

RAW 264.7 세포에서 知母 80% 에탄올 추출물의 항염증 효과

이영근^{1#}, 김청택², 최학주^{3*}

1 : 대전보건대학교 화장품과학과, 2 : (주)알엔에스, 3 : 대전대학교 난치성면역질환의동서생명의학연구소센터

Anti-Inflammatory Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* 80% Ethanol Extract in RAW 264.7 cells

Young Keun LEE^{1#}, Cheong Taek KIM², Hak Joo CHOI^{3*}

1 : Department of Cosmetic Science, Daejeon Health Science College, 2 : RNS, Ltd.
3 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

ABSTRACT

Objective : According to recent studies, *Anemarrhenae Rhizoma* has anti-inflammatory activities of DW extract, but it hasn't not yet conducted to evaluate inflammatory factors about 80% ethanol extract. Therefore, The aim of this study is to investigate the various effects of individual or combined 80% ethanol extract of *Anemarrhenae Rhizoma* on cell viability and various anti-inflammatory factors.

Methods : *Anemarrhenae Rhizoma* extract was prepared with 80% ethanol. MTT assay, ELISA, and Luminex were performed in LPS-activated RAW 264,7 cell line to measure cytotoxicity, Nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE₂), Leukotriene B4 (LTB₄), and cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α), respectively.

Results : At concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ *Anemarrhenae Rhizoma* extract, cytotoxicity was observed in RAW 264,7 cells. However, at concentration less than 100 $\mu\text{g/ml}$ of *Anemarrhenae Rhizoma*, cytotoxicity was not observed in RAW 264,7 cells. All concentration of *Anemarrhenae Rhizoma* extract showed no difference of NO, and IL-1 β level in RAW 264,7 cells compared with control group. In contrast, at concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ *Anemarrhenae Rhizoma* extract significantly inhibited LPS-induced production of COX-2, PGE₂, and LTB₄ level in RAW 264,7 cells. In addition, the production of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α) in LPS-induced RAW 264,7 cells was significantly decreased at concentration of all or 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Conclusion : These findings demonstrate that *Anemarrhenae Rhizoma* has inhibitory effect on inflammatory mediators in LPS-activated RAW 264,7 cells showing possible developed as a raw material for new therapeutics to ease the symptoms related with inflammatory.

Key words : *Anemarrhenae Rhizoma*, anti-inflammatory, inflammatory factors, LPS, macrophage

I. 서 론

염증반응은 생체에 해로운 자극에 대한 방어반응으로 생체의 세포와 조직이 외부에서 자극을 받을 때 그 영향을 국소화하여 손상된 부위를 정상으로 회복하고 유지하려는 생체의 방어기전이다¹⁾. 그러나 이러한 방어기전이 인체에서 원활하게 이루

어지지 않아 염증반응이 지속될 경우, 피부질환, 천식, 암, 관상동맥질환, 류마티스관절염 등과 같은 다양한 염증성 질환을 일으키는 주된 요인이 된다²⁾. 따라서 빠르고 효과적인 염증물질에 대한 방어와 제거능은 다양한 염증성 질환의 예방 및 치료의 핵심이라 할 수 있다.

본 연구에 사용된 知母는 백합과(Liliaceae)에 속한 知母

*Corresponding author : Hak Joo Choi, Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University.

· Tel : +82-42-280-2830 · Fax : +82-42-280-2624 · E-mail : hjchoi@dju.kr

#First author : Young Keun Lee, Department of Cosmetic Science, Daejeon Health Science College.

