

오수유 물 추출물의 선천 면역 활성화와 염증 억제 효과

¹경희대학교 대학원 임상한의학과, ²경희대학교 한의과대학 부인과교실
정소미¹, 이진무^{1,2}, 이창훈^{1,2}, 황덕상^{1,2}, 장준복^{1,2}

ABSTRACT

Innate Immunity Activation and Anti-Inflammation Effects of *Evodia Rutaecarpine* Water Extract

So-Mi Jeong¹, Jin-Moo Lee^{1,2}, Chang-Hoon Lee^{1,2},
Deok-Sang Hwang^{1,2}, Jun-Bock Jang^{1,2}

¹Dept. of Clinical Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University

²Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives: This study was designed to examine immuno-modulatory effects of *Evodia Rutaecarpine* by activating innate immune system and inhibiting inflammation.

Methods: First, Cell cytotoxicity was examined with 4T1 breast carcinoma and TG-induced macrophage. To investigate activating innate immune system of Evodiamine Rutacarpine Extract (ERE) on macrophage, we tested tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-12 (IL-12), and interleukin-6 (IL-6). In addition, TNF- α and nitric oxide (NO) induced by lipopolysaccharide (LPS) were measured after treating with ERE to observe innate immune modulating effect of ERE on RAW 264.7 cell. Also, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor κ B (NF- κ B) were examined by western blot analysis.

Results: In cytotoxicity analysis, ERE significantly affected tumor cell growth above specific concentration. Also, ERE significantly affected macrophage growth above specific concentration. As compared with the control group, the production of TNF- α , IL-12 and IL-6 were increased in TG-induced macrophage. As compared with the control group, TNF- α and IL-6 were significantly up-regulated in RAW 264.7 cell. The expression of TNF- α and NO induced by LPS after treating ERE was significantly decreased compared with control group. In addition, We observed ERE inhibited the phosphorylation levels of p-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), p-Jun N-terminal kinase (p-JNK), and p-p38 in western blotting by treating ERE on RAW 264.7 cell.

Conclusions: ERE seems to have considerable impact on the anti-cancer effect by activation of innate immune system and inflammation control.

Key Words: *Evodia Rutaecarpine*, Anti-Inflammation, Innate Immunity, Cancer, Immune-Modulatory

I. 서 론

염증억제(anti-inflammation)와 면역조절(immuno-modulation)은 부인과 질환에 대한 중요한 치료 및 예방 전략 중 하나이다. 특히 염증은 자궁경부의 염증¹⁾부터 자궁근층과 내막 질환²⁾, 임신과 분만 합병증³⁾, 악성 종양^{4,5)}에 이르기까지 여성 질환 전반에 걸쳐 영향을 미치며, 정상적인 면역계의 활동을 통해 염증 반응을 억제할 수 있다.

염증은 인체가 화학적, 물리적 스트레스에 대응하여 일어나는 정상적인 방어 반응이며, 면역세포가 주요 조절자로서 작용한다. 그러나 환경 오염물질, 세균, 박테리아 등의 외부 염증 유발인자들이나 내부의 친염증성 cytokines가 체내에 축적되면 만성 염증을 유발하여 종양의 성장과 증식으로 이어질 수 있다⁶⁾.

종양 미세환경(tumor micro-environment)에는 숙주와 종양에서 유래된 cytokines가 상호간 신호를 전달하며 종양 세포의 성장, 증식, 신생 혈관 형성을 유도한다. 또한 종양 세포는 T 세포의 면역 개시를 억제하는 programmed death ligand(PD-L1)과 같은 면역 관문(immune checkpoint) 단백질을 이용하여 체내의 면역 감시를 회피한다⁷⁾.

이에 따라 최근 항암제 병용 투여 전략에서 선천 면역계 활성화, 종양 내 면역 억제 극복, 면역 감시 등이 논의되고 있으며⁸⁾, 한약재 분야의 생리활성 물질에 대한 연구도 활발히 진행 중이다. 현재까지 오수유, 산양 산삼⁹⁾, 건칠¹⁰⁾, 울금¹¹⁾, 유근피¹²⁾의 유의한 항-종양 활성이 보고된 바 있다.

오수유(吳茱萸, *Evodia rutaecarpa*)는

운향과(芸香科, Rutaceae)에 속하는 다년생 초본인 무환자나무의 열매로서, 溫中, 散寒, 利氣, 降逆하는 효능이 있어 嘔逆吞酸, 厥陰頭痛, 疝氣, 脘腹脹痛, 腸寒吐瀉를 主治한다. 그 주요 성분으로는 evodiamine, rutaecarpine, ocimene 등이 있고¹³⁾, 약리활성으로 항염증^{14,15)}, 심혈관계 보호¹⁶⁾, 간기능 개선¹⁷⁾, 지방세포 분화 억제¹⁸⁾, 통증 억제¹⁹⁾, 위장관 보호²⁰⁾ 등이 보고되었다. 특히, evodiamine과 rutaecarpine은 항염증 작용과 선천 면역 활성화 효과에 대한 연구가 다수 보고되어 있으나, 그 기전은 아직 명확히 규명되지 않은 실정이다.

