

紫草 열수 추출물의 RAW 264.7 세포에서 IL-1 β , TNF- α , iNOS 유전자 발현에 미치는 영향 연구

조남준 · 최영호 · 이용희¹ · 김기광* · 한효상^{2*}

충남대학교 생화학과, 1: 충남대학교 생물공학연구소, 2: 중부대학교 보건행정학과

Investigation of the Effect of Water Extract of Lithospermi Radix on the Expression of IL-1 β , TNF- α and iNOS Genes in Raw 264.7 Cells

Nam Joon Cho, Young Ho Choi, Woong Hee Lee¹, Kee Kwang Kim*, Hyo Sang Han^{2*}

Department of Biochemistry, 1: Institute of Biotechnology, Chungnam National University,
2: Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University

Lithospermi Radix (LR) is known to have an anti-inflammatory effect. However, the mechanisms are not well known. In this study, LPS-induced mouse RAW 264.7 macrophage cells were treated with LR to investigate the time-dependent inflammation response of LR. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of LR for 24 hours, followed by MTS assay. Cell viability was increased at all experimental concentrations. The mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and iNOS were increased by treatment of RAW 264.7 cells with LR at a concentration of 200 μ g/ml for 6 hours and 24 hours. Treatment of LR with 200 μ g/ml concentration for 6 hours promoted mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and iNOS in LPS-induced RAW 264.7 cells. However, IL-1 β , TNF- α and iNOS mRNA expression was suppressed by treatment of LR with 200 μ g/ml concentration for 24 hours in LPS-induced RAW 264.7 cells. These results suggest that the effect on inflammation of LR is promptly promoted and then to rapidly alleviate the inflammatory reaction. This study proposes that the time-dependent activities of herbal medicine is a very important factor in analyzing the anti-inflammatory effect of various herbal medicines including LR.

keywords : Lithospermi Radix, MTS Assay, Anti-inflammation, RAW 264.7 cell, Lipopolysaccharide (LPS)

서 론

紫草 (*Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini)의 基原은 대한민국약전¹⁾에 지치과 (Boraginaceae)에 속하는 지치 *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini, 新疆紫草 *Arnebia euchroma* Johnst. 혹은 内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 의 뿌리로 되어 있다.

紫草의 성분으로는 naphthoquinones계 색소인 acetylshikonin 과 그 同族體인 propionylshikonin, isobutyrylshikonin, β , β -dimethylacrylshikonin, isovalerylshikonin, β -hydroxyisovalerylshikonin, α -methyl-n-butyrylshikonin을 함유하고 있고, lithosp

ermic acid, 靑酸배당체인 lithospermoside, allantoin²⁾, lithospermidin A, B, C를 함유하고 있으며, 알카로이드 성분인 pyrrolizidine alkaloids, hydroxymyoscorpine, 테르펜류 성분인 shikonofuran A, B, C, D, E, F를 함유하고 있고, 이밖에 caffeic acid, steryl alcohol, 1-epicosanol, 1-docosanol, 1-tetracosanol 등 에스테르 화합물을 함유하고 있다³⁾.

紫草의 약리작용은 항암⁴⁻⁹⁾, 항알러지 및 항AIDS¹⁰⁾, 항염¹¹⁾, 항산화^{12,13)} 등 여러 연구들이 보고되었다.

이러한 연구보고는 紫草가 凉血活血, 解毒透疹의 효능과 관련하여 염증 및 면역 관련하여 보고가 되었음을 알 수 있으며, 특히 최근에는 면역 매개물질인 사이토카인 (cytokine)의 염증 및 면역

* Corresponding author

Kee Kwang Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, 99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, Republic of Korea

E-mail : kimkk@cnu.ac.kr Tel : +82-42-821-5485

Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, 201, Daehak-ro, Majeon-ri, Chubu-myeon, Geumsan-gun, Chungcheongnam-do, Republic of Korea

E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr Tel : +82-41-750-6292

Received : 2017/05/02 Revised : 2016/07/14 Accepted : 2017/08/10

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.08.31.4.220>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

반응 조절기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 대식세포에서 분비되는 염증촉발인자들에 대한 紫草 열수 추출물의 염증 반응에 미치는 효과를 충분히 검토할 필요가 있다고 생각된다.

