

삼채(三菜) 물추출물이 RAW 264.7 세포의 항산화 및 염증반응에 미치는 영향

이상수^{1#}, 한효상^{2#}, 유자연³, 남명수^{4*}, 김기광^{1*}

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 중부대학교 보건행정학과, 3 : 국립축산과학원, 4 : 충남대학교 동물자원과학부

Anti-oxidant and anti-inflammatory effect of *Allium Hookeri* water extracts in RAW 264.7 cells

Sangsoo Lee^{1#}, Hyosang Han^{2#}, Jayeon Yoo³, Myung Soo Nam^{4*}, Keekwang Kim^{1*}

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

2 : Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Republic of Korea

3 : National Institute of Animal Science, RDA, Wanjugun, Jeolabukdo, 55365 Republic of Korea

4 : Division of Animal Resource Science, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : *Allium hookeri* is a well-known traditional herbal remedy and its root used for treatment of inflammation and tumor. However, the mechanism of anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* is still unknown. This study aims to examine the mechanism of anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* on mouse macrophage cell line, RAW 264.7 cells.

Methods : Anti-oxidant effect of water extract of *Allium hookeri* (WEAH) was measured by 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay. 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay was performed to determine the effect of WEAH on cell viability in RAW 264.7 cells. In addition, anti-inflammatory effect of WEAH was investigated in RAW 264.7 cells. Inflammation of RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) treatment and expression levels of inflammatory cytokine interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) gene were analyzed using quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis. Furthermore, the phosphorylation of inhibitor of nuclear factor kappa B (I κ B α) after LPS treatment with WEAH-treated RAW 264.7 cells was confirmed by immunoblot analysis.

Results : WEAH showed a strong anti-oxidant effect and no cytotoxicity to RAW 264.7 cells up to 2 mg/ml concentration. The LPS-induced mRNA expression levels of IL-1 β and IL-6 were decreased by WEAH treatment. Furthermore, the LPS-induced phosphorylation of I κ B α is attenuated by WEAH treatment.

Conclusions : Through experimental demonstration of anti-oxidant and anti-inflammatory effects of WEAH, we suggest that *Allium hookeri* is a valuable material for prevention and treatment of various inflammatory diseases.

Key words : *Allium hookeri*, RAW 264.7 cells, Anti-inflammation, Anti-oxidant effect

*Corresponding author : Keekwang Kim, Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

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

Myung Soo Nam, Division of Animal Resource Science, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea,

· Tel : +82-41-821-5782 · E-mail : namsoo@cnu.ac.kr

#First author : Sang Soo Lee, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-7525 · E-mail : agnazio@naver.com

Hyo Sang Han, Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea.

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

· Received : 14 May 2020 · Revised : 01 July 2020 · Accepted : 25 July 2020

I. 서론

염증반응은 신체의 기초적인 방어 기작 중 하나로 외부로부터 가해지는 신체에 물리적, 화학적 자극 혹은 세균 등 병원성 물질의 침투 등 위험 자극에 대해서 항상성을 유지하는 것을 목적으로 하여 이루어지는 일종의 면역 반응이다. 염증반응은 만성 염증 반응과 급성 염증 반응으로 구분되는데, 이중 급성 염증반응은 대식세포에 의해 조절되며, 대식세포가 활성화되어 전염증성 인자(pro-inflammatory mediators)를 만들어 염증반응을 유도한다. 전염증성 인자에는 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine), 산화질소(nitric oxide), 프로스타글란딘(prostaglandin) 등이 존재한다.^{1,2,3)}

염증성 사이토카인은 대표적으로 interleukin(IL)-1 β 와 interleukin(IL)-6가 알려져 있으며 공통적으로 발열반응을 유도한다^{4,5,6)}. 염증반응이 유도된 대식세포에서는 이들 사이토카인을 분비하여 다른 전염증성인자인 산화질소의 합성을 유도하여 대식 작용에 이용하거나 프로스타글란딘의 합성을 유도하여 모세혈관 확장을 통해 면역세포의 반응에 참여하는 것을 보조한다. 각 염증성 사이토카인은 대식세포에서 NF- κ B 신호 전달이 활성화되어 I κ B α 가 인산화되어 발현이 촉진되는 것으로 알려져 있다^{7,8)}.