이에 저자는 오수유 물 추출물(*Evodia Rutaecarpa* Water Extract, ERE)의 선천 면역 활성화와 항염증 효과를 확인하기 위하여 대식세포와 4T1 유방암 세포주에 대한 ERE의 세포 독성과 ERE로 배양한 대식세포의 cytokine 분비 유도, lipopolysaccharide (LPS) 병용 처리시 염증 물질 생성 억제 및 western blotting을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료와 방법

1. 재 료

1) 약 재

오수유는 경희한약(Wonju, Kangwon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 자연 건조한 오수유에 10배 중량의 증류수를 첨가한 후 100℃에서 4시간 동안 가열하여 추출하였다. 추출물은 다시 원심분리기(1,800 rpm, 30 min; Eppendorf, NY, USA)를 이용하여 상등액을 회수하였으며, 이를 0.2 μm의 pore size를 가지는 membrane filter(Whatman, Philadelphia, PA, USA)에 여과한 후 시료를 추출하였다. phosphate

buffered saline(PBS)을 이용하여 건조 중량에 대하여 100 mg/ml의 농도로 stock solution을 준비하였고 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 동 물

(주)새론바이오텍에서 분양받은 생후 6-8 주령의 자성 BALB/c mouse를 실험 동물장에서 사육하였다. BALB/c mouse를 5-10마리씩 사육조에 넣어 사육하였고, 정수된 물과 실험동물용 펠렛사료(Samyang Co. Ltd, Incheon, Korea)를 자유 공급하였다. 또한 스트레스를 받지 않도록 주의하며, 온도 22°C, 습도 50%의 환경을 조성하고, 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 사육하였다.

3) 시 약

세포 배양을 위한 rosewell park memorial insitute(RPMI)-1640 및 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)과 항생제(antibiotic-antimycotic mixture)는 Thermo Fisher Scientific Inc.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. BALB/c mouse의 염증을 유도하기 위해 사용한 LPS와 nitric oxide(NO) 분석을 위한 Griess Assay kit는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 독성 효과 분석을 위한 cell counting kit인 EZ-Cytox Kit는 iTSBio(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 염증 물질인 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-6, IL-10, IL-12 분석을 위한 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 Pharmingen(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. anti-phospho-Jun N-terminal kinase(JNK), anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase(ERK) 및 anti-phospho-p38 protein kinase 항체는 Cell

Signaling Technology(Boston, MA, USA)에서 구입하였다. 또한 신호 전달 분석을 위한 anti-nuclear factor κ B(NF- κ B) 및 anti- β -actin, horseradish peroxidase(HRP)-conjugated secondary antibodies는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

4) 세포주 및 세포 배양

RAW 264.7 세포 및 4T1 유방암 세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS와 penicillin/streptomycin(P/S)을 포함하는 DMEM에서, 4T1 유방암 세포주는 5% FBS와 P/S를 포함하는 RPMI-1640에서 배양하였다. 또한 37°C와 5% CO₂의 함량을 유지하며 2-3일 간격으로 계대배양 하였다. 6주령 BALB/c mouse의 복강에 3% thioglycollate(TG) 1 ml를 주사하고, 3일 후에 경추 탈골법으로 BALB/c mouse를 희생시킨 후 복강에 DMEM 10 ml를 주입하여 배양하였다. 이후 복강내 세포(peritoneal exudative cell, PEC)를 수집하여 배양하고, 배양액을 세척하여 TG-induced macrophage를 얻었다.

2. 방 법

1) 세포 독성 측정

4T1 유방암 세포주를 5×10³ cells/well의 밀도로 96-well plate의 각 well에 분주한 후, 3.2 μ g/ml, 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 농도의 ERE를 첨가하여 3일간 배양하였다. RAW 264.7를 2×10⁶ cells/well의 밀도로 96-well plate의 각 well에 분주한 후, 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 2000 μ g/ml 농도의 ERE를 첨가하여 1일간 배양하였다. 각 물질의 세포독성 효과는 water soluble tetrazolium salt(WST)

를 이용하는 WST-1 Assay(EZ-Cytox cell viability kit)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 30분 후에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 대식세포 자극 후 Cytokine 분비량 측정

24-well plate에 TG-induced macrophage를 2.5×10^6 cells/well의 밀도가 되도록 조정하여 분주하고, RAW 264.7 세포를 2.0×10^6 cells/well의 밀도가 되도록 조정하여 분주한 후, 2시간 동안 배양하였다. 배양 이후 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 ERE를 각 well에 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 TG-induced macrophage 세포상등액에 분비된 TNF- α , IL-12 및 IL-6, RAW 264.7 세포의 세포상등액에 분비된 TNF- α 및 IL-6 양을 각 cytokine에 대한 ELISA kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였고, 표준 곡선에 대입하여 생산량을 정량하였다.

3) LPS 처리한 대식세포의 염증 억제 활성화 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2.0×10^6 cells/well의 밀도로 plating하였다. 2시간 동안 세포를 안정화한 후, ERE의 최종 농도가 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$ 되도록 조정하여 2시간 동안 배양하였다. 이후 LPS의 최종 농도가 200 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 첨가하고 22시간 동안 추가로 배양한 후 각 well에 생산된 TNF- α , NO의 함량을 측정하였다. NO는 Griess 반응에 의한 비색법으로 측정하였는데, 세포배양 상등액 및 Griess 시약을 각 0.1 ml씩 혼합하여 암실에서 10분 동안 배양하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액에 생산된 NO의

함량은 sodium nitrite 표준 용액을 이용한 표준 곡선에 대입하여 측정하였고, TNF- α 의 측정은 ELISA kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

4) Western Blotting Assay

RAW 264.7 세포에 100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 ERE를 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. 이후 4°C의 PBS로 3회 세척하고, radioimmune precipitation assay(RIPA) buffer(1 mM dithiothreitol (Wako, Tokyo, Japan), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma), protease inhibitor cocktail(Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN, USA))를 이용하여 30분간 세포를 용해하였다. 이후 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리기를 이용하여 세포 상등액을 추출한 후, Pierce BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 균당 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 전기영동하여 단백질을 분리하고, nitrocellulose membrane(Bio-Rad, USA)에 transfer하였다. 이후 membrane에 5% skim milk in tris-buffered saline(TBS) containing 0.1% tween 20(TBST)를 이용하여 상온에서 1시간 동안 blocking 처리하였다. 1차 항체를 먼저 4°C에서 overnight 반응시킨 후 TBST를 이용하여 세척하고, HRP가 표지된 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시키고, membrane상에서 항체들과 반응한 단백질을 enterochromaffin-like(ECL) 기질(GE Healthcare Life Sciences)에 적용시켜 X-ray film에 감광하여 특정 단백질 발현의 양을 분석하였다.

