

맥문동 물 추출물의 선천면역 활성화와 염증억제 효과

¹경희대학교 대학원 임상한의학과, ²경희대학교 한의과대학 부인과교실
강누리¹, 황덕상², 이진무², 이창훈², 장준복²

ABSTRACT

The Effects of *Liriopsis Tuber Water Extract* on Innate Immune Activation and Anti-Inflammation

Nu-Ri Kang¹, Deok-Sang Hwang², Jin-Moo Lee²,
Chang-Hoon Lee², Jun-Bock Jang²

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

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

Objectives: This study was designed to examine the anti-cancer activity by innate immunomodulating and anti-inflammatory effects of *liriopsis tuber water extract* (LPE).

Methods: Cell cytotoxicity was tested with 4T1 mouse mammary carcinoma cells, spleen cells, macrophage, and RAW264.7 cells. To investigate innate immunomodulating effects of LPE on macrophage, we measured tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-12 (IL-12), and interleukin-10 (IL-10). To investigate innate immunomodulating effects of LPE on RAW264.7 cell, we measured TNF- α , interleukin-6 (IL-6). In addition, TNF- α and nitric oxide (NO) induced by lipopolysaccharide (LPS) were measured after treating with LPE to observe innate immunomodulating effect of LPE on RAW264.7 cell. Also, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor κ B (NF- κ B) were examined by western blot analysis.

Results: In an *in vitro* cytotoxicity analysis, LPE affected tumor cell growth above specific concentration. As compared with the control group, the production of TNF- α , IL-12, and IL-10 were increased in macrophage. As compared with the control group, the production of TNF- α and IL-6 were increased in RAW 264.7 cell. The expression of TNF- α and NO induced by LPS after treating LPE was decreased. In addition, treatment of RAW 264.7 cell with LPE increased the phosphorylation levels of p-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), p-Jun N-terminal kinase (p-JNK), and p-p38.

Conclusions: LPE might have impact on the anti-cancer effect by activation of innate immune system and inflammation control.

Key Words: *Liriopsis Tuber Water Extract*, Cancer, Innate Immune System, Anti-Inflammation

I. 서 론

여성 질환에서 염증반응은 세균, 바이러스 등의 다양한 균주에 의한 감염뿐만 아니라 암과 같은 중양 질환에서 세포 증식이 일어날 때 나타난다¹⁾. 암 치료법은 기존의 수술요법, 방사선요법 및 항암화학요법 등이 단독 또는 복합으로 시도되고 있으나 아직 궁극적인 해결책에 이르지 못하고 있다²⁾. 이러한 기존 치료법의 한계를 극복할 수 있는 천연물에 대한 관심이 매우 높은 편인데³⁾, 인체의 방어 기능을 증가시키는 효과가 있어 신체 내 면역력을 조절하고 방어기전에 효과적인 한약재에 대한 연구가 최근 들어 활발히 진행되고 있다^{4,5)}.

맥문동은 백합과에 속하는 다년생초인 겨우살이풀의 뿌리로, 《東醫寶鑑》의 온경탕, 자감초탕, 청심연자음, 맥미지황환, 생맥산 등의 방제에 主劑로서 虛勞客熱, 口乾燥渴, 肺痿吐膿, 熱毒身黑目黃 등의 병증에 활용되어⁶⁾ 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津 등의 효능이 알려져 있다⁷⁾.

맥문동의 약리작용으로는 혈당강하작용⁸⁾, 항산화작용, 항균작용⁹⁾, 항염증작용¹⁰⁾, 간 보호 효과¹¹⁾, 신경 보호 효과¹²⁾ 및 항암효과가 보고되었으며, 주요 성분으로는 steroid계 saponin, isoflavonoid, oligosaccharides 및 polysaccharide 등이 함유되어 있는데¹³⁾ 특히 saponin 단량체인 Dwarf lilyturf tuber-13(DT-13)의 혈관 신생 억제를 통한 항암효과¹⁴⁻⁸⁾가 보고되었으며, 여성호르몬의 천연 대체물질로 알려져 있는 isoflavone은 에스트로겐 부족에 효과가 있어 유방암과 난소암의 예방 및 생체 내 항암 효과¹⁹⁻²¹⁾가 보

고되었다. 맥문동의 항염효과와 암세포 사멸효과에 대한 실험적 연구는 있으나 면역 활성을 통한 항암 효과에 대한 연구 보고는 없었다.

이에 저자는 맥문동 물추출물의 선천면역 활성화와 염증 억제 효과를 연구해 보고자 macrophage와 RAW 264.7 cell을 이용하여 cytokine의 분비를 확인하고, lipopolysaccharide(LPS) 자극에 의한 염증 매개물질의 생산조절, nuclear factor κ B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달경로를 통한 면역활성을 관찰하여 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

맥문동(*Liriopsis Tuber*)은 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생 초본인 소엽맥문동(*Ophiopogon japonicus* Ker-Gawl.)의 괴근이다⁷⁾. 경희한약(Wonju, Kangwon)에서 구입하여 중량의 10배되는 증류수를 첨가한 후 100°C에서 4시간 동안 가열하였다. 추출물은 원심분리(3000 rpm, 30 min)를 통하여 상등액을 회수한 후 0.2 μ m의 pore size를 가지는 membrane filter (Whatman, Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 맥문동의 물 추출물(*liriopsis tuber water extract*, 이하 LPE)를 얻었다. Stock solution의 농도는 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 건조 중량에 대하여 100 mg/ml의 농도로 준비하였고 4°C에 보관하면서 실험에 적용하였다.