전염증성 인자는 면역반응을 위해 필수적인 요소지만, 과다하게 생성되거나 염증반응 이후 제거가 제대로 되지 않는다면 병원체나 손상된 세포 이외에도 인접한 정상 조직까지 대식 작용 등을 통해 손상을 유발해 장기적으로 조직이나 신경 손상 등 염증성 질환을 초래한다⁹⁾. 이러한 염증성 질환은 대표적으로 류마티스성 관절염, 위염, 천식 등이 있으며, 임상에서 그 비중이 큰 질병인 만큼 염증반응을 조절함으로써 염증성 질환의 방지 및 치료는 임상적으로 매우 중요한 과제 중 하나이다. 최근 화장품이나 약품 등 여러 분야에서 제작과정에서 사용된 화학성분에 의한 염증성 질환과 같은 부작용의 해결이 필요하며 이를 위한 천연자원의 이용이 점차 강조되고 있다. 그 때문에 현재 항염증 활성을 띠는 천연물을 탐색하기 위한 연구 역시 활발히 이루어지고 있다^{10,11,12)}.

삼채(*Allium hookeri*)는 백합과(Liliaceae) 파속(*Allium* L.)에 속하는 다년생초로 단맛, 매운맛, 짭짤한 맛이 난다고 하여 삼채(三菜)라고 부르며 나뭇잎 인삼 맛이 난다고 하여 삼채(蔘菜)라고 불리고, 히말라야 산맥 해발 1400-4200미터 지역의 초고랭지지역이나 숲 또는 습지에서 자생하며 주로 인도, 미얀마, 중국 등지에 분포한다¹³⁾.

생리학적 및 약리학적 활성 효과가 잘 알려진 파속 식물인 삼채의 천연 유효 성분은 사포닌의 주영양성분으로 인삼의 3000 ~ 6000배, 산삼의 60배 이상으로 알려져 있으며¹⁴⁾, 단백질, 섬유소, 당, total phenol, ascorbic acid 등이 양파보다 많이 함유되어 있다고 보고되어 있다^{15,16,17)}.

그 이외에 삼채(三菜)에는 gallic acid, chlorogenic acid, protocatechuic acid, hydroxybenzoic acid, vanillic acid, ferulic acid, sinapic acid, catechin, rutin 등 페놀성 화합물과 allicin을 포함한 alkyl thiosulfinate 형태의 함황화합물을 다량 함유하고 있다¹⁸⁾.

현재 삼채 열수추출물과 에탄올 추출물에 의해 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 의 발현과 산화질소의 발현을 억제

한다는 연구 결과가 발표되어 있다¹⁹⁾. 하지만 이러한 작용이 어떠한 세포 내 신호 전달 체계에 의해서 이루어지는지에 대해서는 알려지지 않았으며, 다른 염증성 사이토카인의 발현에는 어떠한 영향을 주는지에 대해서는 알려지지 않았다. 이에 본 연구는 water extract of *Allium hookeri* (WEAH)의 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 염증반응에 미치는 영향을 확인하였다. 염증성 사이토카인 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현과 이를 조절하는 NF- κ B 신호 전달 활성화를 I κ B α 인산화의 측정을 통하여 확인하는 등 삼채 추출물의 항염 효능에 관한 결과를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 삼채는 경북 청송 삼채 재배 농가로부터 2018년 5월에 제공(NO:2018-0518) 받아 기원의 진위와 품질을 자체 검증하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하여 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 Dulbecco's modified Eagle medium (WELGENE, Korea), fetal bovine serum (WELGENE, Korea), 100 U/ml penicillin-streptomycin (WELGENE, Korea), DPBS (Corning, USA), trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), potassium persulfate (sigma, USA), ABTS (Sigma, USA), MTS solution (Promega, USA), SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher, USA), Hybrid-R RNA purification kit (GeneAll, Korea), Qubit RNA Assay Kit (Molecular probes, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzymomics, Korea), anti-p-I κ B α (Cell signaling, USA), anti-I κ B α (Cell signaling, USA), anti-Gapdh (Meridian life Science/Meridian Bioscience, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO2 incubator (Thermo, USA), filter paper (Advantec No.2, Japan), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), 동결건조기(IlshineBioBase, Korea), 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) 삼채 열수 추출물 제조

건조된 삼채 뿌리 25 g을 증류수 1,000 ml에 끓는 시점부터 2 시간 동안 가열해 추출하였다. 이후 filter paper에 감압 여과한 추출액을 4,000 x g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액을 동결 건조해 WEAH를 제작하였으며, 동결건조 삼채 추출물은 4 g으로 수득률은 16%였다.