이에 저자는 마우스 대식세포 기원인 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 처리하여 나타나는 세포활성도를 확인하였으며 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포와 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 처리한 후 6 시간과 24 시간 경과하였을 때 나타나는 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 확인하였다. 이를 통해 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 紫草는 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2016년 9월에 구입 (NO: 2016-0904)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과 대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 filter paper (Advantec No.2, Japan), Pb, Cd Standard solution (Kanto Chemical, Japan), LPS from *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma, USA), DMEM media (WELGENE, Korea), FBS (WELGENE, Korea), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (WELGENE, Korea), DPBS (Corning, USA), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), MTS solution (Promega, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea), Qubit RNA Assay Kit (molecular probes, USA), 2X Prime Q-mater Mix (GENET BIO, Korea), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO2 incubator (Thermo, USA), water bath (HAAKE, Germany), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA) 등이다.

2. 방법

1) 紫草 열수추출물 제조

紫草 약재를 50 g으로 정확하게 중량을 측정한 뒤, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 탕액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 紫草 19.4 g, 수율 38.8 %였다.

2) 중금속 함량

동결건조한 자초 50 g을 microwave digestion system (Milestone, Germany)으로 전처리한 뒤 inductively coupled plasma mass spectroscopy (Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 Pb 와 Cd의 함량을 확인하였다. 중금속 표준용액으로 Pb, Cd Standard solution을 사용하였다.

3) 세포 배양

실험에 사용된 세포는 RAW 264.7 세포이며 한국세포주은행에서 구매하였다. 세포 배양은 표준 세포 배양법인 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지해주었고, 10%(v/v) FBS와 1% antibiotic antimycotic 을 첨가한 DMEM media에서 세포의 배양을 하였다.

4) 세포활성도 평가

紫草 열수 추출물이 RAW 264.7 세포에 미치는 세포활성도를 확인하기 위하여 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) assay 수행하였다. 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 2,500 cells/well로 분주하고 24 시간 동안 배양한 뒤 紫草 열수 추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1,600 μ g/ml 농도로 첨가하고 다시 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 MTS 시약을 첨가하고 37°C에서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 紫草 열수 추출물을 처리한 실험군을 대조군과 대조하여 백분율로 세포활성도를 확인하였다. 세포활성도는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

세포활성도 (%) = (시료첨가군의 흡광도 - 시료의 흡광도 / 대조군의 흡광도) \times 100

5) 세포 수 측정

RAW 264.7 세포를 2 X 10⁵ cells/well로 6 well plate에 분주하고 24 시간 동안 배양한 후 자초를 1,600 μ g/ml 농도로 세포에 처리한 뒤 다시 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 trypsin-EDTA를 처리하여 single cell을 얻은 뒤 hemocytometer로 세포 수를 측정하였다.

6) Quantitative RT-PCR

6 well culture dish에 RAW 264.7 세포를 2 X 10⁵ cells/well로 분주 후 24 시간 배양하였다. 이후 LPS 1 μ g/ml와 紫草 열수 추출물 200 μ g/ml를 세포에 처리하고 6 시간과 24 시간 배양시켰다. 시료가 첨가된 배지를 제거하고 PBS를 이용하여 한번 세척 후 eCube Tissue RNA Mini Kit를 이용하여 RNA를 추출하였다. The Qubit 2.0 Fluorometer로 RNA를 정량한 후 cDNA를 합성하기 위하여 total RNA 1 μ g에 Random Hexamer (100 pmol/ μ l) 1 μ l, dNTP mix (10 mM) 1 μ l를 넣은 후 DEPC-treated water로 총 부피 10 μ l가 되도록 조정하였다. 65°C 에서 5 분간 반응시키고, 바로 얼음에 냉각시킨 다음 RNase inhibitor 1 μ l, M-MLV reverse transcriptase 1 μ l, 5X M-MLV RT reaction buffer 4 μ l, DEPC-treated water 4 μ l,를 추가적으로 첨가하였다. 10 분간 실온에서 반응시킨 뒤 뒤에 1 시간 동안 50°C에서 cDNA를 합성하고, 합성한 cDNA를 증류수로 1/5로 희석하였다. 이후 iNOS의 mRNA 발현량을 quantitative RT-PCR (qRT-PCR)을 이용해 비교하였다. cDNA 5 μ l를 2X Prime Q-mater Mix 10 μ l, nuclease free water 2 μ l, 10

pmol/ μ l forward primer 1.5 μ l, 10 pmol/ μ l reverse primer 1.5 μ l 와 섞고 AriaMx를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다.