2) 동 물

생후 6-8주령의 자성 BALB/c(20 g±1 g)를 새론바이오텍에서 분양 받아 사육하였다. 사육조에 마우스를 5-10 마리씩 넣어 정수된 물과 실험동물용 펠릿사료(Samyang Co Ltd, Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 온도 22°C, 습도 50%, 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

3) 시 약

종양세포의 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 WEL GEN(Daegu, Korea)에서, fetal bovine serum(FBS), penicilline과 streptomycin은 Gibco사(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고 LPS, thioglycollate은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, Griess assay kit는 Promega(WI 53711, USA)에서, PBS는 Gibco사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Cell counting kit(Ez-Cytox)는 DoGen(Seoul, Korea)에서, ELISA kit는 R&D system(Inc. MIN 55413, USA)에서 구입하여 사용하였다.

신호전달을 위한 NF-κB, p65와 β-actin의 분석을 위한 1차항체는 Santa Cruz Biotechnologies(Santa Cruz, CA, USA)에서, 인산화된 p65, N-terminal kinase(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38 protein kinase(p38) 및 beta-actin의 발현을 측정하기 위한 항체는 Cell signaling Technology(Boston, Massachusetts, USA)에서 구입하였다.

4) 세포주 및 세포 배양

RAW 264.7 cell, 4T1 mammary carcinoma cell은 한국세포주은행(서울, 한국)에서 분양받았으며, thioglycollate-induced macrophage(이하 macrophage)는 6주령 BALB/c 마

우스 복강으로 3% thioglycollate 1 ml를 주사하고 마우스를 희생시킨 후 복강에 DMEM 배지를 주입하여 얻은 복강 내 세포(peritoneal exudative cells: PEC)를 24 well culture plate에 배양 후 배양액을 세척하여 얻었다.

각각의 RAW 264.7 cell, 4T1 carcinoma cell 및 macrophage의 배양은 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 각각 이용하였고, 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)에서 배양하였다.

2. 방 법

1) 세포 독성 측정

4T1 carcinoma cell을 1×10⁴/well의 밀도로 96 well plate의 각 well에 plating한 후, 3.2 μg/ml, 16 μg/ml, 80 μg/ml, 400 μg/ml 및 2000 μg/ml 농도의 LPE 추출물을 첨가하여 3일간 배양하였다. PEC를 24 well culture plate에 2.5×10⁶/well의 농도로 조정하여 분주하고 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착하고 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거한 후, 16 μg/ml, 80 μg/ml, 400 μg/ml, 2000 μg/ml 및 10000 μg/ml 농도의 LPE를 첨가하여 1일간 배양하였다. RAW 264.7 cell을 4×10⁴/well의 밀도로 96 well plate의 각 well에 plating한 후, 1일간 배양한 후 16 μg/ml, 80 μg/ml, 400 μg/ml, 2000 μg/ml 및 10000 μg/ml 농도의 LPE를 첨가하여 1일간 배양하였다.

각 물질의 세포 독성 효과는 WST를 이용하는 Ez-Cytox를 이용하여 제조사의 지침에 따라 30분 후에 흡광도를 450 nm에서 측정하였으며, 시료를 첨가하지 않은 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하

였다.

2) Macrophage의 cytokine 분비 측정

PEC를 24 well culture plate에 2.5×10^6 /well의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착하고 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 회수하였다. 유도 분비된 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), interleukin-10(IL-10), interleukin-12(IL-12)의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

3) RAW 264.7 cell의 cytokine 분비 측정

RAW 264.7 cell을 24 well culture plate에 2.0×10^6 /well의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양 후, macrophage를 plate에 부착하고 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 회수하였다. TNF- α , IL-6의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

4) Macrophage에 LPS 처리 후 염증 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 24 well plate의 각 well에 2.0×10^6 /well이 되도록 분주하고 24시간 배양하여 안정시킨 후, LPE의 최종 농도가 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 조정하여 2시간 배양하였다. 배양 완료 후 200 ng/ml의 LPS를 첨가하고 24시간 배양한 후 각 배양액에 생산된 염증 매개 물질인 TNF- α 및 nitricoxide(NO)의 양을 측정하였다.

NO의 함량은 Griess assay kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

5) Western blotting

RAW 264.7 cell에 100 $\mu\text{g/ml}$ 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 시료를 첨가하고 30분 반응 후 4°C의 PBS로 3회 세척 후, protease inhibitor cocktail(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA), 1 mM dithiothreitol(Wako, Tokyo, Japan), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(Sigma)를 함유하는 RIPA buffer를 이용하여 30분간 4°C에서 세포를 용해시켰다. 원심분리(12,000 rpm/20 min)를 통하여 상등액을 얻은 후, Pierce BCA Protein Assay kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질 농도를 정량하였다. 균당 동량의 단백질을 (30 $\mu\text{g/well}$)을 10% 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법(sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 통하여 단백질을 분리한 후에 nitrocellulose membrane(Bio-Rad, USA)에 전사시켰다. 단백질이 전사된 nitrocellulose membrane은 5% skim milk in tris-buffered saline(TBS) containing 0.1% Tween 20(TBST)를 이용하여 상온에서 1시간 동안 blocking시켰다. 1차항체가 반응된 membrane은 TBST를 이용하여 세척단계를 거친 후, HRP가 표지된 2차항체(HRP-conjugated anti-mouse IgG)를 상온에서 1시간 반응시켰다. 세척단계를 거친 후 membrane 상에서 항체들과 반응한 단백질을 ECL 기질(GE Healthcare Life Sciences)을 적용시킨 후, X-ray film에 감광시켜 특정 단백질 발현을 분석하였다.

