

RAW 264.7 세포에서 왕지네 추출물의 항염 활성*

박재현 · 이선령[†]
제주대학교 생물학과

Anti-inflammatory activities of *Scolopendra subspinipes mutilans* in RAW 264.7 cells*

Park, Jae Hyeon · Lee, Sun Ryung[†]
Department of Biology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

ABSTRACT

Purpose: The dried body of *Scolopendra subspinipes mutilans* has long been used as a traditional Korean medicinal food, but little is known about its mechanisms of action. In this study, we investigated the anti-inflammatory activities of *Scolopendra subspinipes mutilans* and possible mechanisms in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. **Methods:** Cytotoxicity of *Scolopendra subspinipes mutilans* extract (SSME) was measured by MTT assay, anti-inflammatory activities were analyzed by nitric oxide (NO) production, the expression of inducible NO synthase (iNOS) and the mRNA level of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6). Nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF-kB) p65 subunit and degradation of inhibitory kappa B (I κ B) were examined by western blot. **Results:** SSME inhibited LPS-induced NO production and iNOS expression without cytotoxicity. Up-regulation of LPS-induced pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-6 was dose dependently attenuated by SSME. Exposure of pyrrolidine dithiocarbamate, an NF-kB specific inhibitor, accelerated the inhibitory effects of SSME on NO production and iNOS expression in LPS-stimulated cells. Moreover, translocation of NF-kB from the cytosol to the nucleus and degradation of I κ B were decreased by treatment with SSME in LPS-induced cells. **Conclusion:** These results suggest that the SSME might have the inhibitory effects on inflammation, partly through inhibition of the NF-kB signaling pathway.

KEY WORDS: inflammation, nitric oxide, NF-kB, cytokine, *Scolopendra subspinipes mutilans*

서론

염증 (inflammation)은 외부 자극에 의한 손상으로부터 신체를 방어하기 위한 면역반응으로 조직 손상을 완화하고 우리 몸의 항상성을 유지하는 매우 중요한 시스템이지만 과도하게 활성화되었을 경우 결국 만성 염증을 유발하게 되어 관절염, 심혈관질환, 신경퇴행성 질환, 암 등 각종 질환의 발병 요인으로 작용하기도 한다.¹ 정상적인 염증반응은 외부 물질이나 상처에 대응하는 면역세포인 대식세포의 활성화에 의해 조절되며 이는 염증 반응에 중요한 역할을 하는 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂, interferons, cytokine과 같은 다양한 염증성 매개 인자의 조절을 통해 이루어진다.^{2,3} 그러나 지속된 외부 자극에 의해 과도하게

활성화된 비정상적인 대식세포는 L-arginine으로부터 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 합성되는 NO의 생성을 촉진시켜 만성 염증을 유발 시킬 뿐 아니라 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase-2에 의해 생성되는 prostaglandin E₂나 tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6와 같은 염증매개인자 (pro-inflammatory factors)들의 발현을 촉진하여 염증을 악화시키고 나아가 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상을 일으킨다.^{1,4,5}

대식세포의 과도한 활성화는 그람 음성 세균의 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS)나 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)로 인해 발생하는 내독소와 같은 물질들의 지속적인 자극에 의해 일어난다. LPS에 의한 반응은 Toll-like receptor 4 (TLR 4) 신호전달 경로를 통해 nuclear

Received: July 24, 2018 / Revised: July 26, 2018 / Accepted: August 1, 2018

* This research was supported by the 2017 scientific promotion program funded by Jeju National University.

[†] To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-64-754-3522, e-mail: srlee@jejunu.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

factor-kappa B (NF- κ B) 활성화에 의해 조절된다. 세포질에서 I κ B와 복합체를 형성하고 있는 NF- κ B는 LPS의 자극으로 인해 활성화된 I κ B kinase (IKK)에 의해 I κ B가 인산화되고 NF- κ B:I κ B 복합체가 분리됨으로써 NF- κ B는 활성화되어 핵으로 이동하여 NO의 생성이나 염증매개 인자의 생합성을 조절하며 분리된 I κ B는 분해된다. 이러한 일련의 과정은 activator protein-1 (AP-1), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt 등 다양한 신호전달계와 밀접한 관련성이 있는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁸

