †P<0.05 : in comparison with LPS alone

5. MAPKs 및 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

MAPKs family인 ERK, JNK, p38의 활성화는 각각의 인산화를 통해 이루어지며, NF- κ B의 활성화는 I κ -B α 의 분해에 의존한다. LPS 단독으로 자극한 경우와 PSE를 전 처리한 후 LPS로 자극한 경우를 각각 시간 단위로 측정된 결과 PSE는 LPS에

의한 ERK1/2, p38의 인산화는 억제하지 못하였으나 JNK의 인산화는 억제하였다. 또한 I κ -B α 분해를 억제하여 NF- κ B의 활성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 앞선 실험에서 가장 유의성 높은 결과를 나타낸 PSE 0.5 mg/ml의 농도로 실험을 시행하였다.

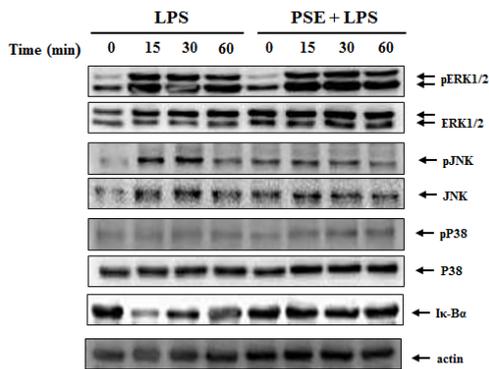


Fig. 5. Effects of PSE on the activation of MAPKs and NF- κ B in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were pre-treated with PSE (0.5 mg/ml) for 1 hr, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for indicated mins. Detail methods were described in Materials and Methods. The

results shown are representative of three independent experiments.

6. Mouse 모델의 생존율에 미치는 영향

LPS(37.5 mg/kg)를 복강주사 한 후, 하루 단위로 생존율을 관찰한 결과, LPS 단독 처리군은 2일 이후로 15%의 생존율을 보였으며, PSE 0.1 mg/kg 투여군(PSE 0.1)에서는 3일 이후로 30%의 생존율을 보였고, PSE 1 mg/kg 투여군(PSE 1)에서는 4일 이후로 50%의 생존율을 보여 PSE 투여는 mouse의 생존율을 증가 시켰다(Fig. 6).

차후 실험은 더 높은 유의성을 나타낸 1 mg/kg의 농도로 실험을 진행하였다.

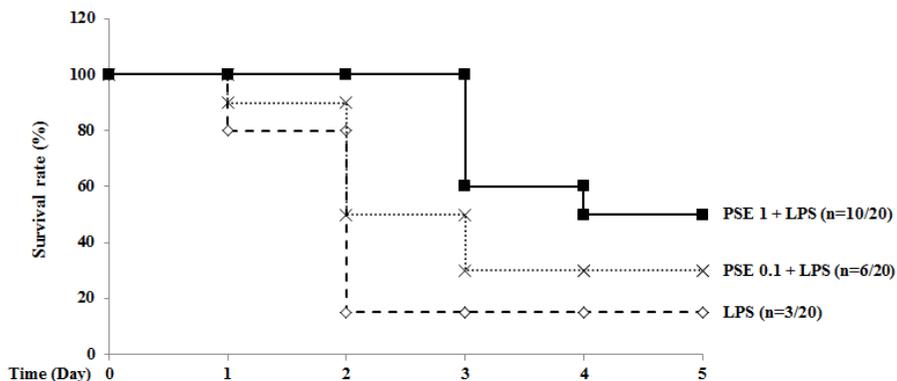


Fig. 6. Effects of PSE on the survival rate of mice.

The mice were pre-intraperitoneal injected with PSE for 1 h, and then intraperitoneal injected with LPS (37.5 mg/kg). After 2 days, survival rate of only-LPS-treated group was 15%. But after 3 days, the survival rate of PSE 0.1 was 30%, and after 4 days, the survival rate of PSE 1 was 50%. The number of mice of each group was 20.