5) 통계 분석

실험결과에 대한 통계 분석 처리는 SPSS

version 24.0을 이용하였고, 대조군에 대한 실험군의 통계적 유의성은 student's t-test로 분석하여 P-values<0.05인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포독성 평가

1) 4T1 유방암 세포주에 대한 세포독성 평가

4T1 유방암 세포주에 3.2 µg/ml, 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml 농도의 ERE를 첨가하고 세포 독성을 측정된 결과, 각각 105.8%, 105.8%, 98.3% 및 55.9%로 나타나 400 µg/ml에서 세포독성이 있음을 확인하였다(p<0.01)(Fig. 1).

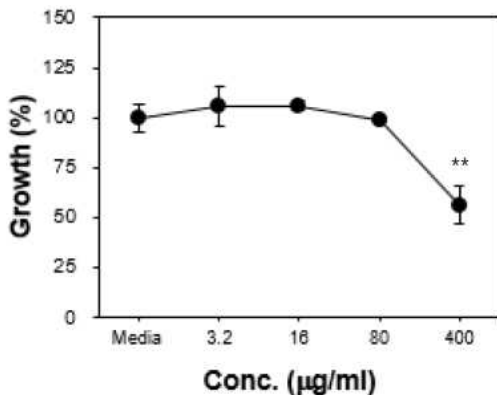


Fig. 1. Cytotoxicity of ERE on 4T1 breast carcinoma cell.

** : p<0.01, statistically significant difference compared with media group

2) RAW 264.7 대식세포에 대한 세포독성 평가

RAW 264.7 대식세포에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 첨가하고 세포 독성을 측정된 결과, 각각 100.65%, 102.67%, 95.6% 및 76.26%로 나타났다. 2000 µg/ml 농도에서 ERE가

대식세포에 세포독성이 있고, 400 µg/ml 이하의 농도에서는 세포독성이 없음을 확인하였다(p<0.05)(Fig. 2).

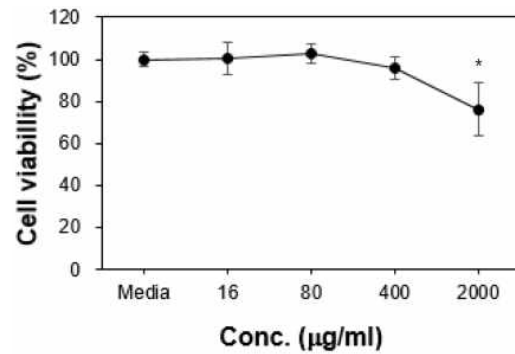


Fig. 2. Cytotoxicity of ERE on RAW 264.7 cell.

* : p<0.05, statistically significant difference compared with media group

2. 대식세포 자극 후 Cytokine 생산 활성

1) TNF-α

TG-induced macrophage에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 처리한 후 분비된 TNF-α를 측정된 결과, 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서 각각 49.3±9.1 pg/ml, 372.3±15.3 pg/ml, 475.2±27.6 pg/ml, 430.9±15.7 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(p<0.05)(Fig. 3).

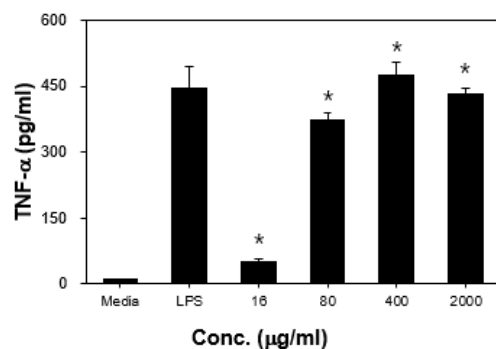


Fig 3. Production of TNF-α from TG-induced macrophages stimulated by ERE.

* : p<0.05, statistically significant difference compared with media group

2) IL-12

TG-induced macrophage에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 처리한 후 분비된 IL-12를 측정 한 결과, 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서 각각 54.1±0.7 pg/ml, 390.3 ±5.2 pg/ml, 477±2.3 pg/ml, 66.1±10.1 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(p<0.05)(Fig. 4).

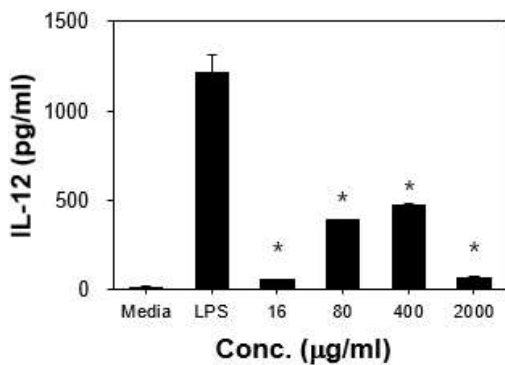


Fig. 4. Production of IL-12 from TG-induced macrophages stimulated by ERE. *: p<0.05, statistically significant difference compared with media group

3) IL-6

TG-induced macrophage에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 처리한 후 분비된 IL-6를 측정 한 결과, 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서 각각 46.4±7.2 pg/ml, 603±57 pg/ml, 1983.5±128.9 pg/ml, 1193.2±15.8 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(p<0.05)(Fig. 5).