· Tel : +82-42-670-9394 · Fax : +82-42-670-9394 · E-mail : ykleeb@hit.ac.kr

· Received : 11 April 2017 · Revised : 11 May 2017 · Accepted : 20 May 2017

(*Anemarrhenae Rhizoma*)의 뿌리줄기로, 性은 寒無毒하고, 味는 苦甘하며³⁾, 清熱瀉火, 滋陰潤燥, 止渴除煩의 효능이 있어 溫熱病, 高熱煩渴, 咳嗽氣喘, 燥咳, 便秘, 骨蒸潮熱, 虛煩不眠, 消渴淋濁 등을 치료하는 약물로 사용되어 왔다⁴⁾. 현재까지 다양한 연구를 통해 소염⁵⁾, 항암^{6,7)}, 항산화^{8,9)}, 항균^{10,11)}, 허혈성 뇌손상¹²⁾에 대한 효능이 밝혀졌으며, 항염증에 대한 연구로는 서¹³⁾의 知母 약침액이 LPS로 유발된 BV2 세포에서 COX-2와 iNOS 발현량에 대한 효능과 김¹⁴⁾의 知母 물 추출물이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포에서 NO 및 사이토카인 생성량에 대한 효능이 밝혀진 바 있으나, 80% 에탄올 추출물에 대한 연구는 아직 시행된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 서¹³⁾와 김¹⁴⁾을 통해 항염증 효능이 밝혀진 知母를 80% 에탄올로 추출하고 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포를 통해 다양한 항염증 효능 검증 및 이전 연구결과와의 비교를 실시하여 임상에서의 활용성 제고와 동시에 기초 자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum : FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), mouse cyclooxygenase-2 (COX-2) ELISA Kit (MyBioSource Co., U.S.A.), LTB₄ Parameter Assay Kit (R&D systems Co., U.S.A.), Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit (R&D systems Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.)을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), 세포배양기 (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 시료

(주)옴니허브 (Korea)에서 구입한 知母 50 g에 80% 에탄올 500 ml을 넣고 3시간 동안 환류 추출 후 여과액을 얻었으며, 얻어진 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 12.4 g (수율 24.8%)을 분말로 얻었다. 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

3. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 동결된 RAW 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켜 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

4. 세포독성 측정

96 well plate에 세포를 1.5×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 새로운 배양액으로 교체한 후 지모 추출물을 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정 한 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

5. COX-2 측정

12 well plate에 세포를 2×10⁵ cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체한 후 지모 추출물 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도에 LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리하고 다시 24시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 이후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 획득한 상청액으로 COX-2 ELISA kit으로 manufacturer's instruction에 따라 측정하였으며, 측정결과는 log-log fit을 이용하여 자동 계산된 값을 나타내었다.

6. NO 생성량 측정

96 well plate에 1.5×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체한 후 지모 추출물 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도에 LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리하고 다시 24시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 이후, N1 buffer와 N2 buffer를 각각 10분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하고 대조군에 대한 NO 값을 백분율로 표시 하였다.

7. PGE₂ 및 LTB₄ 생성량 측정

12 well plate에 세포를 2×10⁵ cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체한 후 지모 추출물 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도에 LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리하고 다시 24시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 이후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 획득한 상청액으로 PGE₂ 및 LTB₄ ELISA kit으로 manufacturer's instruction에 따라 측정하였으며, 측정결과는 4 parameter

logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값에 희석배수를 곱하여 나타내었다.

8. Cytokine 생성량 측정

12 well plate에 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체한 후 지모 추출물 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 LPS를 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 다시 24시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 이후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 획득한 상청액으로 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 mouse cytokine milliplex map immunoassay kit으로 manufacturer's instruction에 따라 측정하였으며, 측정 결과는 5 parameter logistic curve-fit을 이용하여 자동 계산된 값을 나타내었다.

9. 통계처리

실험 결과는 평균값 \pm 표준 편차 (mean \pm S.D.)로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다 ($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$).

III. 결 과

1. 세포 독성

지모 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비해 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았으나, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군에 비해 약 10% 정도 감소하는 것으로 나타나, 추후 실험 진행 시 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도를 선정하였다(Fig. 1).