왕지네 (*Scolopendra subspinipes mutilans*)는 분류학적으로 절지동물문 (Arthropoda), 왕지네과 (Scolopendridae)에 속하며 오공이라 불리는 말린 왕지네는 오래 전부터 전해 내려오는 전통적인 한약재로서 관절염, 뇌졸중, 경련, 중풍, 파상풍, 림프선염, 암종 등의 치료에 사용되어 왔다.^{9,10} 특히, 민간에서는 말린 지네의 머리와 꼬리를 제거하고 술에 담가 숙성시켜 섭취하였을 경우 관절염과 같은 염증에 의한 통증 조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근 들어 모양상 혐오감 때문에 회피되었던 곤충의 활용성에 대한 관심이 증가하면서 왕지네의 효능에 대한 연구도 진행되어 항암이나 항균, 미백에 있어서 효과가 있는 것으로 보고되었고¹¹⁻¹⁵ 지네가 가진 독 (venom) 또한 다양한 질병 치료에 이용될 수 있는 것으로 보고되었으나¹⁶ 각종 질환의 초기 유발원으로 작용하는 염증의 조절 및 그 기전과 관련된 과학적인 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 말린 왕지네를 이용한 에탄올 추출물 (*Scolopendra subspinipes mutilans* extract, SSME)이 염증 반응에 미치는 효능과 그 조절 기전을 밝힘으로써 천연소재로서의 활용 가능성을 조사하였다.

연구 방법

추출물의 제조

본 연구에 사용된 말린 제주산 왕지네는 제주마트에서 구입하였다. 건조된 상태의 왕지네 전충에서 머리, 꼬리, 다리를 제거한 후 지네 몸통을 파쇄기로 분쇄하여 60% 에탄올 (EtOH)을 이용하여 상온에서 추출하였다. 추출물은 filter paper (Whatman, No. 2)로 여과 한 후 감압 회전 농축기 (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)로 농축하였고 동결 건조를 통해 얻은 건조 분말은 -20°C에 보관하였다. 이후 실험에서는 건조된 분말을 EtOH와 phosphate buffered saline (PBS)를 1:1로 혼합한 용액에 녹여 사용하였다.

세포배양

RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin streptomycin (P/S)가 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지를 이용하여 37°C CO₂ incubator에서 배양하였고 2일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

MTT assay

48 well에서 1.8×10^5 cells/mL의 세포를 18시간 동안 배양한 후 100 ng/mL LPS 또는 농도별로 희석한 왕지네 에탄올 추출물을 24시간 처리하였다. 0.4 mg/mL의 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약으로 3시간 동안 반응시킨 후 상층액을 제거하고 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성량 측정

1.8×10^5 cells/mL 농도로 심은 세포에 LPS 또는 왕지네 추출물을 24시간 동안 처리한 후 분비되는 NO의 양을 griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine, 2.5% phosphoric acid)를 이용하여 측정하였다. 시료가 처리된 세포의 상층액 배지와 griess reagent를 1:1로 혼합하여 10분간 암실에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은 NaNO₃를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 흡광도 값과 비교하여 분석하였다.

Western blot analysis

LPS 및 시료가 처리된 세포를 cold-PBS로 세척하여 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS)로 lysis 시킨 후 원심분리 (4°C, 13,000 rpm, 15 min)하여 단백질을 추출하였다. 세포질 및 핵 분획 단백질의 추출은 NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하였다. cold-PBS로 수세한 세포를 cytoplasmic extraction reagent (CER) I에서 10분, CER II에서 1분간 반응한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액은 세포질 분획으로, 남은 cell pellet은 nuclear extraction reagent를 넣어 40분 동안 반응하여 15분간 원심분리 (4°C, 15,000 rpm) 하였고 얻어진 상층액을 핵 분획 단백질로 사용하였다. 추출한 단백질은 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량화하였고, 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAG)에서 전기영동을 통해 분리한 후 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 3%