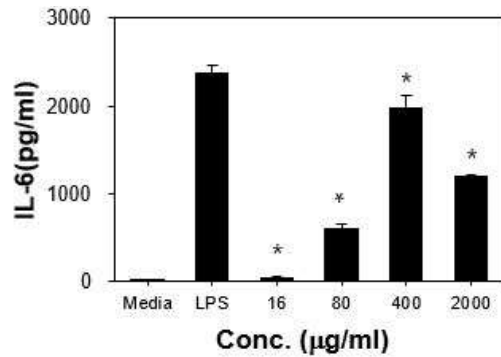


Fig. 5. Production of IL-6 from TG-induced macrophage stimulated by ERE. *: p<0.05, statistically significant difference compared with media group

3. RAW 264.7 세포 자극 후 Cytokine 생산 활성화

1) TNF-α

RAW 264.7 세포에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 처리한 후 분비된 TNF-α를 측정 한 결과, 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서 57.89±3.27 pg/ml, 215.49±18.8 pg/ml, 451.16±12.16 pg/ml, 557.05±23.49 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(p<0.01)(Fig. 6).

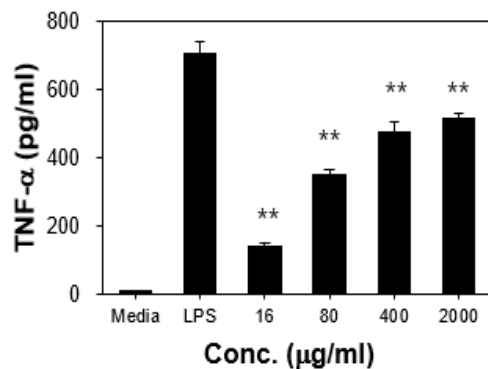


Fig. 6. Production of TNF-α from RAW 264.7 cell stimulated by ERE. **: p<0.01, statistically significant difference compared with media group

2) IL-6

RAW 264.7 세포에 16 µg/ml, 80 µg/ml,

400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 처리한 후 분비된 IL-6를 측정 한 결과, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서 106.51 ±184.47 pg/ml, 674.23±25.70 pg/ml, 2503.21 ±25.39 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(p<0.05) (Fig. 7).

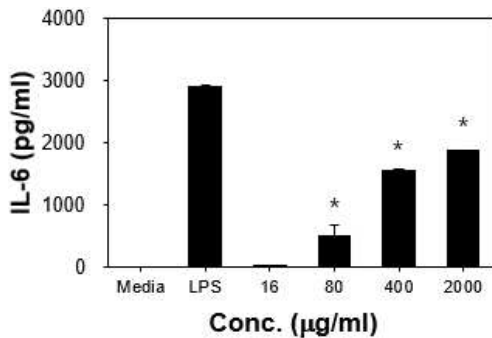


Fig. 7. Production of IL-6 from RAW 264.7 cell stimulated by ERE.
*: p<0.05, statistically significant difference compared with media group

4. 대식세포에 LPS 처리 후 염증 억제 활성 효과

1) TNF-α

RAW 264.7 세포에 116 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 배양하고 LPS로 자극한 후 TNF-α의 분비를 관찰한 결과, 80 µg/ml 농도에서 383.17 ±11.76 pg/ml로 LPS 단독 처리한 경우 469.19±52.34 pg/ml에 비하여 유의하게 (p<0.05) 감소하였고, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도에서 319.42±29.254 pg/ml, 255.03±25.7 pg/ml로 나타나 LPS 단독 처리한 경우에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (p<0.01)(Fig. 8).

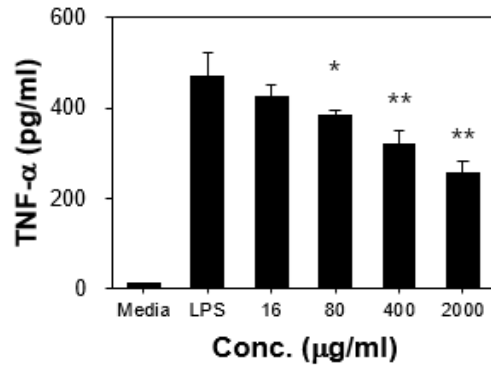


Fig. 8. Production of TNF-α from RAW 264.7 cell before and after stimulation of LPS.
*: p<0.05, **: p<0.01, statistically significant difference compared with LPS treated group

2) NO

RAW 264.7 세포에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 배양하고 LPS로 자극한 후 NO의 분비를 관찰한 결과, 대조군 21.02±0.28783 µM에 비하여 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도에서 17.77±0.33 µM, 14.05±0.7 µM, 11.99±0.13 µM로 통계적으로 유의하게 (p<0.01) 감소하였다(p<0.01)(Fig. 9).

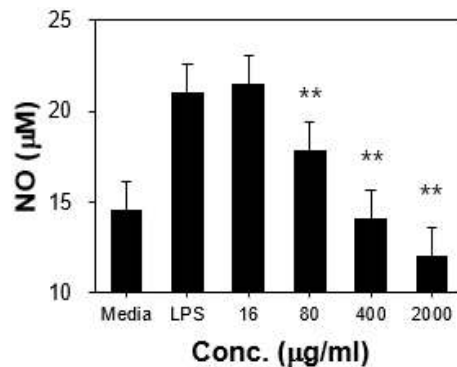


Fig. 9. Production of NO from RAW 264.7 cell before and after stimulation of LPS.
**: p<0.01, statistically significant difference compared with LPS treated group

5. NF-κB 신호전달 경로의 활성화 억제 효과

RAW 264.7 세포에 100 µg/ml, 1000 µg/ml

농도의 ERE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 NF- κ B 신호전달 관련 단백질의 변화를 측정된 결과, LPS 단독 처리한 대조군에 비해 인산화된 p-p65가 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 10).