7. Mouse 혈청 cytokine 생성에 미치는 영향

RAW 264.7세포에서 cytokine 생성 결과와 동일하게 IL-1 β , TNF- α 생성에는 유의한 영향을 미치지 않았으며, IL-6 생성은 LPS 처리군의 882.27 \pm 10.26 pg/ml에 비해 PSE 1 mg/kg 투여군에서 556.05 \pm 11.52 pg/ml으로 유의하게 감소되었다(Fig. 7).

8. Mouse 간 조직 손상에 미치는 영향

간 조직의 염증 정도는 무처리군 0.43 \pm 0.12에 비해, LPS 처리군은 2.57 \pm 0.12로 유의하게 증가하였으며, PSE 1 mg/kg 투여군에서는 1.27 \pm 0.06으로 LPS 처리군에 비해 유의하게 감소하였다. 간 조직의 출혈 정도는 무처리군 0.50 \pm 0.00에 비해 LPS 처리군은 2.58 \pm 0.14으로 유의하게 증

가하였으며, PSE 1 mg/kg 투여군에서는 0.90±0.26으로 LPS 처리군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

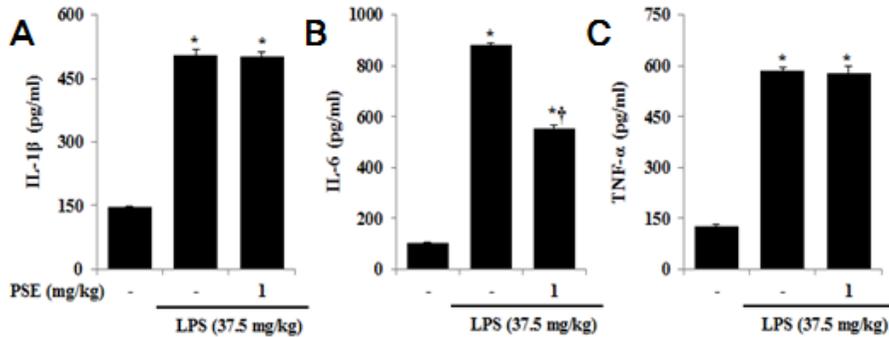


Fig. 7. Effects of PSE on the production of IL-1β, IL-6, and TNF-α in serum of mice.
 A. Effects of PSE on the production of IL-1β in serum of mice
 B. Effects of PSE on the production of IL-6 in serum of mice
 C. Effects of PSE on the production of TNF-α in serum of mice
 The serum of mice was pre-treated with PSE 1 mg/kg for 1 h, and then incubated with LPS (37.5 mg/kg) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. Data were given as means of values±SD from three independent experiments.
 *P<0.05 : in comparison with saline
 †P<0.05 : in comparison with LPS alone