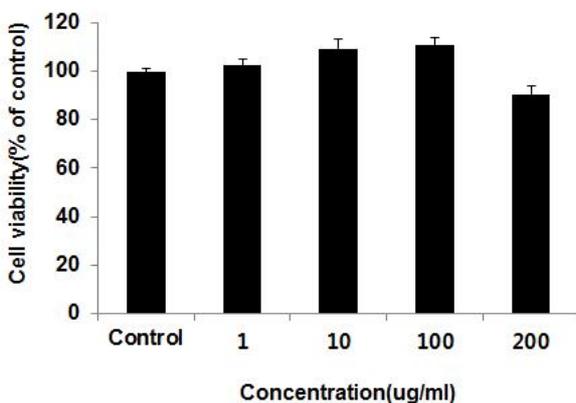


Fig. 1. Cell viability of *Anemarrhenae Rhizoma* extract in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of *Anemarrhenae Rhizoma* extract for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

2. NO 생성량

지모 추출물의 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 5%의 NO 생성을 감소시키는 것으로 확인되

었으나, 유의성이 나타나지는 않았다(Fig. 2).

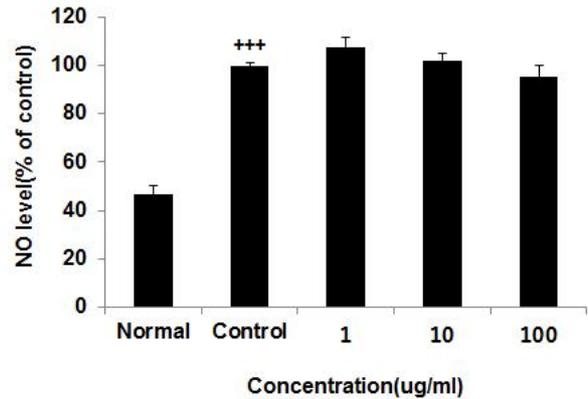


Fig. 2. Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* extract on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of *Anemarrhenae Rhizoma* extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The level of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) based on ANOVA with student's t-test determined.

3. COX-2 생성량

지모 추출물의 COX-2 생성량을 측정한 결과, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 18%의 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 감소가 나타나, COX-2에 대한 효능이 확인되었다(Fig. 3).

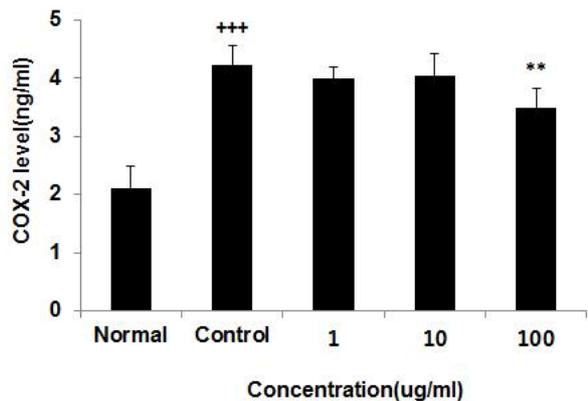


Fig. 3. Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* extract on LPS-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of *Anemarrhenae Rhizoma* extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24hr. The level of COX-2 in supernatant was measured using ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) or control and sample groups (** : $p < 0.01$) based on ANOVA with student's t-test determined.

4. PGE₂ 생성량

지모 추출물의 PGE₂ 생성량을 측정한 결과, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 18%의 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 감소가 나타나, PGE₂에 대한 효능이 확인되었다(Fig. 4).

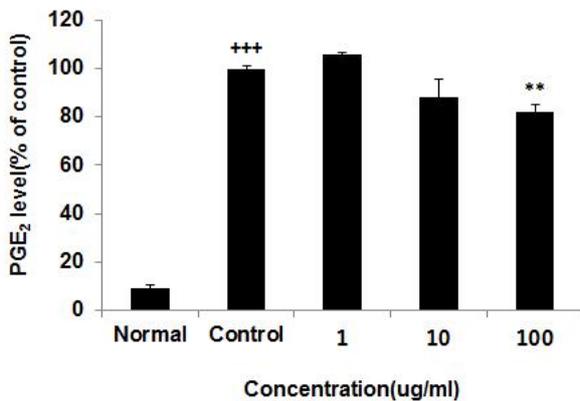


Fig. 4. Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* extract on LPS-induced Prostaglandin E2 (PGE₂) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 (ug/ml) of *Anemarrhenae Rhizoma* extract and LPS (1 ug/ml) for 24hr. The level of PGE₂ in supernatant was measured using ELISA. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) or control and sample groups (** : $p < 0.01$) based on ANOVA with student's *t*-test determined.