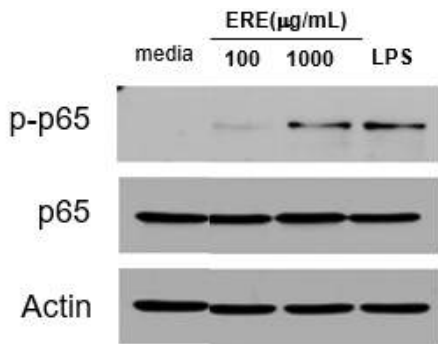


Fig. 10. Inhibition of NF- κ B pathway by treatment of ERE and LPS on RAW 264.7 cell.

6. MAPK 신호전달 경로의 활성화 억제 효과

RAW 264.7 세포에 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml 농도의 ERE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 MAPK 신호전달 관련 단백질의 변화를 측정된 결과, LPS 단독 처리한 대조군에 비해 인산화된 p-ERK, p-JNK, p-p38가 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 11).

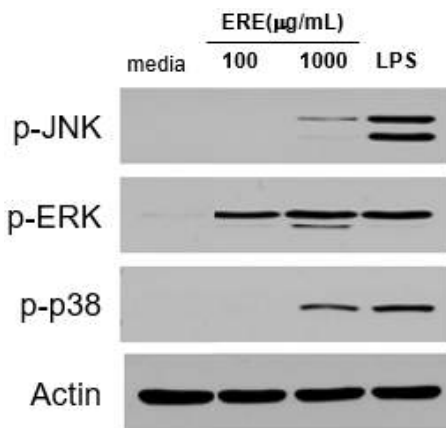


Fig. 11. Inhibition of MAPK pathway by treatment of ERE and LPS on RAW 264.7 cell.

IV. 고찰

염증 반응은 면역세포가 생성하는 친염증성 인자들이 NF- κ B 및 MAPK와 같은 세포내 신호전달 통로의 활성화하여 발생한다. 이러한 염증 반응은 병원성 감염원으로부터 유기체를 보호하는 생리작용으로서 필수적이나, 적절하게 조절되지 않은 염증 반응은 만성 질환이나 악성 종양을 초래할 수 있다²¹⁾.

종양 미세환경에 존재하는 PD-L1과 같은 면역억제 인자들은 체내 면역세포의 공격을 무력화하여 기존의 표준 항암 화학요법만으로는 항종양 효과가 제한적일 수밖에 없었다²²⁾. 이러한 종양 세포의 낮은 면역원성(immunogenicity)과 면역회피(immune evasion)를 극복하고자 면역항암제가 개발되었고, 이를 통해 면역세포가 종양세포를 보다 효율적으로 감지하여 공격할 수 있게 되었다²³⁾.

단일클론항체를 이용한 면역관문 억제제 등의 면역항암제 치료는 최근 다양한 암종의 환자에게서 고무적인 치료 효과를 도출해내었다. 그러나 면역항암제로 인해 과도한 면역 활성화가 유도되어 종종 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군, 건선, 갑상선 질환 등의 자가면역질환을 포함한 다양한 부작용이 보고되기도 하였다^{24,25)}.

전 세계적으로 천연물로부터 면역 활성 물질을 탐색하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 특히 한약재는 오랜 시간에 걸쳐 임상 효과와 안전성이 검증된 분야로서 본 연구에서는 체계적인 실험연구를 통해 항염증 효과와 선천면역 활성화의 기전을 확인하여 임상에 적용할 수 있는 근거를 마련하고자 하였다.

오수유는 성미가 小毒하고, 辛苦溫하며, 肝, 脾, 腎, 胃로 歸經한다¹³⁾. 《本草綱目》에서는 오수유가 “溫中下氣, 止痛, 除濕血痺, 解逆寒熱”이라 하여, 오수유가 五臟을 通利하고 散寒溫中하여 心腹의 諸冷絞痛을 능히 다스림을 설명하고 있다²⁶⁾. 또한 《東醫寶鑑》에서는 오수유가 “主腹痛不可忍, 能煖膀胱”라 하여, 溫裏之劑로서 하복부의 냉성 통증에 활용됨을 언급하고 있다²⁷⁾. 오수유의 주요 활성 성분인 evodiamine과 rutaecarpine은 암세포의 세포 사멸사를 유도하고, 전이를 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다. 또한 LPS 고용량을 투여하여 패혈증 쇼크를 유도한 쥐 모델에 오수유를 투여한 실험연구에서 오수유가 농도 의존적으로 iNOS의 과활동을 억제하여 NO의 과생성을 예방하고, 염증 반응을 억제하는 것을 확인한 바 있다²⁸⁾.

이에 저자는 오수유의 선천 면역 활성화와 염증 억제 효과를 확인하고자 4T1 유방암 세포주 및 RAW 264.7 세포에 대한 ERE의 세포독성과 RAW 264.7 세포 및 TG-induced macrophage의 cytokine 분비 유도, LPS 병용 처리시 염증 물질 생성 억제, MAPK 및 NF-κB 신호전달경로를 확인하기 위해 p-ERK, p-JNK, p-p38, p-p65를 western blotting으로 관찰하였다.