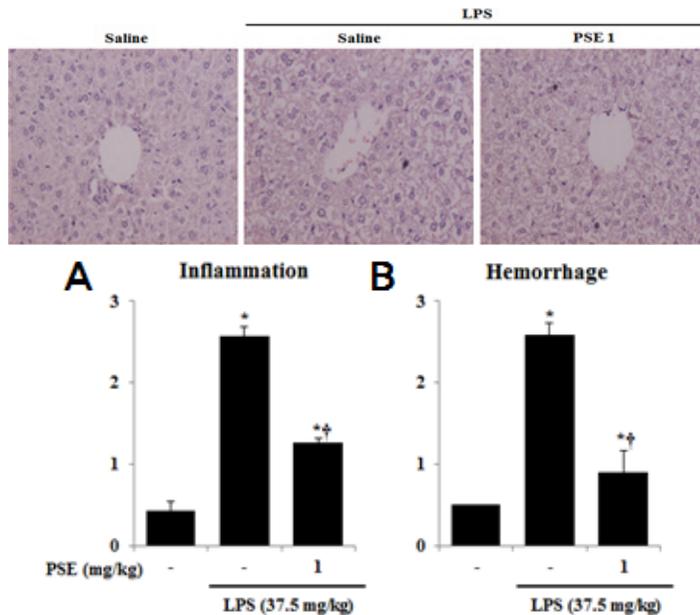


Fig. 8. Effects of PSE on the liver tissue of mice.
 A. Effects of PSE on the inflammation of liver tissue of mice
 B. Effects of PSE on the hemorrhage of liver tissue of mice
 Representative H & E stained sections of the liver tissue in the normal mice given saline, in the control mice given LPS, and in mice given PSE 1 h before the first LPS injection. Histological sections of the liver were scored from 0 (normal) to 3 (severe) for inflammation and hemorrhage. These figures show representative images of experiment group. The score was calculated by three pathologists who were blinded.
 *P<0.05 : in comparison with saline.
 †P<0.05 : in comparison with LPS alone.

IV. 고찰

염증 반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 선천 면역 계통의 복합적인 반응으로 병원체가 피부 및 점막과 같은 방어벽을 파괴하고 침입하면, 조직손상을 통해 유도된다. 이러한 염증 반응은 조직에 가해진 손상을 회복하기 위한 일련의 과정으로 생명체가 외부자극에 대한 자기보호를 목적으로 혈관, 신경, 체액 및 세포를 이용하여 손상을 국소화 시키고 제거하는 것을 의미한다^{1,26,27}.

염증 반응은 감염과 상처 치유에 중요한 역할을 하지만 생체 내에서 통제되지 않은 염증 반응은 다양한 염증성 질환을 유발할 수 있다. 현재 염증성 질환에 가장 널리 사용되는 NSAID의 경우 위장관계의 부작용을 나타내며, 이를 개선하기 위해 개발된 COX-2 선택적 길항제 또한 심장마비나 뇌졸중과 같은 심각한 심혈관계 부작용을 보였다. 이러한 부작용 이외에도 지속적으로 약물에 대한 저항성이 나타나고 있어, 이를 대체할 만한 새로운 약물의 개발이 필요한 실정이다^{1,2}.

패장(敗醬)은 두갈나물(*Patrinia villosa* JUSS.)과 마타리(*Patrinia scabiosaefolia* FISCH. ex LINK)를 그 기원으로 하며, 두갈나물은 백화패장(白花敗醬), 마타리는 황화패장(黃花敗醬)으로 각각 명명한다. 그 구성 성분은 마타리에는 patrinoside, scabioside, oleanolic acid, hederagenin, β -sitosterol- β - δ -glucopyranoside, campesterol- δ -glucoside, scopoletin, esculetin, 정유 8%, alkaloid, tannin, 전분 등이 함유되어 있으며, 두갈나물에는 정유 및 villoside, morroniside, loganin, villosol, villosolside,

palmitic acid, inistol 등이 함유되어 있다^{4,6}.

패장은 맛은 쓰고 성질은 평하며, 열을 내리고 해독하며 膿을 배출시키고, 瘀滯를 삭이는 효능이 있어 腸癰(충수염 등), 설사, 적백 대하, 산후 瘀滯 복통, 目赤腫痛, 癰腫疥癬을 치료한다고 하였다. 또한 유행성 이하선염의 치료에 효과가 있으며, 癰, 癤, 유선염, 림프절염 등에 대해서도 효과가 있다고 밝혀져 있다⁶. 부인과 질환에 있어 패장을 사용한 처방에는 復方紅藤敗醬散²⁸, 薏苡附子敗醬散⁶, 敗醬煎²⁹ 등이 있으며 주로 골반염증성 질환에 사용되었다.

골반염증성질환은 박테리아 혹은 드물게 바이러스 감염에 의해 자궁경 상부의 생식기에 염증이 야기된 질환으로, 예를 들어 자궁내막염, 난관염, 난소 주위염 또는 난소 농양 등이나 그로 인한 골반내복막염 등을 총칭한다. 이 질환은 급성 질환으로 인한 모든 증상 뿐 아니라, 난관 인자의 불임증 및 만성 골반염, 만성 골반통 등과 같은 장기적인 후유증을 유발할 수 있다는 점에 그 중요성이 있다³⁰.