skim milk로 1시간 반응시킨 후 특정 단백질 발현 분석을 위해 anti-rabbit iNOS (Santa Cruz Biotech, Dallas, TA, USA), anti-rabbit NF- κ B, anti-rabbit I κ B- α (Cell signaling, Danvers, MA, USA), anti-mouse β -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA), goat anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotech, Dallas, TA, USA) 항체를 사용하여 반응하였고 TBS-T용액으로 3회 세척 후 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate로 반응하여 암실에서 X-ray film에 노출시켜 분석하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포로부터 RNA의 분리는 easy-BLUE Total RNA Extraction Kit (iNtRON, Seoul, Korea)를 사용하였고 260 / A280 값이 1.7~2.0의 범위를 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 동일한 양의 RNA를 Maxime RT-PCR premix kit (iNtRON, Seoul, Korea)를 이용하여 primer와 혼합한 후 45°C에서 30분, 94°C에서 5분 동안 1회 진행하여 cDNA를 합성하고, 94°C에서 45초, 57°C에서 45초, 72°C에서 1분의 cycles을 27회 진행하였다. PCR을 위해 사용된 primer의 염기서열은 다음과 같다. IL-1 β Forward, 5'-CAG GAT GAC ATG AGC ACC-3'; IL-1 β Reverse, 5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3'; IL-6 Forward, 5'-GTA CTC CAG AAG ACC AGA GG-3'; IL-6 Reverse, 5'-TGC TGG TGA CAA CCA CGC CC-3'; GAPDH Forward, 5'-AGG CTG TGC TGT CCC TGT AT-3'; GAPDH Reverse, 5'-ACC CAA GAA GGA AGG CTG GA-3'. 최종 PCR 산물은 Red-safe nucleic acid staining solution이 포함된 1.5% agarose gel에서 확인하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 평균값과 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었고 SPSS (statistical package for social science, ver. 18, Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 통계학적 유의성 (유의수준 $p < 0.05$)을 검증하였다.

결 과

왕지네 에탄올 추출물의 세포독성

MTT assay를 이용하여 각 농도 (10~500 μ g/mL)에 따른 왕지네 추출물의 세포 독성을 측정된 결과, 10~200 μ g/mL의 농도에서는 대조군과 유사한 수준의 세포생존율을 보여 세포독성이 없는 것을 확인하였고, 500 μ g/mL 이

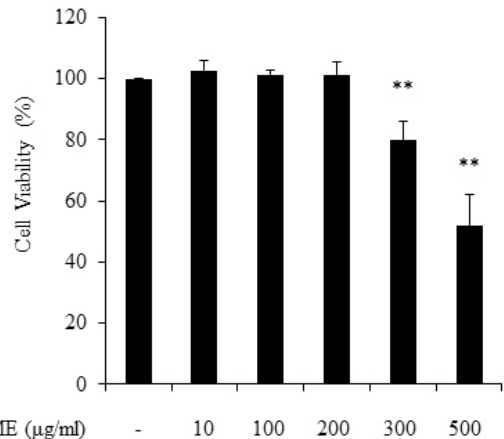


Fig. 1. Cytotoxicity of *Scolopendra subspinipes mutilans* extract (SSME) in RAW 264.7 cells. The cells were treated with indicated concentration of SSE for 24 hrs. The data were presented as the mean \pm SD (n = 3, ** $p < 0.01$ vs control).

상의 농도에서는 세포생존율이 50% 이상 감소하여 세포 독성을 나타내었다 (Fig. 1).

왕지네 에탄올 추출물의 항염 활성

왕지네 에탄올 추출물이 염증 반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 염증 반응의 표지 인자로 사용되는 NO 생성량과 NO의 분비를 조절하는 효소 단백질인 iNOS 및 pro-inflammatory cytokine의 발현 정도를 분석하였다. 먼저, 100 ng/mL의 LPS로 활성화된 Raw 264.7 대식세포에 독성이 나타나지 않는 범위의 왕지네 에탄올 추출물을 10~200 μ g/mL 농도로 각각 처리하여 24시간 경과 후 분비되는 NO 양을 측정하였다. 그 결과, LPS 처리로 인해 대조군에 비해 약 3배 이상 증가된 NO 생성량은 100~200 μ g/mL 농도의 왕지네 추출물 처리군에서 현저하게 감소되는 양상을 보여주었고 세포의 생존율에는 별다른 영향을 미치지 않았다 (Fig. 2A). iNOS 단백질의 발현량 또한 LPS 처리군과 비교하였을 경우 왕지네 추출물 처리군에서 농도의존적으로 억제되는 것을 관찰하였고 (Fig. 2B) 염증 매개 인자의 조절 여부를 확인하기 위해 수행한 IL-1 β 와 IL-6의 PCR 결과는 100 μ g/mL 이상의 농도로 12시간 처리된 왕지네 추출물 처리군에서 LPS 처리군과 비교하여 RNA 발현량이 현저하게 감소됨을 보여 주었다 (Fig. 2C). 이는 NO 생성 억제 효과와 일치되는 결과로 왕지네 에탄올 추출물이 염증을 억제하는 작용을 하고 있음을 보여주는 것이다.