5. LTB₄ 생성량

지모 추출물의 LTB₄ 생성량을 측정한 결과, 대조군에 비해 100 ug/ml 농도에서 약 19%의 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 감소가 나타나, LTB₄에 대한 효능이 확인되었다(Fig. 5).

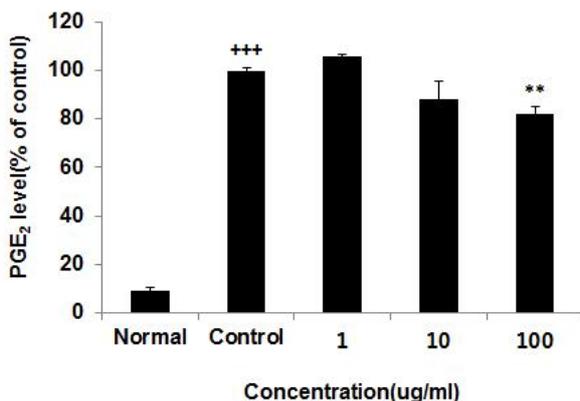


Fig. 5. Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* extract on LPS-induced Leukotriene B4 (LTB₄) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 (ug/ml) of *Anemarrhenae Rhizoma* extract and LPS (1 ug/ml) for 24hr. The level of LTB₄ in supernatant was measured using ELISA. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) or control and sample groups (** : $p < 0.01$) based on ANOVA with student's *t*-test determined.

6. Cytokine 생성량에 미치는 영향

지모 추출물의 IL-1β, IL-6, TNF-α 등 cytokine 생성량을 측정한 결과, 대조군에 비해 IL-1β 생성을 100 ug/ml 농도에서 약 9%의 감소가 나타났으나, 유의성이 나타나지는 않았다(Fig. 6A). 그러나 지모 추출물은 IL-6 생성을 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 각각 약 24%, 70%, 98%의 유의성 있는 (** $p < 0.01$, *** $p <$

0.001) 감소가 나타났으며(Fig. 6B), TNF-α 생성 역시 10, 100 (ug/ml) 농도에서 각각 약 13%와 28%의 유의성 있는 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) 감소가 나타나(Fig. 6C), IL-6와 TNF-α에 대한 효능이 확인되었다(Fig. 6).