Table 1. Primer sequences

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
IL-1 β	F AGG TCA AAG GTT TGG AAG CA	129	58
	R TGA AGC AGC TAT GGC AAC TG		
TNF- α	F AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	103	58
	R CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC		
iNOS	F CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT	95	58
	R CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG		
GAPDH	F CCA TGG AGA AGG CTG GGG	195	58
	R CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC		

결 과

1. 紫草의 중금속 함량 분석

실험에 사용할 紫草 열수 추출물의 중금속 오염에 대한 안전성을 확인하기 위해 inductively coupled plasma mass spectroscopy를 이용하여 紫草 열수 추출물 내 포함된 납과 카드뮴의 양을 측정하였다. 그 결과 紫草는 한약재의 한국 식품의약품안전처 중금속 기준인 납 5 mg/kg 이하, 카드뮴 0.3 mg/kg 이하의 조건을 모두 만족하였다.

Table 2. Pb and Cd levels in Lithospermi Radix

Sample	Element	Certified value	Unit
Lithospermi Radix	Pb	0.146	mg/kg
	Cd	0.005	mg/kg

2. RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 영향

紫草 열수 추출물이 RAW 264.7 세포의 세포활성도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 紫草 열수 추출물을 농도별로 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리한 결과 모든 농도에서 RAW 264.7 세포의 세포활성도를 100% 이상 상승시켰으며, 가장 높은 실험 농도인 1,600 μ g/ml로 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 처리한 경우 세포활성도를 151.1%까지 상승시켰다. MTS assay는 세포 내 미토콘드리아 dehydrogenase에 의해 생성되는 NADH, NADPH를 측정하는 실험 방법으로, 이번 연구를 통해 紫草 열수 추출물 처리에 의한 RAW 264.7 세포의 미토콘드리아 dehydrogenase의 activity가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이후 1,600 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리한 뒤 직접적인 세포 수를 측정하였다. 그 결과 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 1,600 μ g/ml 농도로 24 시간 처리한 경우 큰 세포독성 없이 세포 수가 41.8%까지 감소하였고, 이러한 작용은 세포의 증식이 억제되어 나타난 것으로 생각된다.

3. RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 6 시간 처리한 경우 염증 반응에 미치는 영향

紫草 열수 추출물이 염증 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여, RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 처리한 뒤 qRT-PCR을 통해 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현량을 확인

하였다. 200 μ g/ml 농도로 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 6 시간 처리한 결과 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현이 촉진되었으며, LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물 200 μ g/ml를 6 시간 처리한 결과 또한 LPS만 처리한 RAW 264.7 세포보다 더 높은 수치로 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현이 촉진되었다.