NF- κ B 조절에 의한 왕지네 에탄올 추출물의 항염 활성

왕지네 에탄올 추출물이 가지는 염증 억제 효능의 조절

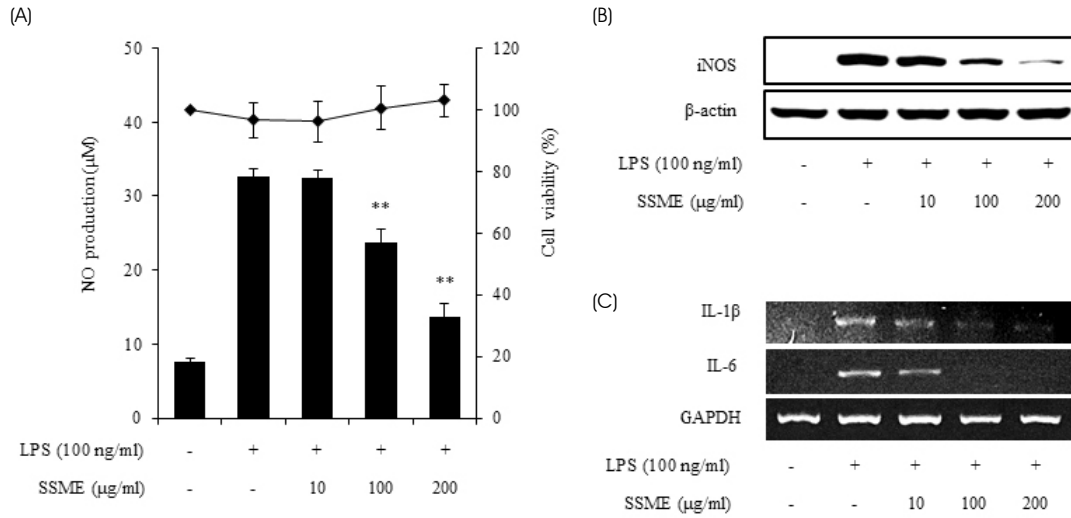


Fig. 2. Effect of *Scolopendra subspinipes mutilans* extract (SSME) on production of NO (A), expression of iNOS protein (B) and RNA level of pro-inflammatory cytokines (C) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pre-treated with indicated concentration of SSME for 1 hr, and then stimulated with LPS for 24 hrs (A & B) or for 12 hrs (C). The data were presented as the mean ± SD (n = 3, **p < 0.01 vs LPS-treated group).