최근 다양한 한약재들에 관한 비교 연구에서 패장이 다른 청열약류와 비교하여 우수한 항균활성을 나타냈다는 보고¹⁶가 있으며, 패장에 관한 다양한 연구들이 이루어지고 있으나 항염증 작용의 기전에 대한 체계적인 연구 및 *in-vivo* 연구는 부족한 실정이다. 이에 저자는 한의학 임상에서 적용 가능한 패장 물 추출물(PSE)을 사용하여 *in-vivo*와 *in-vitro* 실험을 진행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

첫째, PSE는 농도 의존적으로 NO 생성을 억제함으로써 염증 반응을 억제함을 확인할 수 있었다.

대식세포는 LPS, 다른 세포들에 의해 분비된 cytokine 등 다양한 자극에 의해 활성화되며, 다양한 cytokine들의 분비를 통해 전반적인 염증 반응을 활성화시키며, 급성기 반응을 촉진한다. 활성화된 대식세포는 높은 수준의 유도성 산화질소 합성효소(iNOS)를 발현하며, 이 효소는 arginine을 산화시켜 citrulline과 NO를 생산한다. NO와 이로부터 유래된 물질들은 세균, 곰팡이, 기생충 및 원충류 감염에 대한 대식세포의 항미생물 활성의 상당부분을 담당하는 것으로 알려졌다¹⁾.

일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있으며, 출혈이나 심부전, 심하면 패혈성 쇼크(septic shock)를 유발하게 된다³¹⁻⁵⁾.

둘째, 이 연구를 통해 PSE는 cytokine 중 IL-6의 생성을 mRNA 수준에서 억제함으로써 항염증 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

염증 반응에 있어서 사이토카인의 분비는 중요하며, 이 중 가장 중요한 세 가지는 TNF- α , IL-1, IL-6이다. 감염이나 조직손상부위에서 분비되는 TNF- α , IL-1, IL-6 등의 사이토카인은 혈관내피세포, 백혈구, 골수에 다양한 영향을 미쳐 감염과 싸우고 손상조직을 복구하는 세포들이 국소적으로 모여들게 한다³⁾.

TNF- α 는 급성염증 반응을 주로 매개하며, 국소 염증 반응이 유발될 때 내피세포와 백혈구에 작용하여 감염을 저지시킨다. TNF- α 와 비슷한 기능을 하는

IL-1의 분비를 자극하고, NF- κ B와 AP-1과 같은 전사인자들을 활성화시키거나 세포자멸사를 유발한다. 종양괴사인자라는 이름은 초기에 종양을 괴사시키는 혈청내 물질이라는 의미에서 붙여졌으나 지금은 그것이 국소 염증 반응과 종양혈관의 혈전형성에 의한 결과임이 알려졌으며, 림포독신이라 불리는 TNF- β 와 구별하기 위해 TNF- α 라고 불리진다. TNF- α 는 과량 생성시 전신적인 비정상을 야기한다. 다량의 TNF- α 가 생성되면 현저한 혈압 강하 또는 쇼크를 일으키며, 혈관내 혈전 형성을 야기하고 혈관 막힘이 초래된다. 또한 생명을 위협할만한 수준까지 혈당 농도를 강하시키는 심각한 대사장애를 일으키고, 중증 감염의 전신적 합병증을 유발하기도 한다^{1,3)}.

IL-1은 급성단계 염증 반응의 또 다른 매개자인데 대부분 TNF- α 와 유사한 작용을 한다. 하지만 TNF- α 와 달리 세포자멸사를 일으키지 않고, 고농도에서도 패혈 쇼크의 병태생리학적 변화를 일으키지 않는다. IL-1은 IL-1 α 와 IL-1 β 두 종류가 있는데 주요한 생물학적 활성을 가지는 분비형은 IL-1 β 이다. IL-1은 농도에 따라 국소적 혹은 전신적 반응을 매개한다. 농도가 낮은 경우는 국소적 염증 반응에 관여하며, 다량으로 분비되면 혈류로 들어가 내분비 기능을 나타낸다. 또한 NF- κ B와 AP-1 전사인자를 활성화시키며, MAPKs 활성화와 연관되어 있다^{1,3)}.