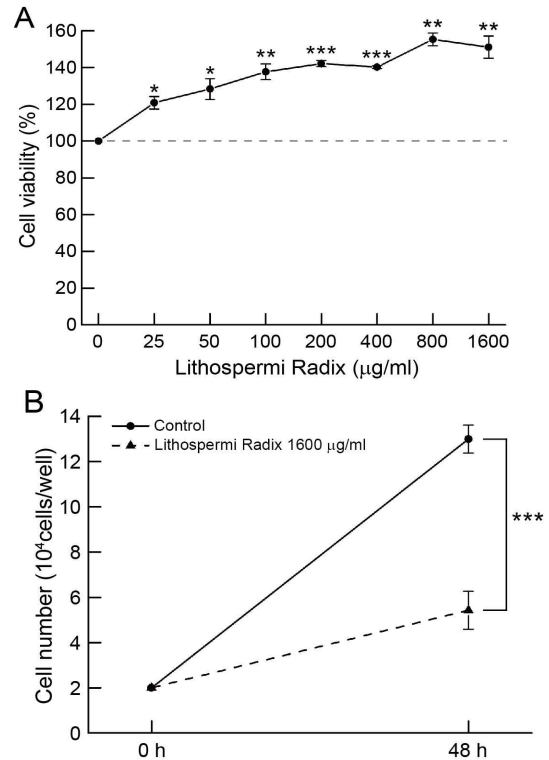


Fig. 1. Effect of Lithospermi Radix on cell growth. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentrations of Lithospermi Radix for 24 h. (A) Cell viability was measured by MTS assay. (B) Cell numbers were determined by direct counting with a hemocytometer. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

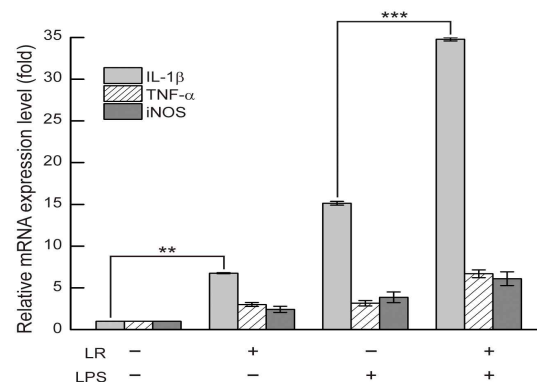


Fig. 2. Effect of treating Lithospermi Radix (LR) at 6 h stimulation on pro-inflammatory cytokine IL-1 β , TNF- α and iNOS mRNA expression. RAW 264.7 cells were treated with Lithospermi Radix (200 μ g/ml) with LPS (1 μ g/ml) or without for 6 h. Total RNA was isolated and analyzed for mRNA expression with qRT-PCR. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4. RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 24 시간 처리한 경우

염증 반응에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 24 시간 처리한 뒤 나타나는 염증 반응을 확인해보았다. 그 결과 LPS 처리 없이 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리한 경우 6 시간 처리했을 때와 같이 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 촉진하였다. LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 24 시간 처리한 경우 6 시간 처리했을 때와 반대로 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 억제시켰다.

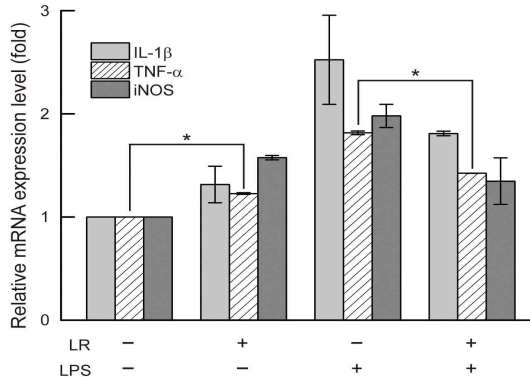


Fig. 3. mRNA expression of pro-inflammatory cytokine IL-1 β , TNF- α and iNOS. RAW 264.7 cells were treated with Lithospermi Radix (200 μ g/ml) with LPS (1 μ g/ml) or without for 24 h. Total RNA was isolated and analyzed for mRNA expression with qRT-PCR. *p < 0.05

고찰

紫草는 凉血活血, 解毒透疹의 효능이 있어 血熱毒盛, 斑疹紫黑, 麻疹不透, 瘡瘍, 濕疹, 水火燙傷의 증상을 치료하는데 상용되고 있다³⁾.

함유성분으로는 naphthoquinones계 색소인 acetylshikonin과 그 同族體, lithospermic acid, 靑酸배당체인 lithospermoside, allantoin²⁾, lithospermidin A, B, C를 함유하고 있으며²⁾, 이밖에 caffeic acid와 stearyl alcohol, 1-epicosanol, 1-docosanol, 1-tetracosanol 등 에스테르 화합물을 함유하고 있다³⁾.

염증의 반응은 그 원인과 반응조직의 차이와 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 증개하는 물질인 화학적 매개체로는 프로스타글란딘 (prostaglandin, PG), 산화질소 (nitric oxide, NO), 염증을 유발하는 여러 가지 사이토카인 등이 있다¹⁴⁾. 또한 염증 반응을 유도하는 주요한 화학 전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관 투과성 항진에 관여하는 amine류 (serotonin, histamine 등)와 kinin류 (bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 사이토카인류 등으로 분류 할 수 있다¹⁵⁾.