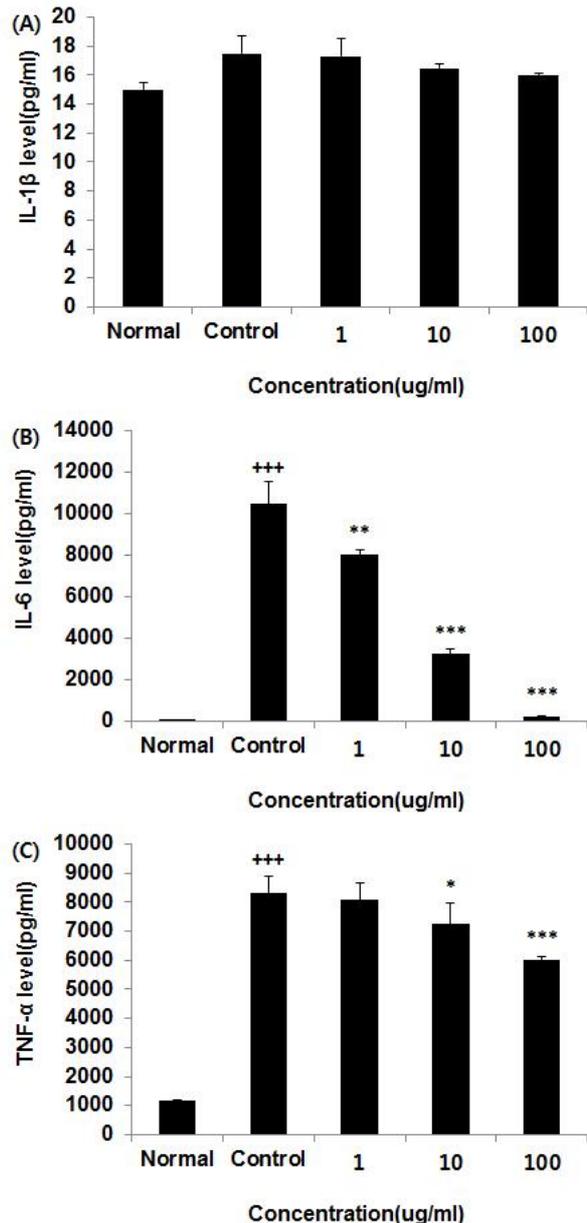


Fig. 6. Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* extract on LPS-induced cytokine(IL-1β, IL-6, and TNF-α) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 (ug/ml) of *Anemarrhenae Rhizoma* extract and LPS (1 ug/ml) for 24hr. The level of cytokine in supernatant was measured using luminex. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) or control and sample groups (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) based on ANOVA with student's *t*-test determined.

IV. 고찰

『神農本草經』¹⁵⁾ 中品에 “知母, 味苦, 寒, 主消渴, 熱中, 除邪

氣, 肢體浮腫, 下水, 補不足, 益氣.”라 收載된 이후, 『本草圖經』¹⁶⁾에서는 “生河內川谷, 今瀕河諸郡及解州, 滁州亦有之. 根黃色, 似菖蒲而柔潤, 叶至難死, 掘出隨生, 須燥乃止, 四月開青花如韭花, 八月結實, 二月, 八月採根, 暴干用.”, 『名醫別錄』¹⁷⁾에서는 “主治傷寒久疢煩熱, 脇下邪氣, 膈中惡, 及風汗內疽.” 이라 하였으며, 『藥性論』¹⁸⁾에 “主治心煩躁悶, 骨熱勞往來, 生產後褥勞, 腎氣勞, 憎寒虛煩.” 이라 하였고, 『本草綱目』¹⁹⁾에 “安胎. 止子煩. 辟射工溪毒.” 이라 문헌적으로 기재된 知母는 炮製는 雜質을 제거하고 切片하여 引經上行에는 酒浸焙乾하여 사용하고, 下行에는 鹽水潤焙하여 사용한다³⁾.

이처럼 다양한 효능과 복용법이 제시된 知母는 많은 연구 결과들을 통해 문헌적 기록에 대한 증명이 이루어졌으나, 아직까지도 데이터베이스 구축을 위해 심도 있는 연구가 활발하게 진행되고 있고 특히, 한의학적 관점에서 염증의 증상과 유사성을 지닌 癰, 疽, 瘡, 疔 등에 대한 病症 치료를 위해 항염증 효능에 대한 연구가 지속되고 있으나²⁰⁾, 아직 물 추출물과 약침액에 대한 연구 이외에는 진행된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 김¹⁴⁾의 지모 물 추출물이 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 등의 사이토카인 생성량 감소 결과를 통해 밝혀낸 항염증 효능에 착안하여 보다 유의적이고 효과적인 항염증 치료제로써의 가능성을 제시하기 위해 80% 에탄올로 용매를 달리하였다. 이후 항염증 효과를 보다 심도 있게 검토해 보고자 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 통해 세포 독성검사를 비롯하여 다양한 염증매개인자 (pro-inflammatory mediators)를 확인하였다.

대식세포는 외부에서 이물질이나 바이러스, 병원 미생물 등이 침입할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하는 세포로 탐식능이 강하고 호중구보다 수명이 길며, 노폐물의 처리나 호중구가 탐식하지 못하는 미생물 등에 대한 방어 작용을 하며, 염증성 사이토카인의 생산과 항종양 작용 등을 하는 것으로 알려져 있어 본 연구에 사용하게 되었다.