오수유의 암세포에 대한 세포독성 효과를 알아보기 위하여 4T1 유방암 세포주에 3.2 μg/ml, 16 μg/ml, 80 μg/ml, 400 μg/ml 농도의 ERE를 처리하였다. 그 결과 400 μg/ml 농도의 ERE 처리군에서 대조군의 55.9%만큼 세포 증식하여 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 암세포 증식이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

한 선행연구에서는 오수유를 MDA-MB-231

유방암 세포주에 처리하여 evodiamine이 세포분열 주기의 성장단계인 G1기를 중지하여 세포 사멸을 유발한 결과를 보고하였다²⁹⁾. 또한 유방암을 유도한 BALB/c mouse에 오수유 주입 후 H&E staining한 결과, 유방암세포의 증식이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다³⁰⁾.

이는 유방암 세포주에 오수유 첨가 후 WST-1 assay를 통해 유방암세포주의 생존율이 감소되는 것을 확인한 이 실험의 결과와 부합한다. 아울러 오수유는 현재까지 유방암 외에 난소암³¹⁾, 폐암³²⁾, 직장암³³⁾, 위암³⁴⁾, 구강암³⁵⁾, 간암³⁶⁾, 전립선암³⁷⁾, 흑색종³⁸⁾ 세포주에 대해서도 종양 세포 사멸 효과와 종양 증식 억제 활성이 있음이 보고된 바 있다.

RAW 264.7 대식세포에 16 μg/ml, 80 μg/ml, 400 μg/ml, 2000 μg/ml의 농도로 ERE를 처리하였고, 그 결과 2000 μg/ml의 농도에서 76.26%로, 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 억제되었으나, 400 μg/ml 이하의 농도에서는 세포독성이 없음을 확인하였다(Fig. 2).

오수유를 TG-induced macrophage와 RAW 264.7 세포에 처리한 결과, TG-induced macrophage에서는 모든 농도에서의 TNF-α, IL-12와 IL-6의 분비가 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3, 4, 5). 또한 RAW 264.7 세포에서는 TNF-α는 모든 농도에서, IL-6은 80 μg/ml, 400 μg/ml, 2000 μg/ml의 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 6, 7).

선천 면역계의 대식세포와 NK세포는 종양세포 살해 활성을 가지며, M1으로 극성화된 대식세포는 TNF-α, IL-6, IL-12와 같은 친염증성 cytokine을 분비한다⁶⁾. 이 cytokines는 다시 작동세포의 활성화

를 유도하고 염증 반응을 촉진하며 종양 성장을 억제한다. TNF- α 는 종양 세포의 자멸사를 유도하거나 T세포의 분화 및 증식을 촉진하여 선천 면역 반응에 폭넓게 관여한다. IL-6는 보체의 생산을 촉진하고, 다양한 식세포의 탐식작용을 증강한다. IL-12는 종양 세포 살해능을 가진 세포독성 T세포와 NK세포를 자극하여 종양의 성장을 억제한다³⁹⁾.

그러나 염증성 cytokine이 과도하게 축적되면 오히려 종양세포의 증식을 촉진하기도 하여 항-종양 활성화에 부정적 요소가 될 수 있다⁴⁰⁾. 종양에서 신생항원이 분비되면 수지상 세포가 항원을 포획하여 제시하고 T세포가 항원에 대해 활성화된다. 이때 T세포가 항원을 비-자기(non-self)로 인식하여 공격하는 것이 정상 면역반응이나 종양 환경에서는 이러한 종양-면역 순환(cancer-immunity cycle)이 제대로 작동되지 않는다. 따라서 면역 반응을 자극, 억제하는 인자를 조절하여 비-자기의 인지와 자가면역 억제 사이의 균형을 유지하고자 하는 연구가 진행되고 있다.

기존연구에 따르면 종양 환경에서 TNF- α 는 수지상세포의 항원 제시능을 촉진하며, IL-12는 림프계에서 종양 공격의 개시를 촉발한다⁴¹⁾. 이 실험에서는 TG-induced macrophage에 ERE 첨가 후 TNF- α , IL-12, IL-6의 분비가 증가하는 것을 확인하였다. 이를 기존연구와 종합적으로 볼 때, 오수유의 선천 면역 활성능을 활용하면 종양 성장의 억제 작용도 기대할 수 있으리라 사료된다.

ERE의 염증 억제 활성을 확인하고자 RAW 264.7 세포에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml, 2000 μ g/ml 농도의 ERE를

배양한 후, LPS로 자극하였다. 이후 상층액에 분비된 TNF- α 와 NO의 분비량을 관찰한 결과 LPS 단독 처리군에 비해 TNF- α 의 생성이 400 μ g/ml, 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었고, NO의 분비가 80 μ g/ml, 400 μ g/ml, 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었다(Fig. 8, 9).

나아가 오수유가 대식세포의 세포 내 신호전달계에 미치는 영향을 확인하고자 RAW 264.7 세포에 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml 농도의 ERE를 처리하고 LPS로 자극한 후 western blotting을 시행하였다. 그 결과 NF- κ B 신호전달 경로의 p-p65의 발현이 억제하였고, MAPK 신호전달 경로의 p-p38, p-ERK, p-JNK의 발현이 억제하였다. 이를 통해 오수유가 NF- κ B, MAPK 신호전달경로의 활성 억제를 통해 염증 반응을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 10, 11).

LPS는 TNF- α , IL-12 등의 친염증성 cytokine과 NO의 생성을 유도하는 독소이다. LPS가 대식세포막의 toll like receptor (TLR)와 같은 패턴인식수용체에 결합하면 MAPK 및 NF- κ B 신호전달경로가 활성화된다. 신호전달이 개시되면 I κ B, p65/p50 단백질이 인산화되고, 일련의 신호전달을 통해 최종적으로 친염증성 cytokine과 NO가 생산된다. NO는 대식세포가 생산하는 자유라디칼이며 체내에서 신경전달물질로 작용하지만 NO가 축적되면 숙주의 조직을 손상하기도 한다⁴²⁾.