추출물은 불용성 물질을 분리하기 위해 증류수에 50 mg/ml로 녹여 13,000 x g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 분리하여 세포에 처리하였다.

2) 세포 배양

실험에 사용한 세포는 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포로 ATCC에서 구매해 실험에 사용하였다. 표준 세포 배양 법인 37℃, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였으며, Dulbecco's modified Eagle medium에 10% (v/v) fetal bovine serum 과 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin을 첨가하여 세포를 배양하였다.

3) 항산화 효능 평가

2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay를 이용하여 WEAH의 라디칼 소거능을 측정하였다. 1:1 부피 비로 혼합한 Potassium persulfate 2.4 mM, ABTS 7 mM을 실온에서 24 시간 동안 차광한 상태로 반응시켜 ABTS free radical을 만들어 사용하였다. 제작된 ABTS free radical 용액을 650 nm 흡광도가 0.7 부근이 되도록 D.W로 희석하여 ABTS working 용액을 만들었다. 이후 ABTS working solution 80 µl와 sample 20 µl를 96 well plate의 각 well에 분주하여 혼합해 4 분간 차광된 상태로 반응시켰다. 650 nm의 흡광도를 microplate reader를 이용하여 측정하였으며, 아래 식을 기반으로 하여 항산화 효능은 다음 식을 평가하였다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ & = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleblank}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100 \end{aligned}$$

4) 세포 독성 평가

대식세포의 활성도에 WEAH가 미치는 영향을 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay를 수행하였다. 96-well plate에 3,000 cells/well로 RAW 264.7 세포를 분주하여 24 시간 동안 배양하여 준비한 뒤, WEAH를 농도별로 각 well에 처리하여 다시 배양하였다. 24 시간 동안 추가로 배양한 뒤에 각 well에 MTS 시약을 첨가하여 490 nm에서 흡광도를 microplate reader를 이용해 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 시료를 처리한 세포의 활성도를 아래의 식에 적용하여 시료를 처리한 RAW 264.7 세포의 상대적인 세포 활성도를 측정, 평가하였다.

$$\begin{aligned} & \text{세포 활성도 (\%)} \\ & = (\text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100 (\%) \end{aligned}$$

5) Quantitative RT-PCR

RAW 264.7 세포를 3×10^5 cells/well로 6-well culture dish에 분주해 24 시간 동안 배양하였다. 이후 각 well을 WEAH를 2.0 mg/ml 농도까지 농도별로 처리한 media로 교

체하여 24시간 반응시킨 뒤에 염증반응을 유도하였다. 염증 반응은 각 well에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 유도하였다. WEAH가 처리된 media를 제거한 뒤 PBS를 이용하여 세척하고 Hybrid-R RNA purification kit를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 The Qubit 2.0 Fluorometer를 통하여 정량해, 500ng을 random hexamer (100 pmol/µl) 1 µl, dNTP mix (10 mM) 1 µl와 혼합하고 DEPC-treated water를 이용해 8 µl로 부피를 조정해 65℃에서 5 분간 반응시켰다. 반응 후 얼음에 냉각시킨 다음, 5X M-MLV RT reaction buffer 4 µl, M-MLV reverse transcriptase 1 µl, RNase inhibitor 1 µL, DEPC-treated water 4 µl를 첨가하여 상온에서 10분간 둔 뒤, 50℃에서 1 h 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 cDNA를 D.W를 이용해 1/5로 희석하여 실험에 사용하였다. 2X Prime Q-master mix 10 µl, 10 pmol/µl의 forward primer와 reverse primer를 각각 1.5 µl, nuclease free water 5.5 µl, cDNA 3 µl를 넣은 뒤 95℃에서 denaturation 20 s, 58℃에서 annealing 20 s, 72℃에서 elongation 20 s를 40 cycle 실시하는 조건에서 AriaMx 를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 실험에 사용한 primer는 다음과 같다. IL-1β, 5'-AGG TCA AAG GTT TGG AAG CA-3', 5'-TGA AGC AGC TAT GGC AAC TG-3'; IL-6, 5'-GTC CTT CAG AGA GAT ACA GAA ACT-3', 5'-AGC TTA TCT GTT AGG AGA GCA TTG-3'; β-actin, 5'-ATCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG', 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG-3'