우선, 항염증 효능 확인에 앞서 지모 추출물에 대한 세포 독성을 검사한 결과, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 10%의 독성이 검출되어 이후의 실험은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 진행하였다.

일반적으로 LPS에 의해 활성화된 대식세포의 염증반응에는 pro-inflammatory cytokine, NO, PGE₂, LTB₄, iNOS, COX-2, 등 다량의 염증매개물질이 매개된다^{21,22)}. 이 중 NO는 염증인자로서 여러 가지 만성 염증성 질환을 유발하는 주요 원인이 되며²³⁾, 염증이 발생하게 되면 대식세포가 활성화되어 NO를 생성하여 이에 의해 활성화된 백혈구와 대식세포에 의해 이물질을 제거한 후 조직재생을 통해 종료 되지만 과량의 NO는 뇌경색, 퇴행성 신경질환, 당뇨 등을 유발하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. 본 연구결과, 지모 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 약 5% 정도 감소시키는 효능이 있었으나, 유의성이 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 김의 지모 물 추출물의 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도보다 우수한 결과가 도출되었으나, 큰 차이가 나타나지 않았고 비슷한 실험 결과는 지모가 NO 생성량 감소 효능은 크지 않은 것으로 확인되었다.

염증의 주된 증상은 통증, 발열, 발적, 종창 및 기능 상실을 들 수 있는데¹⁴⁾, 이러한 주된 증상을 조절하며, 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로 화학주성을 증가시키는 PGE₂와 친염증성 분자로 염증매개인자로 간주되지만 표적

세포에 따라 IgE를 분비하도록 유도하고 IL-4 및 IL-5 생성을 촉진하는 Th2 유형의 반응에 필수적으로 간주되는 LTB₄ 생성은 모두 COX-2가 관여하는 것으로 알려져 있다^{21,26)}. 본 연구결과, 지모 추출물은 COX-2, PGE₂, LTB₄ 생성량을 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 유의성 있는 감소 결과가 부합됨에 따라 지모 추출물이 염증의 주된 증상뿐만 아니라 아토피피부염, 천식과 같은 Th2로 인해 발생하는 질환에 대한 가능성을 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

염증의 발생에 관여하는 대표적인 염증성 사이토카인은 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 들 수 있는데 이 중 interleukin(IL)-1 β 는 염증반응을 야기시키고 발열에 관여하며, 림프구와 호중구를 활성화시키며, IL-6는 급성기 단백질(CRP)의 생산을 촉진하며, 알레르기성 질환을 포함하여 염증성 질환을 만성적인 단계로 발달시킨다²⁷⁾. 또한, Tumor necrosis factor(TNF)- α 는 중요한 염증성 사이토카인으로서, 염증반응을 IL-1 β 와 마찬가지로 야기 시키지만, 미세혈관의 혈전, 모세혈관의 누출 등 전신반응으로 조직 손상을 초래하게 된다²⁸⁾. 이와 같은 염증성 사이토카인은 면역계 항상성의 불균형을 초래하여 다양한 세포와 조직에 기능저해를 일으키고 제 2형 당뇨, 류마티스 관절염, 과민반응, 혈관염 등과 같은 염증질환의 원인이 된다. 본 연구에서 지모 추출물은 IL-1 β 생성량을 유의성 있게 감소시키지는 않았으나, 모든 농도에서 IL-6 생성량의 감소와 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 TNF- α 의 유의성 있는 감소가 나타났다. 이와 같은 결과는 김의 지모 물 추출물에 대한 IL-1 β 및 TNF- α 생성량 결과와 일치하며, TNF- α 생성량은 물 추출물의 200 $\mu\text{g/ml}$ 보다 더 효과적인 감소가 나타났으며, IL-6 생성량 감소에 효능이 있음이 본 연구를 통해 확인되었다. 이와 같은 결과는 지모 추출물이 염증성 사이토카인의 효과적인 감소를 통해 다양한 염증성 질환에 대한 예방과 치료에 활용될 수 있으며, 특히 관절염 질환에 대한 임상 조건 시 높게 생성되는 IL-6의 우수한 감소능과 앞서 확인된 COX-2 억제의 유의적인 결과는 관절염 치료제로써의 가능성을 제시하고 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 지모 에탄올 추출물은 안전성 평가를 통해 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 안전한 것으로 확인되었으며, 염증 유발 인자인 COX-2, PGE₂, LTB₄와 cytokine IL-6 및 TNF- α 생성을 유의성 있게 감소시키는 것이 객관적으로 증명되었다. 비록 추출 공정과 용매에 차이가 있으나 지모 80% 에탄올 추출물은 물 추출물과의 비교 시 낮은 농도에서 더 우수한 효능이 있음이 나타났다. 따라서 본 연구 결과를 기초적 자료를 근거로 앞서 제시한 아토피피부염, 천식, 관절염 등의 염증성 질환에 대한 전임상 단계 연구가 진행된다면 새로운 표적 치료제 후보물질에 알맞은 추출 용매 선정 및 원료로 활용될 수 있다고 판단된다. 다만, 지모의 물 추출물과 80% 에탄올 추출물 모두 NO, IL-1 β 등의 염증 매개 인자에 대한 생성을 유의적으로 감소시키지 못한 점은 추후 심도 있는 연구를 통해 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 知母 80% 에탄올 추출물의 안전성과 항염증 효능을 객관적으로 검증하기 위하여, RAW 264.7 세포를 통해