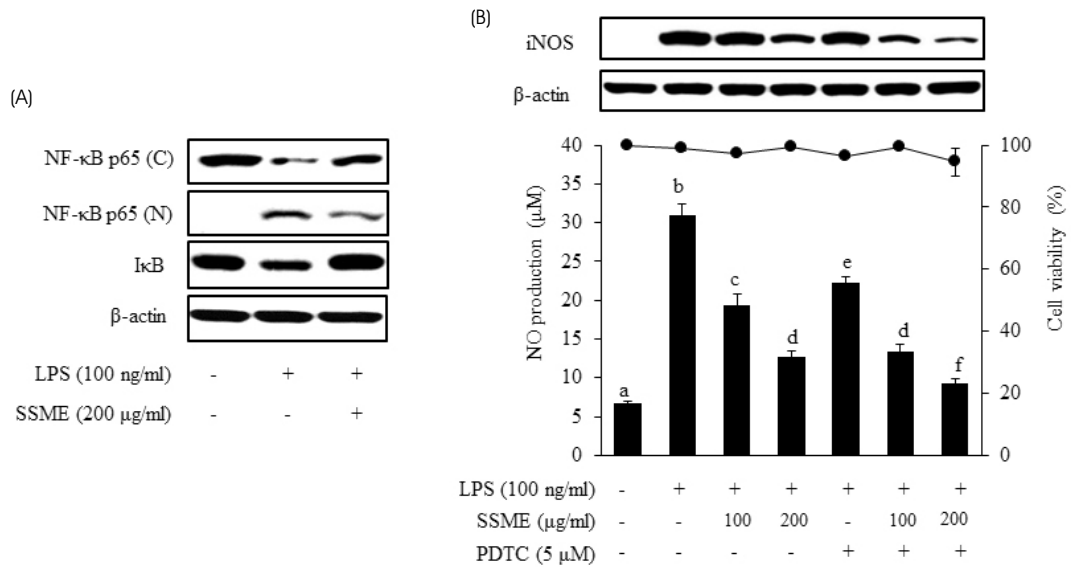


Fig. 3. Inhibitory effect of *Scolopendra subspinipes mutilans* extract (SSME) on the NF-κB translocation to nucleus and IκB degradation (A) and NO production (B) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pre-treated with indicated concentration of SSME and/or PDTC for 1 hr, and then stimulated with LPS for 75 min (A) or for 24 hrs (B). Different letters indicate significant differences among group at p < 0.01 as determined by Duncan's multiple range test.

기전을 알아보기 위해 염증성 단백질들의 발현을 조절하는 것으로 알려진 NF-κB의 활성도를 분석하였다. 세포질에서 IκB와 복합체를 형성하여 비활성화된 상태로 존재하는 NF-κB는 LPS와 같은 자극으로 인해 IκB가 분해되면서 활성화 상태로 변화하게 되고 핵 내부로 이동하여 염증 매개 인자들의 발현을 조절한다. 따라서 세포질 분획과 핵 분획을 이용한 NF-κB의 핵으로의 translocation 및 IκB의 발현을 비교 분석해 본 결과, 대조군에 비해 LPS 처리군

에서 세포질 분획의 NF-κB 발현량은 현저하게 감소한 반면, 핵분획에서는 NF-κB 발현량이 증가하였다. 왕지네 추출물 처리군에서는 LPS 처리군과는 반대되는 양상을 보여 세포질 분획에서는 증가, 핵분획에서는 감소되었다. LPS 처리에 의해 분해된 IκB에 의해 유의적으로 감소한 양상을 보인 IκB의 발현은 왕지네 추출물에 의해 증가되는 것으로 나타났다 (Fig. 3A). 또한, NF-κB specific inhibitor인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)를 이용하여 NO 생성

및 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인하였다. Fig. 3B에서 보여주듯이 왕지네 추출물과 PDTC를 동시에 처리하였을 경우 이들을 각각 처리한 경우에 비해 분비되는 NO양과 iNOS 발현량은 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 왕지네 추출물의 염증 억제 활성이 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 핵으로의 translocation과 I κ B 분해를 억제함으로써 NF- κ B signaling을 통해 조절되고 있음을 보여주는 것이다.

고 찰

염증은 감염과 같은 외부자극에 의해 활성화된 대식세포가 다양한 세포내 신호 전달계의 상호조절을 통해 NO 및 IL-1과 같은 전염증 매개인자를 분비하여 손상을 보호하는 면역 반응이다.¹ 그러나 염증은 다양한 질병을 유발하는 주요 원인 중의 하나로 작용하기도 한다. 즉, 지속적인 자극으로 인해 비정상적으로 활성화된 대식세포는 염증매개인자를 과도하게 분비하게 하여 오히려 암이나 신경퇴행성 질환을 일으킬 수 있다. 퇴행성 질환의 경우, 염증성 사이토카인들 (IL-1 β , IL-6)이 현저히 증가되기도 하고 정상보다 높은 iNOS가 발현되기도 한다.¹⁷ 과도하게 분비된 NO는 뇌혈관장벽 파괴를 촉진하고 산화적 손상을 야기하여 뇌경색을 악화시키기도 하며¹⁸ NO 생성을 특이적으로 억제한 물질은 염증성 질환을 제어하기도 한다.¹⁹ 또한, iNOS 발현을 억제하는 동물모델은 염증을 완화시켜 파킨슨 질환에 긍정적인 효과를 제시하기도 한다.²⁰ 이처럼 과도하게 발현된 염증 매개 인자들을 제어하는 것이 염증에 관련된 각종 질병의 예방과 치료에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지면서 식물군을 중심으로 항염증 효능을 가진 생물자원에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 최근 들어서는 식물군 외 곤충자원을 활용하기 위한 연구도 다양하게 진행되고 있다. 곤충의 경우, 과거에는 해충 제거용, 애완용, 사료용 등으로 주로 이용되어 왔으나 최근 들어 약용 및 식용으로 이용되기 시작하면서 이들이 가진 생리활성에 대한 관심도 증가되어 참콩풍뎅이 (*Popillia flavosellata*)나 무당벌레 (*Harmonia axyridis*), 애기뿔소뽕구리 (*Copris tripartitus*) 및 벼메뚜기 (*Oxya chinensis sinuosa*)들의 항염 활성이나²¹⁻²⁴ 미국산 바퀴 (*Periplaneta americana* L.)의 항균활성이 보고되면서²⁵ 곤충 유래 물질들의 이용 가능성이 제시되었다. 곤충에 대한 다양한 생리 활성이 주목 받으면서 왕지네에 관련된 연구도 진행되어 왕지네 추출물이 암세포의 세포사멸을 유도할 뿐 아니라¹¹ A375 세포의 증식을 억제하여 항암효과가 있음을 보고하였다.¹² Kim 등의 연구에서는 tyrosinase