최신 연구에서는 오수유를 KBM-5 백혈병 세포주에 처리하여 evodiamine이 p65의 인산화와 핵내 이동과 같은 일련의 신호전달을 억제하여 NF- κ B 활성을 억제하는 것을 확인하였다⁴³⁾. 또한 오수유를 A2780 난소암 세포주에 처리하여 세포 독성을 확인한 선행 연구에서는, 세포 증식

억제가 MAPK 신호전달경로의 자극을 통해 유도되는지 확인하고자 MAPK의 JNK와 ERK 억제제를 오수유와 병용 처리하였다. 그 결과 난소암 세포주의 생존율이 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었다³⁰⁾. 이러한 기존 연구들과 본 실험을 종합적으로 볼 때, 오수유는 MAPK 및 NF- κ B 신호전달경로를 자극하여 항염증 반응을 유도하는 활성이 있는 것으로 사료된다.

다수의 기존 연구에서 오수유의 활성 성분인 evodiamine과 rutaecarpine이 항염증 활성이 있으며, NF- κ B와 같은 전사인자를 억제하여 항염증을 유도하는 것이 보고된 바 있다. 이 실험에서는 LPS 자극 없이 ERE 단독으로 대식세포를 자극하여 TNF- α , IL-12, IL-6의 친염증성 cytokine의 분비가 증가하는 것을 확인하였다.

결과적으로 오수유 단독으로 대식세포를 자극한 경우 염증 매개 cytokine의 분비가 증가하고, ERE와 LPS를 병용 처리한 경우 염증성 매개물질의 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 이는 이 실험에서 오수유의 특정 활성성분만을 추출하여 시료로서 사용한 것이 아니라 ERE 자체를 사용하였기에 나온 결과로 사료된다. 즉, ERE는 항염증 활성이 있으면서 동시에 면역계를 자극하는 활성 성분도 있음을 시사하는 것이다. 종합적으로 오수유는 친염증성과 항염증성의 상반된 활성 성분을 동시에 가지며 선천면역계와 염증 반응을 조절할 수 있는 면역 조절능이 있는 약재로 판단된다. 이러한 오수유의 면역조절능을 활용하면 항종양효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되며, 기존 항암제와의 병용 투여시 상승 작용을 유도할 수 있는 가능성을 지닐 것으로 사료된다.

그러나 이번 연구는 BALB/c mouse를 이용한 생체 외 연구라는 한계가 있으며, 대식세포 위주의 선천면역 활성화에 국한된 연구로서 추후 동물실험이나 임상 연구를 진행할 필요가 있다. 또한 오수유 추출물이 어떤 기전으로 유방암 세포주에 대해 세포독성 활성을 가졌는지에 대한 후속 연구를 시행하여야 한다. 아울러 추후 면역억제 활성을 가진 성분과 면역 자극 활성을 가진 성분을 분리 추출하여 추가 연구를 진행할 필요가 있다. 이러한 점을 보완하여 오수유 추출물의 유효성과 안전성을 검증하는 후속 연구를 진행한다면, 면역 활성을 통한 새로운 항암제 개발에 기여할 가능성이 있으리라 생각한다.

V. 결 론

오수유 물 추출물(ERE)이 암세포와 대식세포에 미치는 영향을 알아보고자 유방암 세포주 4T1과 TG-induced macrophage, RAW 264.7 세포에 처리한 후 WST-1 assay, ELISA kit, Griess assay kit, western blot을 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 4T1 유방암 세포주에 3.2 μ g/ml, 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 농도의 ERE를 처리한 결과, 400 μ g/ml의 농도에서 유의하게 세포 증식이 억제되었다.
2. RAW 264.7 대식세포에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml, 2000 μ g/ml 농도의 ERE를 처리한 결과, 400 μ g/ml 이하의 농도에서 대식세포에 대해 세포독성이 없음을 확인하였다.
3. TG-induced macrophage에 16 μ g/ml,

- 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 처리한 결과, TNF-α, IL-12, IL-6가 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서 유의하게 증가하였다.
4. RAW 264.7 세포에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 처리한 결과, TNF-α는 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서, IL-6는 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml에서 유의하게 증가하였다.
 5. RAW 264.7 세포에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml 농도의 ERE를 첨가하고 LPS로 자극한 결과 LPS 단독 처리한 군에 비해 NO는 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제되었으며, TNF-α는 400 µg/ml, 2000 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제되었다.
 6. RAW 264.7 세포에 100 µg/ml, 1000 µg/ml 농도의 ERE를 첨가하여 western blotting한 결과, NF-κB 신호전달 관련 단백질인 p-p65의 발현이 대조군에 비해 억제되었다.
 7. RAW 264.7 세포에 100 µg/ml, 1000 µg/ml 농도의 ERE를 첨가하여 western blotting한 결과, MAPK 신호전달 관련 단백질인 p-p38, p-ERK, p-JNK의 발현이 대조군에 비해 억제되었다.

- Received : Apr 15, 2021
- Revised : Apr 19, 2021
- Accepted : May 28, 2021

References

1. Bradley F, et al. The vaginal microbiome amplifies sex hormone associated cyclic changes in cervicovaginal inflammation and epithelial barrier disruption. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80(1):1-13. Available from:URLhttp://doi.org/10.1111/aji.12863
2. de Ziegler D, Pirtea P, Ayoubi JM, et al. Inflammation and uterine fibrosis: the possible role of chronic endometritis. *Fertil Steril.* 2019;111(5):890-1.
3. Romero R, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(5):458-74.
4. Macciò A, Madeddu C. Inflammation and Ovarian cancer. *Cytokine.* 2012;58(2):133-47.
5. Modugno F, et al. Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis. *Cancer Epidomol Biomarkers Prev.* 2005;14(12):2840-7.
6. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell.* 2016;166(2):288-98.
7. Frankel T, Lanfranca MP, Zou W. The Role of Tumor Micro environment in Cancer Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1036:51-64.
8. Vinay DS, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;35 Suppl:S185-98.
9. Lee DY, et al. Anti-Cancer Effects of Panax Ginseng Berry Polysaccharides via Activation of Immune-Related Cells.