6) 면역 블롯 분석

RAW 264.7 세포를 PBS로 세척한 뒤, tris-triton lysis buffer로 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분리해 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이후 5% skim milk를 PBS-T에 녹여 blocking buffer를 사용해 1시간동안 처리하여 항체의 비 특이적인 결합을 억제하였다. 그 후 blocking buffer에 희석된 anti-p-IκBα (1:500), anti-IκBα (1:500), anti-GAPDH (1:2000)을 4℃에서 12시간 동안 처리하였다. 결합하지 않은 antibody를 PBS-T로 세척하고 Super Signal system을 이용하여 Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies에 결합해 얻어진 신호를 확인하였다.

7) 자료 분석 및 통계 처리

대조군에 관한 실험군의 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. WEAH의 항산화 효능 측정

WEAH의 항산화 효능을 ABTS assay를 통해 확인하였으며 양성대조군으로 우수한 항산화 효능이 입증된 resveratrol을

설정하였다. WEAH가 첨가되지 않은 증류수 (Distilled water, D.W.)를 음성대조군으로서 0%로 하여 항산화 효능을 측정 한 결과, Resveratrol 25 μm 농도에서 $48.9 \pm 0.95\%$ 의 항산화 효능이 나타났으며 이러한 결과는 resveratrol의 우수한 radical 소거능을 말해준다. WEAH 역시 0.25 mg/ml 농도에서 $4.10 \pm 0.57\%$ 의 항산화 효능을 보였으며, 0.5 mg/ml 농도에서 $7.81 \pm 0.48\%$, 1.0 mg/ml 농도에서 $17.4 \pm 0.21\%$, 2.0 mg/ml 농도에서 $34.6 \pm 0.96\%$ 의 항산화 효능이 확인되었다(Fig. 1).

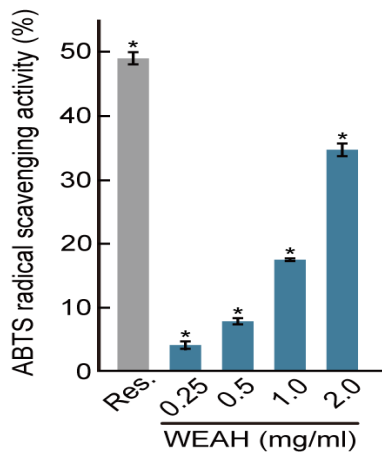


Fig. 1. ABTS radical scavenging activity of resveratrol and WEAH. Average \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ (two-sided t -test, versus control).

2. WEAH의 RAW 264.7 세포 활성도에 대한 활성

WEAH 처리에 의한 RAW 264.7 세포의 활성도 변화를 MTS assay를 통하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 여러 농도의 WEAH를 24 시간 동안 처리하여 MTS assay를 실시하였다. 가장 높은 농도인 2.0 mg/ml 농도까지 세포 활성도가 $114.6 \pm 8.86\%$ 로 세포독성이 확인되지 않았으며 1.0 mg/ml 농도에서 $102.8 \pm 7.20\%$, 0.5 mg/ml 농도에서 $92.32 \pm 5.00\%$, 0.5 mg/ml 농도에서 $106.5 \pm 1.92\%$, 0.25 mg/ml 농도에서 $96.15 \pm 6.93\%$ 로 세포 활성도에 영향이 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 WEAH이 2.0 mg/ml 농도까지 RAW 264.7 세포에서 독성을 보이지 않는 것을 알 수 있었으며, 추후

실험에서 RAW 264.7 세포에 삼채 열수 추출물을 2.0 mg/ml 까지 처리하여 염증 반응에 대한 영향을 확인하였다.

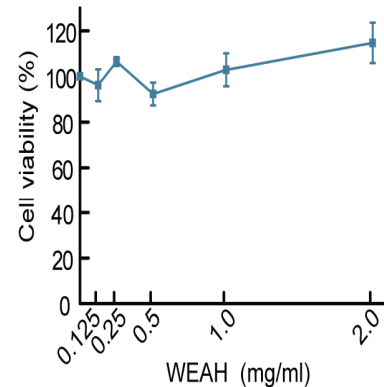


Fig. 2. Effect of WEAH on cell growth. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentration of WEAH for 24 h. Cell growth was measured by MTS assay, $n=3$ (biological replicates). Average \pm S.E.M.