의 활성을 저해하여 멜라닌 생성을 억제해 미백효과가 있음을 보고하였고¹⁵ 왕지네에서 분리한 Scolopendrasin V와 Scolopendin peptide는 미생물의 세포막을 파괴하여 강력한 항균작용을 하는 것으로 보고되었다.^{13,14} 또한, 왕지네의 antimicrobial peptide는 중성구의 활성을 자극하여 면역 조절 기전과 밀접한 관련성이 있음을 보여 주었고²⁶ 본 연구에서도 왕지네 추출물이 면역의 초기 반응인 염증 억제에 효능이 있음을 확인하였다. 실제로 말린 왕지네는 술을 담가 섭취함으로써 염증 관련 통증을 조절하는데 많이 이용되어 왔으나 이들의 항염 활성에 대한 연구는 보고된 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 말린 왕지네가 과도한 대식세포의 활성화로 인한 만성 염증반응을 억제하여 각종 질환의 진행을 조절하는데 효과적인 천연물 소재로서 활용이 가능한지를 알아보고자 에탄올을 이용하여 추출한 왕지네 추출물의 염증 조절 효능과 그 조절 기전을 분석하였다. Fig. 2에서 제시한 바와 같이, 대식세포의 활성화를 유도하는 것으로 알려진 LPS를 이용하여 Raw 264.7 세포에서 각종 염증 관련 인자들을 분석하여 왕지네의 항염 효능을 확인한 결과, 왕지네 에탄올 추출물은 LPS에 의한 과도한 NO 생성을 현저히 감소시켜 항염 활성이 있음을 보여 주었고 이는 염증 매개 물질인 iNOS 및 IL-6, IL-1 β 의 발현 저해를 통해 이루어짐을 확인하였다. 이러한 결과는 기존에 널리 알려진 식물군들의 항염 활성, 즉 포도잎으로부터 분리한 quercetin이나 녹차의 폴리페놀 등에서 나타나는 항염증^{27,28}과 유사한 효능을 나타내는 것으로 항염 활성을 가지는 왕지네 에탄올 추출물이 대식세포의 과도한 활성화를 억제하여 염증성 질환을 제어할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 생각된다.

면역과 염증을 조절하는데 중요한 신호전달계의 하나로 알려진 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)는 cytokine, growth factor, cell adhesion molecule 등의 발현에 영향을 미치는 전사 인자이다.²⁹ NF- κ B는 p65와 p50 단백질이 heterodimer 상태로 Inhibitory kappa B (I κ B)라는 억제 단백질과 복합체를 이루어 세포질에 위치하고 있다. LPS와 같은 외부 자극이 전해질 경우 toll-like receptor (TLR-4) 신호전달과정이 활성화되어 I κ B kinase (IKK)에 의해 인산화된 I κ B는 NF- κ B 복합체와 분리되어 NF- κ B의 활성화를 유도하고 이와 동시에 I κ B는 분해된다. 활성화된 NF- κ B p65는 세포질에서 핵 내부로 이동하게 되어 NO 및 다양한 전염증 매개 인자의 생성을 촉진하고 만성 염증 반응을 유도하게 된다.³⁰ 따라서 NF- κ B 활성을 조절하고 활성화된 NF- κ B의 전이를 억제하는 것 또한 만성 염증을 저해하는 소재를 스크리닝하는 데 있어서 매우 중요한 부분이다. 본 연구에서도 왕지네 추출물의 항염 활성은 NF- κ B가 핵으로 이동하

는 것을 억제하고 I κ B의 분해를 저해하는 일련의 과정을 통해 NF- κ B 신호전달경로를 조절함으로써 이루어지고 있음을 확인하였고 (Fig. 3) 왕지네 추출물에 의한 NF- κ B 활성의 적절한 조절은 염증으로 촉발되는 각종 질환 제어에 효율적으로 적용될 수 있음을 보여주는 것으로 생각된다.