6) 통계 분석

실험 결과의 통계 처리는 SPSS(version 24.0)를 이용하였고, 대조군과 실험군의

비교는 일원분산분석(One-way ANOVA) 또는 독립표본 T 검정(student's t-test)을 시행하였다. 분산의 동질성 검정은 Levene의 등분산 검정을 시행하여 등분산이 가정될 때 사후 검정은 Tukey's HSD test를 이용하였으며, 가정되지 않을 때 사후검정은 Dunnett T3 test를 시행하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포독성 평가

1) 암세포에 대한 세포독성 평가

4T1 mammary carcinoma cell에 3.2 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 세포독성을 측정 한 결과, 각각 $100.4 \pm 2.0\%$, $101.2 \pm 5.7\%$, $100.6 \pm 2.4\%$, $94.3 \pm 4.9\%$ 및 $79.0 \pm 11.8\%$ 로 나타났다(Fig. 1).

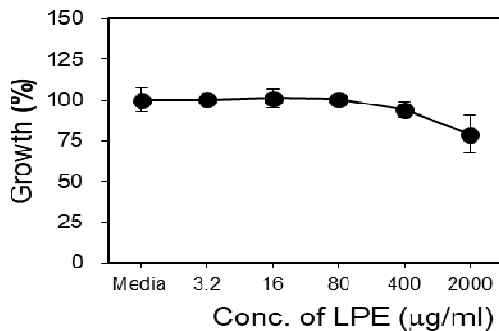


Fig. 1. Cytotoxicity of LPE on 4T1 mouse mammary.

2) RAW 264.7 cell에 대한 세포독성 평가

Raw 264.7 cell에 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$ 및 10000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 세포독성을 측정 한 결과, 각각 $97.33 \pm 6.94\%$, $113.45 \pm 17.56\%$, $160.12 \pm 4.98\%$, $156.54 \pm 17.32\%$ 및 $91.39 \pm 9.16\%$

로 나타났다(Fig. 2).

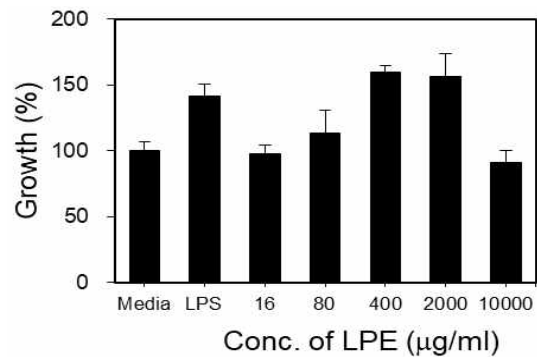


Fig. 2. Cytotoxicity of LPE on RAW 264.7 cell.

3) 대식세포에 대한 세포독성 평가

Macrophage에 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$ 및 10000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 세포독성을 측정 한 결과, 각각 $104.20 \pm 2.64\%$, $107.84 \pm 3.90\%$, $115.59 \pm 6.36\%$, $105.80 \pm 1.51\%$ 및 $91.67 \pm 1.66\%$ 로 나타났다(Fig. 3).

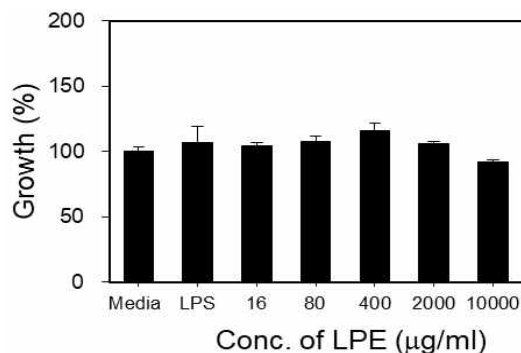


Fig. 3. Cytotoxicity of LPE on TG-induced macrophage.

2. Macrophage에서의 cytokine 생산 효과

1) TNF- α

Macrophage에 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 TNF- α 의 분비를 관찰한 결과, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $154.2 \pm 18.3 \text{ pg/ml}$, $424.9 \pm 36.1 \text{ pg/ml}$

및 484.7 ± 20.6 pg/ml로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 4).

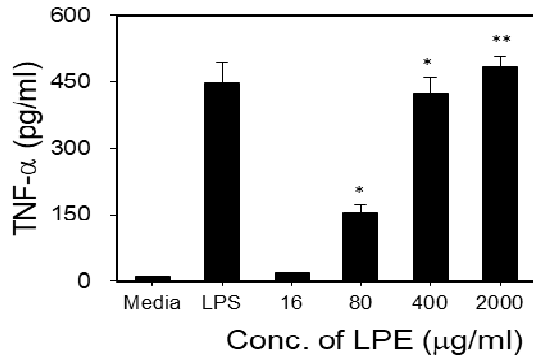


Fig. 4. Production of TNF- α from TG-induced macrophage stimulated by LPE.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, statistically significant difference compared with media group (one-way ANOVA combined with a Dunnett T3 test).

2) IL-12

Macrophage에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 LPE를 첨가하고 IL-12의 분비를 관찰한 결과, 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml에서 각각 27.0 ± 1.6 pg/ml, 134.6 ± 6.3 pg/ml, 1074.6 ± 33.3 pg/ml 및 1116.9 ± 30.0 pg/ml로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 5).

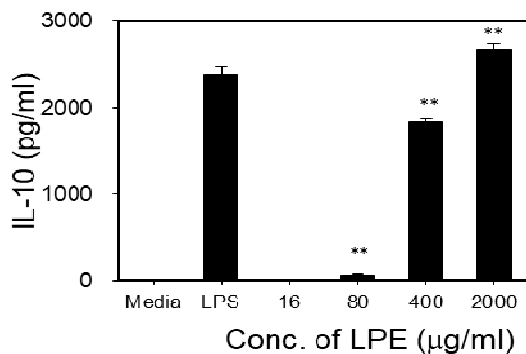


Fig. 5. Production of IL-12 from TG-induced macrophage stimulated by LPE.