3. WEAH 처리에 따른 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현

WEAH의 RAW 264.7 세포 염증반응에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 24 시간 동안 WEAH를 농도별로 처리한 후 LPS를 추가적으로 처리하여 염증 반응을 유도하였다. 염증 반응이 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증성 사이토카인 유전자들의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통하여 확인하여 염증 반응의 정도를 평가하였다. 이를 위해 발열 작용을 일으키며, 면역계, 신경 내분비계, 신경 면역계를 자극한다고 알려진 염증성 사이토카인 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현 변화를 확인하였다. LPS로 염증 반응을 유도한 RAW 264.7 세포에 WEAH를 처리한 경우를 처리하지 않은 음성 대조군과 mRNA 발현을 비교한 결과, IL-1 β 와 IL-6 모두 현저한 감소가 확인되었다. WEAH를 0.5 mg/ml 농도로 처리한 경우, 처리하지 않은 경우와 비교하였을 때 IL-1 β 는 48.5%, IL-6는 51.7%로 발현이 감소하였으며 1.0 mg/ml 농도에서 각 44.4%, 45.6%, 2.0 mg/ml 농도에서 각 39.4%, 23.7%로 발현이 감소하였다(Fig. 3).

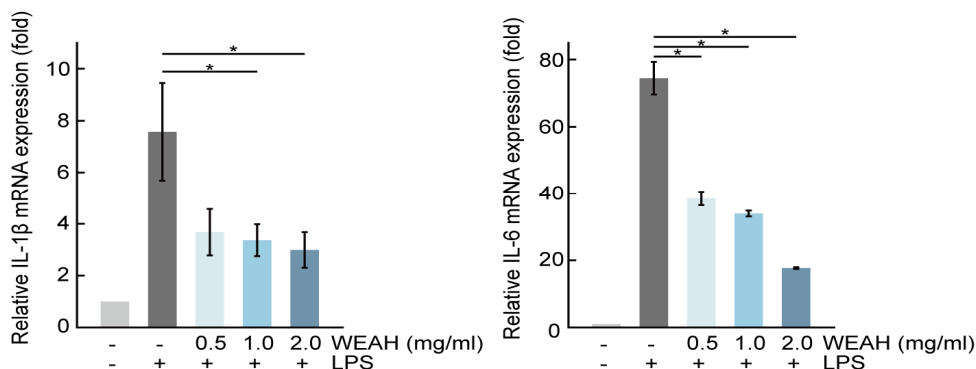


Fig. 3. Effects of WEAH on mRNA expression level of IL-1 β and IL-6. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentration of WEAH with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or without for 24 h. Total RNA was isolated and analyzed for mRNA expression with qRT-PCR. *, $p < 0.05$ (two-sided t -test, versus control). Average \pm S.E.M.

4. WEAH의 RAW 264.7 세포에서 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화 억제 효능

염증반응은 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화 작용을 통해 NF- κB 신호 작용을 촉진한다. 이러한 세포 신호전달 체계를 통하여 염증성 사이토카인 유전자의 mRNA 발현을 촉진한다. WEAH의 염증성 사이토카인의 발현 억제 효능이 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화 작용을 통한 결과인지 확인하기 위하여 immunoblot assay를 수행하였다. WEAH를 염증성 사이토카인 유전자 mRNA 발현 촉진이 확인된 농도로 동일하게 24시간 동안 처리하여 LPS에 의한 염증 반응을 유도해 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화를 확인하였다. 그 결과 2.0 mg/ml 농도에서 WEAH를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, $I\kappa B\alpha$ 의 인산화가 55% 감소하는 것이 확인되었다(Fig. 4).

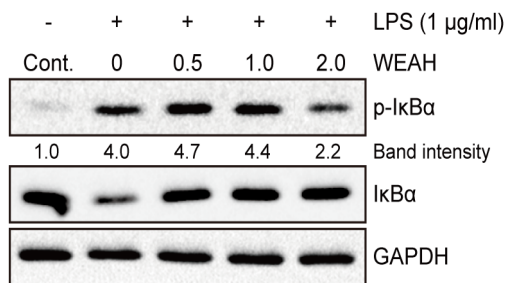


Fig. 4. Effect of WEAH on $I\kappa B-\alpha$ phosphorylation. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentration of WEAH with LPS (1 $\mu g/ml$) or without for 24 h. Immunoblot analysis was performed with anti- $I\kappa B-\alpha$, anti-phospho $I\kappa B-\alpha$ anti-bodies; Gapdh as internal control. Graphical intensity of phospho $I\kappa B-\alpha$: $I\kappa B-\alpha$ ratio was measured by ImageJ software.