LPS는 그람음성 박테리아에서 유래하는 내독소 (endotoxin)의 일종으로 대식세포 등의 면역세포를 자극하여 일산화질소와 사이토카인 등 각종 전염증성인자들 (pro-inflammatory mediators)의 생성증가를 유도하며¹⁶⁾, 면역세포 특히 대식세포로 하여금 염증 촉

발 물질의 급격한 생성증가를 유발한다¹⁷⁾.

본 연구에서는 紫草 열수 추출물의 염증 반응 조절 메커니즘을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 처리한 뒤 시간에 따라 나타나는 염증 반응을 확인하였다.

紫草 열수 추출물이 RAW 264.7 세포의 세포활성도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다양한 농도로 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 처리한 뒤 24 시간 후 MTS assay를 수행하였다. 그 결과 모든 농도에서 세포활성도를 100% 이상 증가시켰으며, 가장 높은 실험 농도인 1,600 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물을 처리한 결과 또한 RAW 264.7 세포의 세포활성도를 151.1%까지 증가시켰다. MTS assay는 미토콘드리아에서 생성되는 NADH, NADPH가 주된 reducing agent로 작용하여 MTS가 반응한 뒤 생성되는 formazan의 양을 흡광도로 측정하는 것으로 현재 이 반응을 이용하여 세포의 세포활성도를 측정하고 있다¹⁸⁾. 즉 세포활성도 증가의 원인은 세포 수의 증가 혹은 세포의 NADH, NADPH 생성량의 증가로 생각할 수 있다. 紫草 열수 추출물이 RAW 264.7 세포의 세포활성도를 증가시키는 원인을 확인하기 위하여 紫草 열수 추출물을 1,600 μ g/ml 농도로 24 시간 동안 RAW 264.7 세포에 처리한 뒤 직접적인 세포 수를 측정한 결과 세포 수를 41.8%까지 감소시켰다. 즉 1,600 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물은 RAW 264.7 세포에 작용하여 세포 증식의 억제를 유도하며, NADH, NADPH와 같은 reducing agent의 생성을 촉진한 것으로 생각된다.

대식세포에 염증 반응을 유도한 경우 박테리아의 제거를 위하여 ROS의 생성을 높은 수치로 증가시키며 이러한 ROS는 NADPH에 의해 만들어지게 된다. 염증 반응이 유도된 대식세포는 5탄당 인산경로 (Pentose phosphate pathway, PPP)를 증가시키며 이러한 증가로 인해 NADPH의 생성이 촉진된다¹⁹⁾. 紫草 열수 추출물에 의한 RAW 264.7 세포활성도의 증가는 RAW 264.7 세포의 NADH 혹은 NADPH의 생성이 촉진되어 나타난 결과로 생각되며, 이를 통해 紫草 열수 추출물이 RAW 264.7 세포의 염증 반응을 유도할 것으로 가정하였다.

紫草 열수 추출물이 염증 반응에 미치는 효과에 대한 메커니즘을 분석하기 위하여 紫草 열수 추출물을 처리한 RAW 264.7 세포의 염증 반응을 시간별로 확인하였다. LPS와 200 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 같이 처리한 후 6 시간 뒤 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 확인하였고, MTS assay와 직접적인 세포 수 측정 실험 결과를 통해 紫草 열수 추출물이 RAW 264.7 세포의 염증 반응을 유도하였을 것이라 가정했으며, 이를 증명하기 위하여 LPS를 처리하지 않은 RAW 264.7 세포 또한 200 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물을 6 시간 처리하여 나타나는 염증 반응도 같이 확인하였다. 그 결과 紫草 열수 추출물을 처리한 RAW 264.7 세포에서 LPS 처리 없이도 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 촉진하였고, 紫草 열수 추출물과 LPS를 같이 6 시간 동안 RAW 264.7 세포에 처리한 경우 또한 LPS만 처리했을 때보다 높은 수치로 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 촉진하였다. 이를 통해 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 짧은 시간 처리한 경우 pro-inflammatory 사이토카인의 발현이 촉진되는 것을 확인하였다.