세포독성 검사, NO, COX-2, PGE2, LTB4 및 사이토카인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 생성량에 대해 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 지모 추출물은 세포 독성 검사를 통해 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 100% 이상의 생존율을 나타내어 안전한 것으로 확인되었으나, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 90%의 세포 생존율이 나타났다.
2. 지모 추출물은 NO 생성량을 측정한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타나지 않았다.
3. 지모 추출물은 COX-2, PGE2 및 LTB4 생성량을 측정한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다.
4. 지모 추출물은 cytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량을 측정한 결과, IL-1 β 는 유의성 있는 감소가 나타나지 않았으나, IL-6는 모든 농도에서, TNF- α 는 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다.

이상의 결과들로 보아 지모 80% 에탄올 추출물은 다양한 염증성 매개 인자들에 대한 감소 효능이 실험적으로 규명되었다. 보다 구체적인 기전과 최적의 농도 선정은 향후 보다 심도 있는 연구를 통하여 보완되어야 할 것으로 보이나 이와 같은 결과는 지모 추출물이 다양한 염증성 질환의 치료제 및 기능성 소재로서 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 대전보건대학교 교내연구비 지원에 의한 논문임(This paper was supported by Health Institute of Technology in 2016)

References

1. Kim YH. Pathology. Seoul: Hyunmoon, 2010 : 51.
2. Cheon MS, Yoon TS, Choi GY, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Choo BK, Kim HK. Comparative Study of Extracts from Rhubarb on Inflammatory Activity in RAW 264,7 Cells. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2009 ; 17(2) : 109-114.
3. National College of Oriental Medicine co-edited a book. Herbal medicine. Seoul: Youngrimsa. 1995 : 161-3.
4. Guojiazhongyixueguanliju. 《Zhonghuabencao》 bianweihui. Zhonghuabencao. 8th ed. Shanghai: Shanghaikexuejishu Publisher. 1999 : 56-62.
5. Jeong KK, Kang H, Myung EG, Shim BS, Kim SH, Choi SH, Ahn KS. Anti-inflammatory Effect of Anemarrhenae Rhizoma on Collagen Induced Arthritis - a Model for Rheumatoid Arthritis in DBA/1J Mice and Cytokine Production in Raw 264,7 Cells. Korean J Oriental Physiol Pathol. 2008 ; 22(6) : 1416-22.
6. Kim TH, Kim PH, Jeon BK, Yoon JR, Woo WH, Mun YJ, Lee JC, Lee BK, Lim KS. Effect of Anemarrhenae Rhizoma Ethanol Extract on Apoptosis Induction of HT-29 Human Colon Cancer Cells. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2011 ; 24(1) : 16-24.
7. Yim CH, Cho JS, Kim HS, Kwon SM, Kim S, Kim IH, Park HS. The Growth Inhibition Effect of L-1210 and S-180 Cancer Cell Lines by the Extract from Anemarrhena Asphodeloides. Journal of Sasang Constitutional Medicine. 2007 ; 19(2) : 170-8.
8. Kwon OJ, Lee HY, Kim TH, Kim SG. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities of Anemarrhena asphodeloides. Korean Journal of Food Preservation. 2014 ; 21(3) : 421-6.
9. Beak GH, Cho SJ, Cho HJ, Hong GH, Kim HW, Cho SI. Effects of Anemarrhenae Rhizoma on anti-oxidative activities. The Korea Journal of Herbology. 2007 ; 22(3) : 101-7.