IV. 고찰

염증반응은 화학물질이 체내 유입되거나 세균 반응이 일어났을 때 일어나는 일종의 면역반응이다. 이중 급성 면역반응은 대식세포가 활성화되어 진행되며, 프로스타글란딘, 일산화질소와 함께 염증성 사이토카인 같은 전염증성 인자에 의해 조절된다. 하지만 이 과정에서 전염증성 인자가 과도하게 생성되면 인근 조직이 손상되거나 면역질환을 유도할 수 있다. 따라서 대식세포의 염증 반응을 정상적인 수준으로 유지하기 위해 조절해주는 작용이 필요하며, 이를 위하여 여러 물질의 항염증 활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 염증성 질환에 대한 치료물질의 개발을 목적으로 생리학적 및 약리학적 활성 효과가 잘 알려진 파속 식물 중 하나인 삼채를 열수 추출하여 대식세포의 염증반응에 미치는 영향을 검증하였다.

WEAH의 항염증 활성을 확인하기 위하여, 삼채 열수 추출물의 활성산소 소거능을 확인하였으며, 염증 반응이 유도된 RAW 264.7 세포에 삼채 열수 추출물을 처리하여 염증성 사이토카인의 발현과 NF- κB 신호 전달에 의한 인산화 정도를 기준으로 하여 삼채 열수 추출물의 항염증 활성을 확인하는 것을 목적으로 실험을 진행하였다. RAW 264.7 세포의 염증 반응은 박테리아 유래 내독소의 일종인 LPS로 유도하였으며, LPS는 대식세포를 포함한 면역세포 전반을 자극해 염증성 사

이토카인이나, 일산화질소를 생성하도록 유도하여, 대식세포에서의 전염증성 인자의 생성을 유도할 수 있다.

전염증성 인자로서 대식세포의 대식작용에 이용되는 활성산소는 염증반응이 끝난 후 제대로 제거되지 않고 잔존하게 되면 인접 조직에 산화적스트레스를 주어 세포 사멸이 유도될 수 있다²⁰). 따라서 WEAH의 라디칼 소거능을 확인하기 위해 ABTS assay를 수행하였으며 이는 WEAH의 염증 반응에 의해 생성되는 활성산소를 얼마나 효율적으로 제거하는지 확인하기 위함이다.

또한 항산화 효능을 지닌 물질이 NF- κB 신호 전달을 억제하는 방식으로 염증반응을 억제하는 것이 관련 연구를 통해 매우 잘 알려져 있음을 감안하였을 때, 항산화 효능은 물질의 항염증 활성을 확인하는 데 있어 매우 중요한 지표이다²¹). 우수한 항산화 효능을 가지고 있는 것으로 잘 알려진 resveratrol을 양성 대조군으로 하여 삼채 열수 추출물의 농도별 라디칼 소거능을 확인한 결과, WEAH는 농도 의존적인 항산화 효능이 확인되었다. 이후 실제 대식세포에 대한 WEAH의 항염증 활성의 최적 농도를 설정하기 위하여 MTS assay를 수행하여, 대식세포에 대한 WEAH의 세포활성도를 측정하였다. 그 결과 2.0 mg/ml 농도까지 세포 활성도에 영향을 주지 않아, 최대 농도 설정 하에 항염증 활성을 확인하였다. WEAH의 농도가 증가함에 따라 항산화 효능이 증가하는 것이 확인되어 WEAH에 매우 뛰어난 농도 의존적 radical 소거 활성을 보이는 물질을 포함하고 있음을 말해준다.