** : $p < 0.01$, statistically significant difference compared with media group (one-way ANOVA combined with a Dunnett T3 test).

3) IL-10

Macrophage에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 LPE를 첨가하고 IL-10의 분비를 관찰한 결과, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml에서 각각 74.2 ± 6.4 pg/ml, 1833.9 ± 37.0 pg/ml 및 2662.9 ± 82.2 pg/ml로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 6).

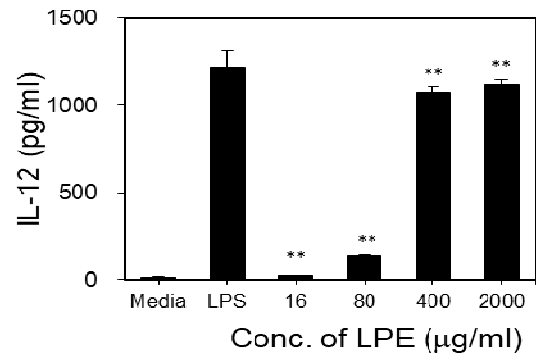


Fig. 6. Production of IL-10 from TG-induced macrophage stimulated by LPE.

** : $p < 0.01$, statistically significant difference compared with media group (one-way ANOVA combined with a Dunnett T3 test).

3. RAW 264.7 cell에서의 cytokine 생산 효과

1) TNF- α

RAW 264.7cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 LPE를 첨가하고 TNF- α 의 분비를 관찰한 결과, 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml에서 각각 57.89 ± 3.28 pg/ml, 215.49 ± 18.81 pg/ml, 451.16 ± 12.17 pg/ml, 557.05 ± 23.50 pg/ml로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 7).

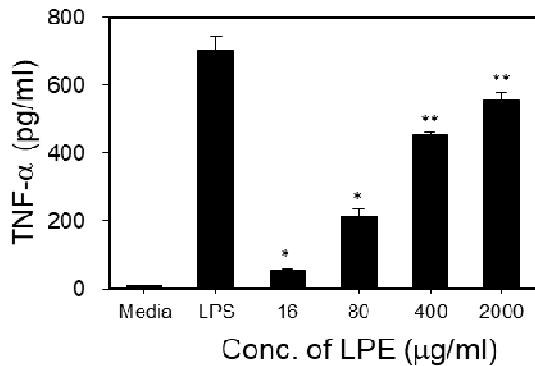


Fig. 7. Production of TNF- α from RAW 264.7cell stimulated by LPE.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, statistically significant difference compared with media group (one-way ANOVA combined with a Dunnett T3 test)

2) IL-6

RAW 264.7cell에 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 IL-6의 분비를 관찰한 결과, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 674.23 ± 25.70 pg/ml , 2503.21 ± 25.40 pg/ml 로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다 (Fig. 8).

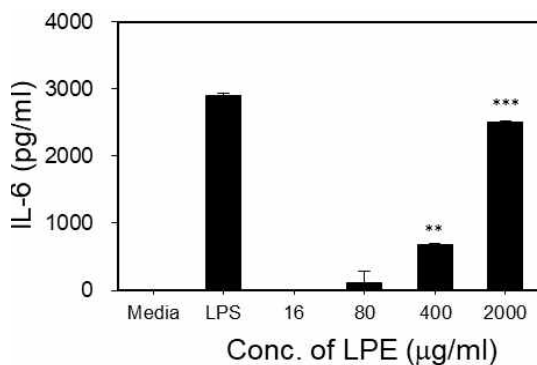


Fig. 8. Production of IL-6 from RAW 264.7cell stimulated by LPE.

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, statistically significant difference compared with media group (one-way ANOVA combined with a Dunnett T3 test)

4. Macrophage에 LPS 처리 후 염증 매개물질 생산 억제 효과

1) TNF- α

Macrophage에 LPS와 함께 LPE를 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 TNF- α 의 분비를 관찰한 결과, LPS만 처리한 경우 469.19 ± 52.35 pg/ml 에 비하여 2000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 349.36 ± 37.22 pg/ml 로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 억제되었다 (Fig. 9).

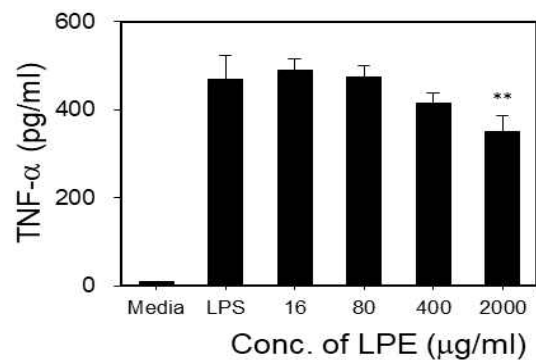


Fig. 9. Production of TNF- α from macrophage stimulated by LPE and LPS.

** : $p < 0.01$, statistically significant difference compared with LPS group (one-way ANOVA combined with a Tukey HSD test)

2) NO

Macrophage에 LPS와 함께 LPE를 16 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPE를 첨가하고 NO의 분비를 관찰한 결과, LPS만 처리한 경우 21.02 ± 0.29 μM 에 비하여 80 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 18.25 ± 0.45 μM , 17.46 ± 0.74 μM , 16.52 ± 0.33 μM 로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) 억제되었다 (Fig. 10).