IL-6는 급성염증 반응에서 중요한 사이토카인 중의 하나로 국소적 작용과 함께 전신적 작용을 수행하는데, 간에서 다른 많은 염증매개자의 합성을 유도하고, 골수에서는 호중구의 생성을 자극하고, IL-17을 생산하는 T 도움세포를 분

화시킨다. IL-6는 단핵포식세포, 혈관내피세포, 섬유모세포와 그 밖의 세포에서 IL-1과 TNF- α 에 반응하여 생성된다^{1,3)}.

셋째, PSE가 NO 및 IL-6의 생성을 억제하는 기전은 JNK와 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 이루어지는 것으로 사료된다.

Cytokine의 분비는 MAPKs와 NF- κ B에 의해 조절 된다^{36,37)}. MAPKs는 세포의 증식, 분화 그리고 세포의 생존과 사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있으며, 염증성 사이토카인의 생성에 관여한다. 포유류에는 세 가지의 소그룹(ERK1/2, JNK, p38)이 있으며, 각 MAPK는 인산화를 통해 활성화됨으로서 염증 매개물질 생성을 유도하게 된다³⁸⁻⁴³⁾.

NF- κ B는 염증, 림프구 활성화, 세포 생존, 이차림프기관의 형성에서 중심 역할을 하는 전사인자로 평상시에는 I κ -Ba라는 NF- κ B 억제자에 결합한 상태로 세포질에 존재한다. I κ B kinase(IKK)는 I κ -Ba를 인산화하여 분해되게 하는데, I κ -Ba가 분해되면 활성화된 NF- κ B가 핵으로 들어간다³⁾.

본 연구에서 *in-vivo* 실험 결과로 볼 때, LPS 투여는 mouse에서 염증 반응을 유발하여 생존율을 저하시키며, PSE는 이를 억제함으로써 mouse의 생존율을 증가시킨 것으로 보인다. 실제로 혈청에서 IL-6 생성이 억제됨을 확인함으로써 *in-vitro* 실험 결과와 동일함을 확인하였다.

PSE의 항염 작용의 기전을 확인하기 위하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성, 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성 및 MAPKs, NF- κ B의 활성을 확인하였으며, mouse 염증 모델에서 mouse의 생존율과 cytokine의 생

성 및 간 조직에서의 염증 및 출혈 정도를 확인하였다. 실험결과 NO의 생성이 억제되었으며, IL-6의 생성 및 JNK, NF- κ B의 활성이 억제되었다. 또한 mouse의 생존율을 증가 시켰고, mouse 혈청에서 IL-6의 생성을 억제하였으며, 간 조직에서 염증 및 출혈 정도를 감소시켰다.

이상의 결과를 종합하여 보면 PSE는 JNK와 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 IL-6와 NO의 생성을 억제하는 일련의 항염증 효과를 지니고 있는 것으로 판단되며, 이러한 항염증 효과는 동물 실험에서도 유효함이 확인되었다. 폐장 단미만으로도 항염증 효과를 나타냄으로써 폐장을 통한 새로운 약물 개발의 가능성을 확인할 수 있었으며, 특히 물 추출물로 효과를 나타낸 만큼 탕제뿐만 아니라 약침제제로의 투여 등 향후 부인과 영역에 있어 대하를 유발하는 염증성 질환이나 골반염증성 질환 등에 대해 실제 임상에서 다양하게 활용될 수 있는 근거를 제시하였다고 사료된다. 다만 실험에서 고농도의 PSE는 세포독성을 나타낸 만큼 실제 활용에 있어 치료 용량 선정에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 mouse 염증모델에서 폐장 물 추출물(PSE)의 항염증 효과를 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RAW 264.7 세포에서 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml 농도 모두 세포독성을 나타내

지 않았으나, 1 mg/ml에서는 세포독성을 나타냈다.