10. Kim JY, Yi YS, Lim YH. Biological and antifungal activity of herbal plant extracts against Candida species. Microbiology and Biotechnology Letters. 2009 ; 37(1) : 42-8.
11. Doh ES. Antifungal activity of Anemarrhena asphodeloides, Coptis japonica and Phellodendron amurense extracts against Phytophthora blight. Korean J. Plant. Res. 1997 ; 10 : 351-9.
12. Oh JK, Hyun SY, Oh HR, Jung JW, Park C, Lee SY, Park JH, Kim SY, Kim KH, Kim YK, Ryu JH. Effects of Anemarrhena asphodeloides on focal ischemic brain injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2007 ; 30(1) : 38-43.
13. Seo BW. Effects of Anemarrhenae Rhizoma on lipopolysaccharide-stimulated expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. Chungbuk: Semyung University; 2005.
14. Kim BK. Anti-inflammatory effect of anemarrhena rhizome water extract on mouse macrophages. Gyeonggi-do : Gachon University; 2013.
15. Yang PJ. Shennongbencaojingjiaozhu. Beijing: Xueyuan Publisher. 1998 : 134-5.
16. Su SZ. Shangzhijunjixiao. Bencaotujing. Hefei: Anhukexuejishu Publisher. 1994 : 163-4.
17. Taohongjingji. Shangzhijunjixiao. Mingyibieli.

- Beijing: Renmin Publisher, 1986 : 122.
18. Zhen QZ, Shangzhijunji, Yaoxinglun, Hefei: Anhuikejijishu Publisher, 2006 : 38.
 19. Lishizhenzhuang, Bencaogangmu, Hong Kong: Shiyongshuju, 1957 : 420-2.
 20. Ji JG, Anti-Oxidative and Anti-inflammatory Effect of Combined Extract and Individual Extract of GamiSaengmaeksan, *The Korea Journal of Herbology*, 2016 ; 31(1) : 69-75.
 21. Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payá M, Alcaraz MJ, Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2000 ; 361(1) : 98-106.
 22. Lee H, Jung JY, Hwangbo M, Ku SK, Kim YW, Jee SY, Anti-inflammatory effects of *Lespedeza cuneata* in vivo and in vitro, *The Korea Journal of Herbology*, 2013 ; 28(4) : 83-92.
 23. Kim KA, Lee HS, Yoon HJ, Park SD, Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of *Cynomorium Songaricum*, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 2009 ; 23(6) : 1320-31.
 24. Mantovani A, Cancer: inflaming metastasis, *Nature*, 2008 ; 457(7225) : 36-37.
 25. WEISZ A, CICATIELLO L, ESUMI H, Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine, *Biochemical Journal*, 1996 ; 316(1) : 209-15.
 26. Canali R, Comitato R, Schonlau F, Virgili F. The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol® in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes, *International immunopharmacology*, 2009 ; 9(10) : 1145-9.
 27. Gabay C, Interleukin-6 and chronic inflammation, *Arthritis Research & Therapy*, 2006 ; 8(2) : 1-3.
 28. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM, Neurobiology of nitric oxide, *Critical Reviews TM in Neurobiology*, 1996 ; 10(4) : 291-316.