염증성 사이토카인은 세포에서 방출되는 당단백질의 일종으로 면역반응을 위한 신호전달에 이용되며 이중 IL-1 β 와 IL-6는 염증 초기 단계에 생성되어 내피세포와 백혈구에 작용하고, 발열을 유발하는 물질로 급성 염증반응이 강하게 나타날수록 발현이 증가한다. 따라서 염증반응이 유도되었을 때 발현되는 IL-1 β 와 IL-6의 발현을 통하여 해당 조직 및 세포에서 염증반응이 얼마나 유도되었는지 평가할 수 있다. 따라서 WEAH를 2.0 mg/ml 농도까지 농도별로 24시간 동안 처리한 대식세포에 LPS를 처리해 전염증성 인자인 염증성 사이토카인의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 WEAH를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 WEAH 2.0 mg/ml을 처리한 뒤 염증 반응을 유도한 대식세포에서 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현이 각 39.4%, 23.7%로 감소하는 것이 확인되었다. 이러한 결과들은 WEAH가 농도 의존적으로 각 염증성 사이토카인 유전자들의 mRNA 발현을 감소시킬 수 있었으며, 이를 통해 WEAH가 포함하고 있는 물질이 RAW 264.7 세포의 염증 반응을 억제할 수 있다는 것을 말해준다.

NF- κB 신호 전달은 염증반응을 조절하는 데에 있어 매우 핵심적인 신호전달 체계이며 이러한 신호의 활성화는 $I\kappa B\alpha$ 인산화효소를 통해 $I\kappa B\alpha$ 단백질의 인산화 및 ubiquitination을 통한 분해를 유도하여 결국 전사과정의 활성화를 통한 염증성 사이토카인의 발현을 촉진한다^{22,23}). 따라서 농도별로 WEAH를 처리한 RAW 264.7 세포에 LPS 처리를 통한 염증반응을 유도하여 $I\kappa B\alpha$ 의 단백질의 인산화를 측정해 NF- κB 신호 전달의 활성화 정도를 평가하였다. 그 결과 WEAH 2.0 mg/ml 농도 처리에 의하여 대조군과의 비교에서 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화가 55%로 억제됨을 확인하였으며 이러한 결과는 WEAH에 의한 염증성 사이토카인의 전사가 억제되는 것은 NF- κB 신호 전달을 통해

조절된다는 것을 보여준다. 다만, 이러한 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화 억제 효과가 전반적인 농도에서 나타나지 않고 가장 높은 농도인 2.0 mg/ml 농도에서만 나타난 결과는 WEAH에 의해 염증성 사이토카인의 발현에 관여하는 다른 신호 전달 체계에 의한 것인지 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

또한 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현 감소가 확인되었으나 실제 단백질의 발현 역시 감소하였는지 확인할 필요가 있다. WEAH의 항염증 효능이 어떠한 유효물질에 의해서 야기되며, NF- κ B 신호 전달 이외에 다른 신호 전달 체계에 영향을 주는지 분자세포 생물학적으로 보다 자세하게 연구가 추후 진행된다면 그러한 결과를 통해 염증성 질환에 대한 치료방안으로서 삼채의 큰 가치를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구는 이상의 실험 결과를 통하여 WEAH의 항산화 효능과 RAW 264.7 세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하였으며 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증성 사이토카인의 발현 저해 효능을 확인하였다. 뿐만 아니라 이러한 염증성 사이토카인의 주 조절 메커니즘으로 알려진 NF- κ B 신호 전달 활성화에 미치는 영향을 확인하였으며 이러한 결과를 통하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. ABTS assay를 통해 양성대조군인 rasveratrol과 비교하여 WEAH의 농도 의존적인 항산화 효능을 확인하였다.
2. RAW 264.7 세포에 WEAH를 24 시간 동안 처리해 LPS를 통해 염증반응을 유도하여 염증성 사이토카인의 발현을 확인하였으며, 염증성 사이토카인의 일종인 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것이 확인되었다.
3. RAW 264.7 세포에 WEAH를 24 시간 동안 처리해 LPS를 통해 염증반응을 유도하여 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화를 기준으로 하여 NF- κ B 신호 전달 활성화를 확인한 결과, 농도 의존적인 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화가 감소하여 NF- κ B 신호 전달을 억제하는 것을 확인하였다.