2. RAW 264.7 세포에서 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml 농도에서 농도 의존적으로 NO의 생성을 유의하게 억제하였다.
3. RAW 264.7 세포에서 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 유의하게 억제시켰으나, IL-1 β , TNF- α 에서는 유의한 결과를 얻지 못하였다. mRNA 수준 연구 또한 유사한 결과를 보였다.
4. RAW 264.7 세포에서 p38, ERK1/2의 인산화를 억제하지 못하였으나, JNK의 인산화 및 NF- κ B의 활성을 억제하였다.
5. Mouse 모델에서 5 day 시점에 PSE 0.1 mg/kg 투여군 30%, PSE 1 mg/kg 투여군 50%의 생존율을 보였다.
6. Mouse 혈청의 cytokine에서 IL-6를 유의하게 억제시켰으나 IL-1 β , TNF- α 에서는 유의한 결과를 얻지 못하였다.
7. Mouse 간 조직에서 염증과 출혈 정도를 유의하게 억제하였다.

- Received : Apr 19, 2017
- Revised : Apr 26, 2017
- Accepted : May 22, 2017

Reference

1. Association of a section on microorganism · immunology. Immunology. Seoul:Lifescience. 2011:25, 34-6, 43-4, 165-8.
2. Park SH, et al. Immunology 12th. Paju:Kyobo publishing. 2012:22-4, 350-4.
3. A Society for the research of textbook on Cellular & Molecular Immunology. Cellular & Molecular Immunology 7th. Seoul:Beommoon education. 2013:84-9, 180-6.
4. Shin MK. Clinical traditional herbalogy. Seoul:Younlimsa. 2002:564-5.
5. Shin MK. Clinical herbalogy of external treatment(外治臨床本草學). Seoul:Jindallae publishing. 2007:610-1.
6. Kim CM, et al. Jungyakdaesajoen(中藥大辭典). Seoul:Jeongdam publishing. 1998:(3):4528-30.
7. Park JH, Choi JG. Pharmacognostical Studies on th "Pae Jang". Natural product sciences. 2006:37(4):302-6.
8. Kim UJ, et al. Development of Molecular Marker for the Authentication of *Patriniae Radix* by the Analysis of DNA Barcodes. The Korea Journal of Herbology. 2014:29(6):45-53.
9. Seo SW, et al. Inhibitory effect of *Patrinia scabiosaefolia* on Acute Pancreatitis. World J Gastroenterology. 2006:12(7):1110-4.
10. Wei Z, et al. Metabolomic Study on the Preventive Effect of *Patrinia scabiosaefolia* Fisch on Multipathogen Induced Pelvic Inflammatory Disease in Rats. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015:17(7):2-9.
11. Lim JP, Xun C. Anti-inflammatory Effect of *Patrinia villosa* Extract on Proteinase-activated Receptor-2 Mediated Paw Edema. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2004:12(1):47-52.
12. Lee EJ, et al. Inhibition of LPS-induced inflammatory biomarkers by ethyl