그러나 본 연구 결과 (Fig. 1)에서 보여주듯이 왕지네 추출물의 경우 세포 독성에 대한 문제는 고려되어야 할 사항이다. 200 μ g/mL 이하의 농도에서는 뛰어난 항염 활성을 가진 항염 소재로서의 활용 가능성을 보여주었으나 그 이상의 농도에서는 세포 독성을 나타내었다. 이는 일반적으로 잘 알려진 식물자원을 이용한 추출물에 비해 비교적 낮은 농도에서도 독성에 대해 보다 민감하게 반응할 수 있음을 보여주는 것으로 무조건적인 활용에 앞서 적절한 농도에 대한 철저한 선행 조사가 이루어져야 할 것으로 보이며 머리와 꼬리 부분에 독을 가진 왕지네의 독특한 특성이 세포 독성 유발 요인의 하나로 작용할 수 있을 것으로 추측되므로 이들이 가진 생리활성 물질을 분석하는 연구가 향후 지속적으로 진행되어야 할 것이다. 또한, 왕지네는 일반적인 식용 곤충들과는 달리 식자재로서 바로 사용하는 것은 위험한 일이며 직접적인 섭취가 아닌 적절한 범위내에서 생리활성 물질을 활용하는 용도로 사용되어야 할 것으로 생각된다.

화학적으로 합성된 항염 소재의 경우 장기간 노출 시 기능 저해와 같은 여러 부작용이 우려되면서 상대적으로 부작용이 적을 것으로 여겨지는 천연자원을 이용한 항염 소재를 개발하는데 많은 노력을 기울이고 있다. 식물자원을 활용한 소재에서부터 곤충을 활용한 소재에 이르기까지 다양한 천연 자원에 관심을 두고 있으나 본 연구에서 보여준 것처럼 천연자원의 활용에는 적절한 주의가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

만성 염증은 현대사회에서 다양한 질병을 유발하는 주요 원인으로 작용하기 때문에 항염증 활성을 가진 소재의 연구는 염증 관련 질병의 예방과 치료에 있어서 중요하다. 본 연구에서는 LPS에 의해 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에서 제주왕지네 (*Scolopendra subspinipes mutilans*) 에탄올 추출물의 염증 조절 기전을 확인하여 항염증 소재로서의 가능성을 조사하였다. LPS에 의해 증가된 NO 생성과 iNOS 발현은 왕지네 추출물에 의해 감소되었고 pro-inflammatory cytokine으로 알려진 IL-1 β , IL-6의 발현에서도 유사한 결과를 보였다. 왕지네 추출물은 LPS에 의해 유도된 NF- κ B의 핵으로의 전이와 I κ B의 분해를 동시에 억제하였고 NF- κ B

inhibitor의 처리는 NO 생성과 iNOS 발현을 더욱 억제하였다. 이상의 결과는 왕지네 추출물이 NF- κ B 활성 조절을 통해 염증 반응의 지표로 사용되는 NO 생성 및 pro-inflammatory cytokine의 발현을 효과적으로 억제하여 항염 활성을 가진 소재로서의 가능성을 보여주는 것으로 염증에 의해 유발되는 다양한 질병을 효율적으로 제어하는 소재를 개발하는데 있어서 주요한 정보를 제공할 것으로 생각된다.