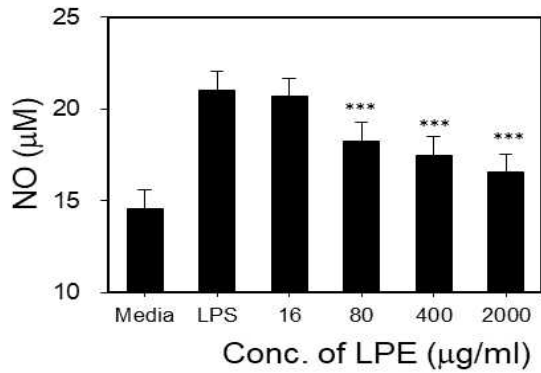


Fig. 10. Production of NO from macrophage stimulated by LPE and LPS.
***: $p < 0.001$, statistically significant difference compared with LPS group (one-way ANOVA combined with a Tukey HSD test)

5. NF- κ B(p-p65, p65) 신호전달 경로의 활성화 효과

RAW 264.7cell에 LPE를 100 μ g/ml 및 1000 μ g/ml의 농도로 처리하여 신호전달 관련 단백질의 변화를 관찰한 결과, p65의 인산화가 미약하게 확인되었다(Fig. 11).

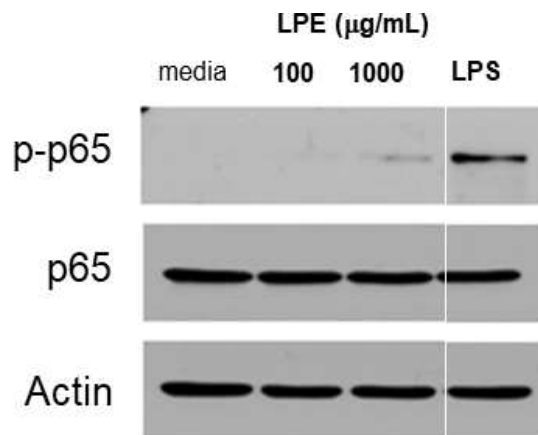


Fig. 11. Activation of NF- κ B pathway by treatment of LPE on RAW 264.7 cell.

6. MAPK(p-JNK, p-ERK, p-p38) 신호전달 경로의 활성화 효과

RAW 264.7cell에 LPE를 100 μ g/ml 및 1000 μ g/ml의 농도로 처리하여 신호전달

관련 단백질의 변화를 관찰한 결과, 인산화된 p-p38, p-ERK, p-JNK 단백질의 발현량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며, p-JNK 및 p-p38보다 p-ERK가 저농도에서도 강하게 인산화되는 것을 확인하였다(Fig. 12).

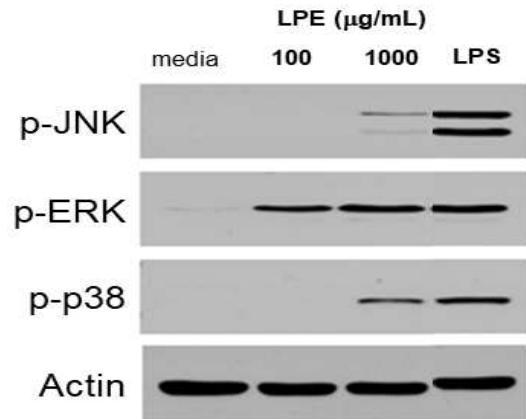


Fig. 12. Activation of MAPK pathway by treatment of LPE on RAW 264.7 cell.

IV. 고찰

암의 치료는 외과적 수술요법, 화학요법, 방사선요법 등이 있으나, 독성에 대한 부작용, 치료의 제한성, 항암제의 종양에 대한 선택적 한계, 위장장애, 탈모 등의 합병증을 가지고 있다. 이와 같은 기존 치료법의 한계를 극복하기 위해 면역요법 등의 새로운 치료법이 시도되고 있다²⁾.

암 면역 치료(cancer immunotherapy)는 암과 면역 체계의 밀접한 연관성에 대한 근거를 바탕으로 숙주의 면역 체계와 암 주변 미세환경의 조절을 통해 기존의 세포 독성 항암화학치료와 방사선 치료의 효과를 극대화하는 요법으로, 최근 이러한 면역 치료에 대한 관심이 증폭되고 있다²²⁾.

한의학적으로 암은 積聚, 癥瘕, 反胃, 癭瘤, 癰疽, 瘡瘍 등에 해당하며, 치료방법은 크게 清熱解毒, 活血化瘀, 化痰消癥 및 理氣消腫의 去邪法과 健脾益氣, 養血滋陰, 養陰生津, 補腎溫陽 및 健脾益腎하는 扶正祛邪法이 있다²³⁾. 그 중에서 《素問·刺法論》의 “正氣存內 邪不可干”²⁴⁾이라고 하고, 《活法機要》에서 “養正則積自除”, “眞氣實胃氣強 積自消”²⁵⁾라고 표현한 것은 정기를 손상시키지 않으면서 숙주의 항암능력을 강화시키는 扶正祛邪法에 해당하며, 오늘날의 면역요법과 유사하다.

맥문동은 性이 微寒하고 味는 甘微苦하여 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津의 효능을 지니고 있어 주치로는 肺燥乾咳, 陰虛勞嗽, 心煩失眠, 吐血, 咯血, 肺痿, 肺癰 등이 있다⁷⁾. 맥문동의 유효 성분 중 DT-13은 사포닌 단량체로서 다양한 종양에 대한 autophagy 유발, 유사분열 정지 효과, 암 성장 억제, 전이 억제, 세포 부착 억제, 혈관 신생 억제 등의 연구가 이루어진 바 있고¹⁴⁻⁸⁾. 복합물(누에: 맥문동=1:1)로서 맥문동은 흥선, 림프절 내 T세포 중 보조 T세포를 활성화시켜 적응면역반응에 관여하는 것이 확인되었으나²⁶⁾, 맥문동 물 추출물의 선천면역 활성화에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 LPE 자극에 의한 macrophage, RAW 264.7 cell에서의 cytokine 분비 활성화 및 LPE 자극 2시간 후 LPS를 첨가하여 염증 매개물질의 생성 조절을 확인하고, western blotting를 이용하여 NF-κB(p-p65, p65), MAPK(p-JNK, p-ERK, p-p38)의 활성화를 확인하였다.