기존에 보고되어 있는 연구에서 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 24 시간 반응시킨 경우 염증 억제 효과가 나타나는 결과가 보고되어 있다^{20,21}). 하지만 이전 실험 결과에서 6 시간 동안 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 처리한 경우는 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 더욱 촉진하였다. 이러한 이유로 紫草 열수 추출물을 24 시간 동안 RAW 264.7 세포에 처리한 뒤 염증 반응에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. LPS 처리 없이 紫草 열수 추출물을 200 μ g/ml 농도로 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리할 경우 6 시간 처리했을 때와 마찬가지로 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 촉진하였다. 하지만 紫草 열수 추출물 200 μ g/ml를 LPS와 같이 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리한 결과 놀랍게도 6 시간 처리한 결과와 반대로 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 감소시켰다. 대식세포는 염증 자극에 의해 NF- κ B signaling pathway가 활성화 되어 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 발현이 높은 수치로 증가하는 pro-inflammatory phase가 나타나며 이후 resolution phase가 되어 IL-1 β , TNF- α , iNOS 발현이 감소한다²²). RAW 264.7 세포에 LPS를 6 시간 처리한 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS mRNA 발현이 높은 수치로 증가하는 pro-inflammatory phase가 되며, 24 시간 처리한 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS mRNA 발현이 다시 감소하는 resolution phase가 된 것으로 생각된다.

이러한 결과들을 통해 紫草 열수 추출물이 RAW 264.7 세포에 보인 염증 반응에 미치는 효과는 pro-inflammatory phase에서 염증 반응을 강하게 촉진한 뒤, resolution phase에서 염증 반응의 완화를 유도한 것으로 보인다. 에스트로젠은 RAW 264.7 세포의 SOCS3, STAT3 signaling pathway를 조절하여 염증 반응을 효과적으로 완화시킨다는 연구결과가 보고되어 있다. 이에 대한 작용은 LPS를 이용하여 염증 반응을 유도한 RAW 264.7 세포가 에스트로젠에 의해 빠르게 pro-inflammatory phase가 되도록 유도된 후 inflammatory phase의 빠른 완화가 유도되어 나타난다²³). 시간에 따른 pro-inflammatory 사이토카인 발현의 변화는 염증 반응 조절에 있어 매우 중요한 요소로 작용한다. LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물 200 μ g/ml는 6 시간, 24 시간 처리에 따라 상이하게 염증 반응에 영향을 나타내며 결국 24 시간 처리한 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 감소시켰다. 이를 통해 紫草 열수 추출물이 염증 반응과 관련된 다양한 질병 치료에 적용될 수 있을 가능성을 확인하였고, 동시에 紫草 열수 추출물이 LPS 자극 없이도 RAW 264.7 세포의 염증 반응을 유도한 만큼 이에 대한 부작용 발생 가능성 또한 확인하였다. 향후 자초가 SOCS3와 STAT3와 같은 다양한 염증 반응 메커니즘에 미치는 영향을 확인할 필요가 있을 것으로 생각되며, 이러한 결과는 추후 다양한 한약제제가 가지는 항염증 반응의 메커니즘 분석에도 매우 중요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 紫草 열수 추출물이 염증 반응에 미치는 효과에

대한 메커니즘을 분석하기 위하여, RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 6 시간 그리고 24 시간 처리한 뒤 나타나는 염증 반응을 확인하였으며 이를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 다양한 농도 처리한 뒤 MTS assay를 수행한 결과 모든 농도에서 세포활성도를 증가시켰으며 1,600 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물은 세포활성도를 151.1%까지 증가시켰다. 1,600 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 처리한 뒤 직접적인 세포 수를 측정하였고 그 결과 세포 수를 41.8%까지 감소시켰다.

RAW 264.7 세포에 紫草 열수 추출물을 200 μ g/ml 농도로 6 시간 처리할 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 촉진하는 것이 확인되었으며, LPS와 200 μ g/ml 농도의 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 또한 LPS만 처리한 RAW 264.7 세포보다 더 높은 수치로 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 촉진하였다.