ORCID

박재현: <https://orcid.org/0000-0002-8882-2070>

이선령: <https://orcid.org/0000-0003-0460-5931>

References

- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(2): 227-235.
- Saha S, Shalova IN, Biswas SK. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunol Rev* 2017; 280(1): 102-111.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75(6): 639-653.
- Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2: S3.
- Meng XM, Tang PM, Li J, Lan HY. Macrophage phenotype in kidney injury and repair. *Kidney Dis (Basel)* 2015; 1(2): 138-146.
- Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001; 7(3): 167-202.
- Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Anti-inflammatory effects of proanthocyanidin-rich red rice extract via suppression of MAPK, AP-1 and NF- κ B pathways in Raw 264.7 macrophages. *Nutr Res Pract* 2016; 10(3): 251-258.
- Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(9): 1102-1113.
- Pemberton RW. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 1999; 65(3): 207-216.
- Kim SC, Seo GY, Lee SW, Park SJ, Kim JH, Ahn SH, Hwang SY. Biological activities of Scolopendrid Pharmacopuncture. *J Pharmacopuncture* 2010; 13(3): 5-13.
- Ding D, Guo YR, Wu RL, Qi WY, Xu HM. Two new isoquinoline alkaloids from *Scolopendra subspinipes mutilans* induce cell cycle arrest and apoptosis in human glioma cancer U87 cells. *Fitoterapia* 2016; 110: 103-109.
- Ma W, Liu R, Qi J, Zhang Y. Extracts of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans* induce cell cycle arrest and apoptosis in A375 human melanoma cells. *Oncol Lett* 2014; 8(1): 414-420.
- Lee W, Hwang JS, Lee DG. A novel antimicrobial peptide, scolopendin, from *Scolopendra subspinipes mutilans* and its

- microbicidal mechanism. *Biochimie* 2015; 118: 176-184.
14. Lee JH, Kim IW, Kim MA, Ahn MY, Yun EY, Hwang JS. Antimicrobial activity of the scolopendrasin V peptide identified from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J Microbiol Biotechnol* 2017; 27(1): 43-48.
 15. Kim IW, Lee JH, Kwon YN, Kim SH, Yun EY, Nam SH, Ahn MY, Hwang JS. Inhibitory effect of melanin synthesis using organic solvent extracts from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J Seric Entomol Sci* 2014; 52(1): 1-5.
 16. Hakim MA, Yang S, Lai R. Centipede venoms and their components: resources for potential therapeutic applications. *Toxins (Basel)* 2015; 7(11): 4832-4851.
 17. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and *de novo* Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995; 202(1-2): 17-20.
 18. Jiang Z, Li C, Arrick DM, Yang S, Baluna AE, Sun H. Role of nitric oxide synthases in early blood-brain barrier disruption following transient focal cerebral ischemia. *PLoS One* 2014; 9(3): e93134.
 19. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 2007; 15(6): 252-259.
 20. Li M, Dai FR, Du XP, Yang QD, Chen Y. Neuroprotection by silencing iNOS expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2012; 48(1): 225-233.
 21. Yoon YI, Hwang JS, Kim MA, Ahn MY, Lee YB, Han MS, Goo TW, Yun EY. Inhibition of inflammation by *Popillia flavosellata* ethanol extract in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *J Life Sci* 2015; 25(9): 993-999.
 22. Kim HJ, Kim DH, Lee JY, Hwang JS, Lee JH, Lee SG, Jeong HG, An BJ. Study of anti-inflammatory effect of CopA3 peptide derived from *Copris tripartitus*. *J Life Sci* 2013; 23(1): 38-43.
 23. Kim DH, Kim HJ, Lee JY, Hwang JS, Kim IW, Lee SG, Jeong HG, An BJ. Anti-inflammatory effect of HaGF peptide of *Harmonia axyridis*. *J Life Sci* 2013; 23(4): 495-500.
 24. Yoon YI, Chung MY, Hwang JS, Goo TW, Ahn MY, Lee YB, Han MS, Yun EY. Anti-inflammatory effect of *Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Life Sci* 2014; 24(4): 370-376.
 25. Kim JE, Kim SG, Kang SJ, Kim CS, Choi YS. Effect of antioxidation and antibacterial activity on crude extract and characterization of american cockroaches (*Periplaneta americana* L.) in Korea. *J Seric Entomol Sci* 2015; 53(2): 135-142.
 26. Park YJ, Kim HS, Lee HY, Hwang JS, Bae YS. A novel antimicrobial peptide isolated from centipede *Scolopendra subspinipes mutilans* stimulates neutrophil activity through formyl peptide receptor 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 494(1-2): 352-357.
 27. Yoon CH, Kim DC, Ko WM, Kim KS, Lee DS, Kim DS, Cho HK, Seo J, Kim, SY, Oh H, Kim YC. Anti-neuroinflammatory effects of quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Korean J Pharmacogn* 2014; 45(1): 17-22.
 28. Park E, Chun HS. Green tea polyphenol epigallocatechine gallate (EGCG) prevented LPS-induced BV-2 microglial cell activation. *J Life Sci* 2016; 26(6): 640-645.
 29. Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004; 382(Pt 2): 393-409.
 30. Li X, Stark GR. NF κ B-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002; 30(4): 285-296.