LPE의 면역활성 효과가 자체적인 세포 독성에 의한 것인지 macrophage의

활성화를 통한 것인지 확인하기 위하여 LPE의 세포 독성 여부를 확인하였다. 그 결과 4T1 carcinoma cell은 80 µg/ml 이하의 농도에서 100%에 가까운 세포 증식을 나타내어 유의한 세포 독성이 없음을 관찰되었다. TG로 유도된 macrophage와 RAW 264.7 cell에 대해서도 cytokine을 생산하는 농도에서 LPE는 유의한 세포 독성이 없는 것을 관찰되었다.

선천면역에 있어 중요한 역할을 하는 macrophage는 일반적으로 활성화되지 않은 상태에서는 세포 내 미생물을 제거하는데 효과적이지 않으나, 활성화된 macrophage는 효과적으로 종양세포의 성장과 전이를 억제하여 숙주를 방어하는 중요한 역할을 한다²⁷⁾. TNF-α는 macrophage로부터 분비되어 T cell을 활성화하며 암세포 억제에 중요한 역할을 하는 cytokine이다. IL-12는 macrophage에서 면역반응 초기에 생산되는 cytokine으로 암세포 살해능이 있는 NK-cell을 직접적으로 활성화하여 항암활성에 있어 가장 중요한 cytokine의 하나로 인정되고 있다. IL-10은 T세포, monocyte 및 macrophage 등에서 합성되며 강력한 항염작용이 있는 cytokine이다²⁸⁾. IL-6는 선천면역과 적응면역 모두에서 기능을 하는 cytokine으로²⁹⁾, 종양 세포에서 생산되어 분비되는데 종양 악액질에서 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다³⁰⁾.

이에 macrophage와 RAW 264.7 cell에서 cytokine의 분비량을 측정함으로써 LPE가 macrophage에 영향을 미쳐 면역을 활성화하는지 확인하였다. LPE 자극을 받은 macrophage에서 분비되는 cytokine의 분비를 관찰한 결과, TNF-α, IL-12은 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml에서

통계적으로 유의하게 증가하였으며, IL-10은 400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. LPE 자극을 받은 RAW 264.7 cell로부터 분비되는 cytokine의 분비물을 확인한 결과, TNF-α는 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며, IL-6은 400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 LPE가 macrophage에서 cytokine 분비 증가를 유도하여 선천 면역활성에 효과가 있음을 확인하였다.

면역은 외부침입에 반응하여 방어하는 역할을 하지만, 염증 매개 물질의 과도한 생산은 만성질환과 암을 유발할 수 있다^{31,32}). LPS는 그람 음성균의 외막성분으로 국소 염증, 항체 생산, 패혈증과 같은 다양한 반응을 일으키며³³) 고농도의 LPS 자극은 세포의 활성을 증대시켜 TNF-α, NO와 같은 염증성 매개물질을 분비시킨다³⁴). TNF-α는 LPS 반응의 주요 매개체로서 선천면역 반응에 중요한 역할을 하고³⁵), 암세포에 세포독성이 있어 만성 염증성 반응과 연관된다. NO는 L-arginine에서 nitric oxide synthase(NOSs)를 경유하여 생성되는데, 체내 항상성 조절에 중요한 역할을 하며 혈관 이완과 신경전달 등의 과정과 면역반응 및 세포 독성에 관여하는 것으로 알려져 있다³⁶).

이를 바탕으로 염증유도 물질인 LPS 자극 후 macrophage에서 분비되는 TNF-α와 NO의 양을 측정하여 TNF-α는 LPE 농도 400 µg/ml 및 2000 µg/ml에서, NO는 LPE 농도 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml에서 통계적으로 유의하게 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 LPE는

외래 물질에 대한 방어 능력 외에도 항염증 효과를 통한 면역 조절제로서의 역할을 할 수 있음을 보여준다.

Toll-like receptor(TLR)은 대식세포막에 존재하여 병원성 미생물의 침입 시 활성화되어 면역반응을 일으키는 수용체 단백질이다³⁹). LPS와 같은 특이적 리간드를 인식하여 MAPK 및 NF-κB 등의 세포 내부의 신호전달 경로의 활성화를 통한 cytokine 발현을 촉진하여 면역을 활성화하는 것으로 알려져 있다³⁷⁻⁴⁰). MAPK는 ERK, JNK, p38 등의 단백질을 포함하는 신호전달경로로서 대식세포에서 cytokine과 NO의 생성을 유도하여 대식세포를 활성화하는데 주요한 역할을 하는 신호전달 경로이며^{41,42}), NF-κB는 LPS의 자극을 통해 활성화되어 iNOS나 TNF-α 등의 유전자발현에 중요한 조절 역할을 하는 신호전달경로이다⁴³).