이상의 결론을 근거로 하여 항산화 효능이 확인된 WEAH에 의해서 RAW 264.7 세포의 염증성 사이토카인의 발현이 농도 의존적으로 억제되었으며, NF- κ B 신호 전달 역시 억제하는 것을 확인하였다. 일련의 반응이 WEAH의 어떠한 유효물질에 의한 반응인지 연구하여 염증성 질환을 치료하는 새로운 방안을 개발하는 데 있어 크게 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업 (세부과제번호: PJ01354401)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL. Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol*. 1992;22(11):2963-71.
2. Sandulache, Vlad C. Prostaglandin E2 is activated by airway injury and regulates fibroblast cytoskeletal dynamics. *The Laryngoscope*. 2009;119(7):1365-73.
3. Ialenti A, Ianaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1992;211(2):177-82.
4. Murzin AG, Lesk AM, Chothia C. beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *J Mol Biol*. 1992;223(2):531-43.
5. Jesper I, Reimers, Ulla Bjerre, Thomas Mandrup-Poulsen, Interleukin 1 β induces diabetes and fever in normal rats by nitric oxide via induction of different nitric oxide synthases. *Cytokine*. 1994;6(5):512-20.
6. Camilla Nilsberth, Louise Elander, Namik Hamzic, Maria Norell. The Role of Interleukin-6 in Lipopolysaccharide-Induced Fever by Mechanisms Independent of Prostaglandin E2. *Endocrinology*. 2009;150(4):1850-60.
7. Bijli KM, Fazal F, Rahman A. Regulation of RelA/p65 and endothelial cell inflammation by proline-rich tyrosine kinase 2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):660-8.
8. Tang JR, Michaelis KA, Nozik-Grayck E, Seedorf GJ, Hartman-Filson M, Abman SH, et al. The NF-kappaB inhibitory proteins IkappaBalpha and IkappaBbeta mediate disparate responses to inflammation in fetal pulmonary endothelial cells. *J Immunol*. 2013;190(6):2913-23.
9. Naoko Watanabe, Yoshiro Kobayashi. Selective release of a processed form of interleukin 1 α . *Cytokine*. 1994;6(6):597-601.
10. Vogl S, Picker P, Mihaly-Bison J, Fakhrudin N, Atanasov AG, Heiss EH, et al. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine--an unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J Ethnopharmacol*. 2013;149(3):750-71.
11. He DY, Dai SM. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of paeonia lactiflora pall, a traditional chinese herbal medicine. *Front Pharmacol*. 2011;2:10.
12. Ganga Rao B, Umamaheswara Rao P, Sambasiva Rao E, Mallikarjuna Rao T, Praneeth DV. Evaluation

- of in-vitro antibacterial activity and anti-inflammatory activity for different extracts of *Rauvolfia tetraphylla* L. root bark, *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012;2(10):818-21.
13. Lee, Joomin. Physicochemical and Antioxidant Properties in *Allium Hookeri* by Hot Air-and Freeze-Drying Methods. *Korean Journal of Food Preservation*, 2016;23:57-62.
 14. Kim CH, Lee MA, Kim TW, Jang JY and Kim HJ. Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW 264,7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012;41(11):1645-48.
 15. Jung JG, Jung BR, Shin BY and Bang MA. Polyphenol analysis of the extracts from *Allium hookeri* by different pretreatment. *Korean J Plant Res*, 2013;5:148.
 16. Martin-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 2003;34(12):1563-74.
 17. Borborah K, Dutta B, Borthakur SK. Traditional uses of *Allium* L. species from North East India with special reference to their pharmacological activities. *Am J Phytomed Clin Ther* 2014;2(8):1037-51.
 18. Park SY, Je JY, Ahn CB. Phenolic composition and hepatoprotective activities of *Allium hookeri* against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress in cultured hepatocytes. *J Food Biochem* 2015;40(3):284-93.
 19. Lee Kwan-Wook, Kim Yon-Suk, Park Pyo-Jam, Jeong Jae-Hyun. Comparison of Effect of Water and Ethanolic Extract from Roots and Leaves of *Allium hookeri*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2014;43: 1808-16.
 20. Wolf JE, Kerchberger V, Kobayashi GS, Little JR. Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol*, 1987;138(2):582-6.
 21. Al-Musayeib N, Perveen S, Fatima I, Nasir M, Hussain A. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules*, 2011;16(12):10214-26.
 22. Wu L, Pu Z, Feng J, Li G, Zheng Z, Shen W. The ubiquitin-proteasome pathway and enhanced activity of NF- κ B in gastric carcinoma. *J Surg Oncol*, 2008;97(5):439-44.
 23. Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92(24):11259-63.