200 μ g/ml 농도 紫草 열수 추출물을 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리할 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 촉진하였다. 하지만 紫草 열수 추출물 200 μ g/ml를 LPS와 같이 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리한 결과 6 시간 처리한 결과와 반대로 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 감소시켰다.

이번 연구 결과는 다양한 천연 소재 추출물의 항염증 메커니즘 연구에 도움을 줄 것으로 생각되며, 앞으로 紫草 열수 추출물의 염증 억제 반응에 대한 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 생각되는 바이다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Korea Food and Drug Administration. The Korean Pharmacopoeia Eleventh Edition. Seoul:Korea Food and Drug Administration. 2015:91-2.
2. Ministry of Health, Labour and Welfare. The Japanese Pharmacopoeia, Fourteenth Edition. Tokyo:Hirokawa Shoten. 2001:493-503.
3. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. Zhonghuabencao. Shanghai:Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999:525-31.
4. Chung HS, Kang MK, Cho CW, Park SK, Kim HY, Yoon YS, Kang JH, Shin MK, Hong MC, Bae HS. Inhibition of lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by Lithospermi radix in mouse peritoneal macrophages. J Ethnopharmacology. 2005;102(3):412-7.
5. Kim SH, Kang IC, Yoon TJ, Park YM, Kang KS, Song

- GY, Ahn BZ. Antitumor activities of a newly synthesized shikonin derivative, 2-hyim-DMNQ-S-33. *Cancer Lett.* 2001;172(2):171-5.
6. Singh F, Gao D, Lebowitz MG, Wei H. Shikonin modulates cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling in human epidermoid carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2003;200(2):115-21.
7. Zhang ZQ, Cao XC, Zhang L, Zhu WL. Effect of shikonin, a phytochemical from *Lithospermum erythrorhizon*, on rat vascular smooth muscle cells proliferation and apoptosis in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005;85(21):1484-8.
8. Hsu PC, Huang YT, Tsai ML, Wang YJ, Lin JK, Pan MH. Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the Bcl-2 family, p27, and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem.* 2004;52(20):6330-7.
9. Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5877-85.
10. Bulgakov VP, Veselova MV, Tchernoded GK, Kiselev KV, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene on rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta.* 2005;221(4):471-8.
11. Hwang HJ, Kim HY, Yu HJ, Oh MH, Lee IH, Kim SG. Gene encoding pathogenesis-related 10 protein of *Lithospermum erythrorhizon* is responsive to exogenous stimuli related to the plant defense system. *Plant Science.* 2003;165(6):1297-302.
12. Pan YM, Liang Y, Wang HS, Liang M. Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. *Food Chemistry.* 2004;88:347-50.
13. Choi WH, Hong SS, Lee SA, Han XH, Lee KS, Lee MK, Hwang BY, Ro JS. Monoamine oxidase inhibitory naphthoquinones from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Arch Pharm Res.* 2005;28(4):400-4.
14. Daehanbyeongrihakhoe. *Byeongrihak.* Seoul:Komoonsa. 2005:71-104.
15. 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.
16. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.
17. 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.
18. Dunigan DD, Waters SB, Owen TC. Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan MTS as an Indicator of NADH- and NADPH-Dependent Dehydrogenase Activity. *BioTechniques.* 1995;19(4):640-9.
19. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Research.* 2015;25(7):771-84.
20. Han KY, Kwon TH, Lee TH, Lee SJ, Kim SH, Kim JY. Suppressing effects of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on lipopolysaccharide-induced activation of AP-1 and NF- κ B via mitogen-activated protein kinase pathways in mouse macrophage cells. *BMB Rep.* 2015;41(4):328-33.
21. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, Lee GS, Park SJ, Song HJ. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum erythrorhizon* on lipopolysaccharide - induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology.* 2013;28(2):67-73.
22. Fernando O, Martinez, Siamon Gordon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports.* 2014;6(13):6-13.
23. Villa A, Rizzi N, Vegeto E, Ciana P, Maggi A. Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Scientific Reports.* 2015;5:15224.