이에 LPE에 의해 유도되는 세포 내 신호전달 경로를 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 LPE를 100 µg/ml 및 1000 µg/ml의 농도로 처리하여 신호전달 관련 단백질의 변화를 관찰한 결과, 인산화된 MAPK(p-p38, pERK, pJNK) 단백질의 발현량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며, pJNK 및 p-p38보다 pERK가 저농도에서도 강하게 인산화되는 것으로 보아 MAPK 중 ERK를 경유하여 대식세포를 활성화 시키는 것으로 추정되었다. NF-κB 신호전달 경로에서는 I-kappaBα(IκBα)의 인산화가 일어나고 분해되면 NF-κB subunit p65의 활성화가 유도된다고 알려져 있는데³⁵) LPE를 농도별로 RAW 264.7 cell에 처리한 결과, p65의 인산화가 약하게 확인되었다. 즉, LPE는 세포 내 대표적인 신호전달 경로인 MAPK

및 NF- κ B 중 MAPK에 존재하는 신호 전달 단백질들을 농도 의존적으로 인산화시킴으로써 선천면역계의 대표적 면역세포인 대식세포를 활성화시키기 위해 MAPK signal pathway를 활성화시키며 cytokine 생산을 유도하여 면역 활성화에 기여한다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 연구 결과를 통해 LPE는 선천면역 활성화와 염증 억제에 기여함을 알 수 있었다. 이번 연구는 macrophage 위주의 선천면역활성의 측면에 국한되었다는 한계가 있으며, BALB/c mouse를 이용한 생체 외 실험으로 추후 경구 투여로 인한 장관면역계 및 적응면역계의 반응이 추가적으로 필요할 것으로 사료된다. 이러한 점이 보완된다면 향후 LPE가 면역 활성을 통한 한의학적 암의 임상 치료에 기여할 수 있을 것이라 판단된다.

V. 결 론

맥문동 물추출물의 선천면역 활성화와 염증 억제 효과를 알아보기 위해, LPE 자극에 의한 macrophage, RAW 264.7 cell에서의 cytokine 분비 활성화 및 LPE 자극 2시간 후 LPS를 첨가하여 염증 매개물질의 생성 조절을 확인하고, western blotting를 이용하여 NF- κ B(p-p65, p65), MAPK(p-JNK, p-ERK, p-p38)의 활성화를 분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 4T1 carcinoma cell은 80 μ g/ml 이하 농도의 맥문동 물추출물에 세포 독성을 나타내지 않았다.
2. Macrophage와 RAW 264.7 cell은 cytokine

을 생산하는 농도의 맥문동 물추출물에서 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다

3. Macrophage에 LPE를 첨가하여 cytokine의 분비를 확인한 결과, TNF- α , IL-12의 분비는 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 증가하였고, IL-10의 분비는 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml에서 이 유의하게 증가하였다.
4. RAW 264.7 cell에 LPE를 첨가하여 cytokine의 분비를 확인한 결과, TNF- α 는 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml에서 유의하게 증가하였으며, IL-6는 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml에서 유의하게 증가하였다.
5. RAW 264.7 cell에 LPE를 첨가하여 2시간 배양 후 LPS 자극으로 발생한 NO 및 TNF- α 를 관찰한 결과, TNF- α 는 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml에서 유의한 억제 효과를 보였고, NO는 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 유의한 억제 효과를 보였다.
6. RAW 264.7 cell에 LPE를 100 μ g/ml 및 1000 μ g/ml의 농도로 첨가하여 p-p65의 발현을 western blot을 통해 확인한 결과 억제되었다.
7. RAW 264.7 cell에 LPE를 100 μ g/ml 및 1000 μ g/ml의 농도로 첨가한 후 p-p38, p-ERK, p-JNK 발현을 western blot을 통해 확인한 결과 농도 의존적으로 증가하였다.

Received : Jul 15, 2021

Revised : Jul 19, 2021

Accepted : Aug 27, 2021

References

1. Oriental Gynecology Textbook Compilation Committee. Korean Medicine Obstetric & Gynecology I. Seoul:Jeongdam. 2007 :282-310.
2. Kim JH, et al. Review on Clinical Study of Oriental Medical Treatment for Cancer in Korea. J Acupunct Res. 2012;29(3) :19-28.
3. Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. Expert Opin Ther Targets. 2010;14(12) :1367-402.
4. Bae SK, et al. Modulatory Effects of Cytokine Release in Immune Response of RAW 264.7 and TK-1. J Int Korean Med. 2018;39(6) :1244-55.
5. Song YC, et al. A Potential Herbal Adjuvant Combined With a Peptide-Based Vaccine Acts Against HPV-Related Tumors Through Enhancing Effector and Memory T-Cell Immune Responses. Frontiers in immunology. 2020;11(62) :1-15.
6. Heo J. Dongeuibogam. Gyeongnam : Dongeuibogam Publishing Co. 2004 : 2149.
7. National College of Korean Medicine Textbook Compilation Committee. Herbology. Seoul:Youglimsa. 2008:644-5.
8. Im JG, et al. Dietary Effect of *Liriopsis Tuber Water Extracts* on the Level of Blood Glucose and Serum Cholesterol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. J East Asian Soc Dietary Life. 2005; 15(1) :20-8.
9. Lee SK, Park JH, Kim YT. A Study on the Antioxidation and Antimicrobial Effect of “Megmoondong(*Liriope platyphylla* Wang et Tang)” Water Extracts. Korean J Food & Nutr. 2009;22(2) :279-85.
10. Roh SS, et al. Studies of Anti-inflammation of *Liriopsis Tuber* to Autoimmunune Diabetes in NOD Mice. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(4) :766-70.
11. An JY. The Effect of *Liriopsis Tuber* on Liver Function Activity. Department of Pharmacy, Graduate School, Taegu-Hyosung Catholic University. 2000.
12. Kang YG, Lee TH. *Liriopsis Tuber* Improves Stress-Induced Memorial Impairments in Rats. Kor J Herbology. 2006;21(2) :63-75.
13. Baek NI, et al. Cytotoxicity of Steroid-Saponins from the Tuber of *Liriope Platyphylla* W.T. Agricultural Chemistry and Biotechnology. 1998; 41(5) :390-4.
14. Li H, et al. DT-13, a Saponin Monomer of Dwarf Lilyturf Tuber, Induces Autophagy and Potentiates Anti-Cancer Effect of Nutrient Deprivation. Eur J Pharmacol. 2016;781:164-72.
15. Li S, et al. The Saponin Monomer of Dwarf Lilyturf Tuber, DT-13, Reduces Human Breast Cancer Cell Adhesion and Migration during Hypoxia via Regulation of Tissue Factor. Biol Pharm Bull. 2010;33(7) :1192-8.
16. Renping Z, et al. The Saponin Monomer of Dwarf Lilyturf Tuber, DT-13,