- acetate fraction of *Patrinia scabiosaefolia* through suppression of NF- κ B activation in RAW 264.7 cells. *J. Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2012;34(2):282-91.
13. Kim HY, et al. The Effect of *Patriniae* Radix on the Oxidative Stress and the NF- κ B Signaling in Mouse LLC-PK1 Cell. *Korean J. Oriental internal medicine*. 2010;31(1):153-65.
 14. Choi EJ, et al. Lignans Isolated from the Roots of *Patrinia scabiosaefolia* F. and their IL(Interleukin)-6 Inhibitory Activity. *Yakhak Hoeji*. 2009;53(4):201-5.
 15. Cho SY, Lee YT, Song CH. Inhibitory Effects on the Type 1 Hypersensitivity and Inflammatory Reaction of Herba *Patriniae* Aqua-acupuncture. *Korean Journal of Acupuncture*. 2004;20(4):53-63.
 16. Kim WJ. A Study on Antibacterial active ingredients of *Patrinia scabiosaefolia*. Kangwon national university school of pharmacy. 2003.
 17. Kwon KB. Apoptosis-Inducing Effect of Herba *Patriniae* Extract in Androgen Independent Prostate Cancer DU145 Cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2004;18(6):1661-5.
 18. Moon HC. Apoptosis-inducing Effect of Herba *Patriniae* Extract in the Prostate Cancer LNCaP Cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2004;18(3):863-7.
 19. Zhang M, et al. *Patrinia scabiosaefolia* inhibits the proliferation of colorectal cancer in vitro and in vivo via G₁/S cell cycle arrest. *Oncology Reports*. 2015;33(2):856-60.
 20. Han DW, et al. Anticancer Effect of *Patrinia Saniculaefolia* through the A popptotic Mechanism in H L-60 Cells. *J Oriental Rehab Med*. 2005;15(3):155-67.
 21. Shin DC, et al. Cytotoxicity of *Patriniae* Herba on Human cancer cell-lines. Research Center for Oriental Medicine Dong-eui University. 1997;1(1):211-9.
 22. Park JY, Park HS. Experimental studies on antimetastatic and immunomodulating effects of *Patriniae* Radix Herbal-acupuncture. *The journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2006;23(4):187-203.
 23. Kim KW, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells promoted by the crude extracts of the mixture of Cortex mori radiceis, *Patrinia saniculaefolia*. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2015;11(4):475-82.
 24. Jang SG, Cho CS, Kim CJ. Effects of *patriniae* radix extract on the membranous neuropathy mouse model. *Korean J. Oriental internal medicine*. 2009;30(1):212-7.
 25. Cha JT, Lee JC, Lee YC. Comparitive study on anti-asthmatic activities of *Patrinia scabiosaefolia* Fischer ex Link and *Patrinia villosa* Jussieu in a mouse model of asthma. *The Korea Journal of Herbology*. 2012;27(3):75-82.
 26. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 2nd ed. Seoul:Panmun Books.
-

- 2005:1-39, 263-89.
27. A pathology room of Korea medical university. Pathology. Seoul:Shinkwang publishing. 2001:28-31.
 28. Xia GC. Clinical Gynecology of Traditional Chinese Medicine. Beijing:People's medical publishing house. 1994:285-93.
 29. Shin JY. Bangyakhappyoen commentary (方藥合編解説). Gyeonggi-do:Seongbosa. 2005:468.
 30. The Society of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology. Korean Medicine Obstetrics & Gynecology 2. 3rd edition. Seoul:Eui Seong Dang Publishing. 2016:331-44.
 31. Sin GM, et al. In vitro Antiinflammatory Activity of Amygdalin in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells. Kor J Pharmacogn. 2003;34(3):223-7.
 32. Mu MM, et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. J Endotoxin Res. 2001;7(6):431-8.
 33. Stokes KY, et al. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. Free Radical Biol Med. 2002;33:1026-36.
 34. Ryu JH, et al. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. Phytother Res. 2003;17:485-9.
 35. Korean association of pharmacy education. pharmacology. Seoul:Shin Il publishing. 2003:314-46.
 36. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin-1:Cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab Invest. 1987;56:234-48.
 37. Waage A, et al. Local production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. J Exp Med. 1989;170(6):1859-67.
 38. Seo YJ. Role of Cyclooxygenase-2 in Carcinogenesis and Its Selective Inhibition for Cancer Chemoprevention. Molecular and cellular biology news. 2001;13(14):8-17.
 39. Kim JH, et al. Developmental Changes in the Activation of Signal Transduction Pathway via JNK in Rat Hippocampus after Kainic Acid-Induced Seizure. Korean neuropsychiatric association. 2001;40(5):971-80.
 40. Song H. Regulation of cell migration by MAPK signaling pathways. Duksung Women's University school of pharmacy. 2006.
 41. Yim BY, Choi DG, Seok GH. Basic immunology. Seoul:Hyoil publishing. 2006:201-11.
 42. Lee AK, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by suchinone effects on I- κ Ba phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. British J Pharmacol. 2003;139(1):11-20.
 43. Lee MS, Kim KA. Recent update on NF- κ B of endocrine metabolic disease. Endocrinology and Metabolism J. 2006;21(5):352-63.