- Front Pharmacol. 2019;10:1411. Available from:URL:<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01411>
10. Lee KW, et al. Rhus Verniciflua Stokes extract induces inhibition of cell growth and apoptosis in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Oncol Rep.* 2018;39(3):1141-7.
 11. Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules.* 2011;16(6):4567-98.
 12. Kwon DH, et al. Immunomodulatory activity of water extract of *Ulmus Macrocarpa* in macrophages. *Journal of Life Science.* 2016;26(1):50-8.
 13. National College of Korean Medicine Textbook Compilation Committee. *Herbology.* Seoul:Younglimsa. 2011(2):379-80.
 14. Liao JF, et al. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (Wuzhuyu) and its major bioactive components. *Chin Med.* 2011;6:1-8. Available from:URL:<http://www.cmjournal.org/content/6/1/6>
 15. Yoon JY, et al. Methanol extract of *Evodia Lepta* displays Syk/Src targeted anti-inflammatory activity. *J Ethanopharmacol.* 2013;148(3):999-1007.
 16. Tian KM, Li JJ, Xu SW. Rutaecarpine: A promising cardiovascular protective alkaloid from *Evodia Rutaecarpa*. *Pharmacol Res.* 2019;141:541-50.
 17. Li X, et al. Evodiamine and rutaecarpine from *Tetradium Ruticarpum* in the treatment of liver diseases. *Phytomedicine.* 2020;68:153180. Available from:URL:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153180>
 18. Bak EJ, et al. Inhibitory effect of evodiamine alone and in combination with rosiglitazone on in vitro adipocyte differentiation and in vivo obesity related to diabetes. *Int J Obes(Lond).* 2010;34(2):250-60.
 19. Kobayashi Y. The nociceptive and anti-nociceptive effects of evodiamine from fruits of *Evodia Rutaecarpa* in mice. *Planta Med.* 2003;69(5):425-8.
 20. Wang QS, et al. Protective effects of alginate-chitosan microspheres loaded with alkaloids from *Coptis Chinensis* Franch. and *Evodia Rutaecarpa* (Juss.) Benth. (Zuojin Pill) against ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:6151-65.
 21. Elinav E, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:759-71.
 22. Chen S, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):305. Available from:URL:<https://doi.org/10.1186/s40425-019-0770-2>
 23. Vinay DS, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;35 Suppl:S185-98.
 24. Pauken KE, et al. Adverse Events Following Cancer Immunotherapy:

- Obstacles and Opportunities. *Trends Immunol.* 2019;40(6):511-23.
25. Abdel-Wahab N, Alshawa A, Suarez-Almazor ME. Adverse Events in Cancer Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2017;995:155-174.
26. Lee SJ. Bonchogangmok. Seoul:Munsacheol Publishing Co. 2018:542-44.
27. Heo J. Dongeuibogam. Gyeongnam: Dongeuibogam Publishing Co. 2004:1152.
28. Chiou WF, et al. Evodia rutaecarpa protects against circulation failure and organ dysfunction in endotoxaemic rats through modulating nitric oxide release. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54(10):1399-405.
29. Du J, et al. Evodiamine induces apoptosis and inhibits metastasis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2013;30(2):685-94.
30. Wang KL, et al. Anti-Proliferative Effects of Evodiamine on Human Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2013;8(6):e67297.
31. Chen TC, et al. Evodiamine from Evodia Rutaecarpa induces apoptosis via activation of JNK and PERK in human ovarian cancer cells. *Phytomedicine.* 2016;23(1):68-78.
32. Fang C, et al. Evodiamine induces G2/M arrest and apoptosis via mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in H446 and H1688 human small-cell lung cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(12):e115204.
33. Chien CC, et al. Activation of JNK contributes to evodiamine-induced apoptosis and G2/M arrest in human colorectal carcinoma cells: a structure-activity study of evodiamine. *PLoS One.* 2014;9(6):e99729.
34. Yue G, et al. Synergistic anticancer effects of polyphyllin I and evodiamine on freshly removed human gastric tumors. *PLoS One.* 2013;8(6):e65164.
35. Sachita K, et al. In vitro assessment of the anticancer potential of evodiamine in human oral cancer cell lines. *Phytother Res.* 2015;29(8):1145-51.
36. Yang J, et al. Evodiamine inhibits STAT3 signaling by inducing phosphatase shatterproof1 in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2013;328(2):243-51.
37. Kan SF, et al. Anti-proliferative effects of evodiamine on human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *J Cell Biochem.* 2007;101(1):44-56.
38. Wang C, Li S, Wang MW. Evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death was mediated by PI3K/Akt/Caspase and Fas-L/NF- κ B signaling pathways and augmented by ubiquitin-proteasome inhibition. *Toxicol in Vitro.* 2010;24(3):898-904.
39. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1014-22.
40. Diakos CI, et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):e493-503.
41. Chen DS, Mellman I. Oncology meets

- immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
42. Chen LQ, et al. Nitric oxide production inhibition and mechanism of phenanthrene analogs in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(10):2521-5.
43. Takada Y, Kobayashi Y, Aggarwal BB. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappaB activation by inhibiting IkappaBalpha kinase activation, thereby suppressing NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J Biol Chem*. 2005;280(7):17203-12.