- Inhibits Angiogenesis Under Hypoxia and Normoxia via Multi-Targeting Activity. *Oncol Rep.* 2013;29(4):1379-86.
17. Renping Z, et al. DT-13, a Saponin of Dwarf Lilyturf Tuber, Exhibits Anti-Cancer Activity by Down-Regulating C-C Chemokine Receptor Type 5 and Vascular Endothelial Growth Factor in MDA-MB-435 Cells. *Chin J Nat Med.* 2014;12(1):24-9.
 18. Hongzhi D, et al. DT-13 Inhibits Cancer Cell Migration by Regulating NMIIA Indirectly in the Tumor Microenvironment. *Oncol Rep.* 2016; 36(2):721-8.
 19. Adlercreutz H. Phytoestrogens: Epidemiology and a Possible Role in Cancer Protection. *Environmental Health Perspectives.* 1995;103 Suppl 7(Suppl 7):103-12.
 20. Yamamoto, et al. Soy, Isoflavones, and Breast Cancer Risk in Japan. *J of the National Cancer Institute.* 2003;95(12):906-13.
 21. Suh DS, et al. Apoptotic Effect of NV-196, an Isoflavone Derivative, in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Korean J Obstet Gynecol.* 2011;54(2):86-92.
 22. Bauman JE, Ferris RL. Integrating Novel Therapeutic Monoclonal Antibodies into the Management of Head and Neck Cancer. *Cancer.* 2014;120(5): 624-32.
 23. Cho JK. *Oriental Clinical Oncology.* 1st ed. Daejeon:Jumin Publishing Co. 2001:9-15.
 24. Kim DH, et al. *Hwangjenaegyong somunhaeseog-Ha.* 1st ed. Seoul: Uiseongdang. 2001:746.
 25. Chang WS. *Hwalbeobgiyo.* Seoul:Daeseong Publishing Co. 1986:129-30.
 26. Kim IG, et al. Mixture *Bombyx mori L.* and *Liriopsis seu Ophiopogonis Tuber* effects on T cells in Thymus, Lymph Nodes. *Kor J Herbol.* 2018;33(5): 47-52.
 27. William EP. *Fundamental Immunology.* 5th ed. USA:Lippincott Williams & Wilkins. 2003:20.
 28. Ha ES, et al. Anti-metastatic Activity of Glycoprotein Fractionated from *Acanthopanax Senticosus.* Involvement of NK-cell and Macrophage Activation. *Arch Pharm Res.* 2004;27(2):217-24.
 29. Abbas L, et al. *Cellular and Molecular Immunology.* 5th ed. Netherlands: Elsevier Health Sciences. 2003:247-63.
 30. Kurebayashi J, et al. Medroxyprogesterone Acetate Inhibits Interleukin 6 Secretion from KPL-4 Human Breast Cancer Cells Both in vitro and in vivo: a Possible Mechanism of the Anticachectic Effect. *Br J Cancer.* 1999;79(3/4): 631-6.
 31. Gee K, et al. Differential Regulation of CD44 Expression by Lipopolysaccharide (LPS) and TNF-alpha in Human Monocytic Cells: Distinct Involvement of C-Jun N-terminal Kinase in LPS-Induced CD44 Expression. *J Immunol.* 2002;169(10):5660-72.
 32. Guha M, Mackman N. LPS Induction of Gene Expression in Human Monocytes. *Cell Signal.* 2001;13(2):85-94.
 33. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-Like

- Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
34. Paik YH, et al. Toll-Like Receptor 4 Mediates Inflammatory Signaling by Bacterial Lipopolysaccharide in Human Hepatic Stellate Cells. *Hepatology.* 2003;37(5):979-82.
35. Lee AK, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Inducible Nitric Oxide Synthase, TNF- α and COX-2 Expression by Saquinone Effects on I- κ B α Phosphorylation, C/EBP and AP-1 Activation. *British journal of pharmacology.* 2003;139(1):11-20.
36. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin 1- β , Interleukin 2, and Interleukin 6 by Rat Leukocyte Subpopulations after Exposure to Substance P. *Neuropeptides.* 2003;37(6):355-61.
37. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like Receptors in the Induction of the Innate Immune Response. *Nature.* 2000;406(6797):782-7.
38. Rosadini CV, Kagan JC. Early Innate Immune Responses to Bacterial LPS. *Curr Opin Immunol.* 2017;44:14-9.
39. Fukao T, Koyasu S. PI3K and Negative Regulation of TLR Signaling. *Trends Immunol.* 2003;24(7):358-63.
40. Peroval MY, et al. A Critical Role for MAPK Signaling Pathways in the Transcriptional Regulation of Toll Like Receptors. *PLoS One.* 2013;8(2):e51243.
41. Schorey JS, Cooper AM. Macrophage Signaling upon Mycobacterial Infection: the MAP Kinases Lead the Way. *Cell Microbiol.* 2003;5(3):133-42.
42. Gaestel M, et al. Protein Kinases as Small Molecule Inhibitor Targets in Inflammation. *Curr Med Chem.* 2007;14(21):2214-34.
43. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A Human Homologue of the *Drosophila* Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7.