

넙취 정유의 Murine Macrophage Raw 264.7 세포에서 *In vitro* 항염효과

김룡규 · 신경민 · 천성국 · 지사영 · 서성훈 · 박희준* · 최종원** · 이경태#

경희대학교 약학대학, *상지대학교 응용식물과학부, **경성대학교 약학대학

(Received September 5, 2002; Revised October 7, 2002)

In vitro Antiinflammatory Activity of the Essential Oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells

Ryung-Gyu Kim, Kyung-Min Shin, Sung-Kuk Chun, Sa-Young Ji, Seong-Hoon Seo,
Hee-Juhn Park*, Jongwon Choi** and Kyung-Tae Lee#

College of Pharmacy, Kyung Hee University

*Division of Applied Science, Sangji University

**College of Pharmacy, Kyungsoong University

Abstract — In the present study, effects of essential oils isolated from various plants have been evaluated on lipopolysaccharide (LPS)-induced release of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂(PGE₂) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by the macrophage RAW 264.7 cells. Among the tested essential oils, essential oil of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* (LF-oil) significantly inhibited the LPS-induced generation of NO, PGE₂ and TNF- α in Raw 264.7 cells. Consistent with these observations, the expression of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 enzyme was inhibited by LF-oil in a concentration-dependent manner. Thus, this study suggests that inhibition of release of iNOS, COX-2 expression, and TNF- α by the essential oil of *Ligularia fischeri* may be one of the mechanisms responsible for the anti-inflammatory effects of this medicinal plant.

Keywords □ *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*, nitric oxide, RAW 264.7, COX-2, prostaglandin E₂, iNOS, TNF- α

체내 염증과정에서는 과량의 nitric oxide(NO) 및 prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증인자가 NO synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX)-2에 의해 형성된다. 이중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관 확장등의 다양한 생리기능을 가지고 있다.²⁾ 포유동물에서는 분리한 nitric oxide synthase(NOS)는 물리 화학적 성상에 따라 Type I, II, 및 III등 3 종류의 동종 효소로 나누어 진다. Type I(neuronal NOS, nNOS)과 Type III(endothelial NOS, eNOS)는 세포속에 계속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS(constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II인 inducible NOS(iNOS)로 나누어 진다.²⁾ 이러한 NOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO가 형성된다.³⁾ 이들 NOS중 iNOS에 의한 NO생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한

작용을 한다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상등을 유발한다.^{4,6)}

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적 생체기능에 작용하지만 COX-2는 염증매개물질인 PGE₂를 형성시킨다.⁷⁾

TNF- α 는 활성화된 macrophage, fibroblast 및 다른 여러 세포에서 생성되는데 이는 종양세포에 영향을 미치는 숙주 방어인자 및 염증 매개물질로 알려져 있다.^{7,8)}

넙취는 다년생 초본으로 깊은 산의 습지에서 자라는 방향성 식물로서 우리나라에서는 산나물의 일환으로 강원도 산지의 서늘한 곳에서 재배하지만 중국에서는 약용으로 재하는데, 한방에서는 기침, 천식 및 감기의 치료제로 이용되고 또한 민간에서는 황달, 성홍열, 류머티스성 관절염, 간기능 부전등의 치료에 사용되고 있다.⁹⁾ 일반적으로 *Ligularia* 속 식물은 sesquiterpenes과

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-961-0860 (팩스) 02-966-3885
(E-mail) ktleee@nms.kyunghee.ac.kr

phenylpropanoids 및 pyrrolizidine-type alkaloid 등의 생리활성물질을 함유하고 있다.^{10,11)} 이러한 자생 식물의 유효활성 성분을 분리하여 이들의 약리작용 기전을 규명함으로써 다양한 약품의 개발 가능성을 부여할 수 있다. 본 연구진은 여러 천연물 추출물 및 분리된 물질들로 이러한 염증 인자들의 생성억제를 검색 및 기전연구를 통하여 새로운 항염제의 개발을 시도하고 있다.^{12,13)} 본 논문에서는 이러한 연구 중 넘취(*Ligularia fischeri* var. *spiciformis*)의 정유성분으로부터 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 NO, PGE₂ 및 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 등을 검색하였다.

실험방법

시약

RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Life Technologies Inc.(Grand Island, NY)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tertrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), sulfanilamide, aprotinin, leupeptin, phenylmethylsulfonyl fluoride, dithiothreitol, N^G-mono-methyl-arginine(NMA), *E. coli* lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chemical Co.(MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, COX-2와 iNOS monoclonal antibodies 및 peroxidase conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology(CA, U.S.A.)에서 구입하였다. 그리고 prostaglandin E₂측정을 위한 kit는 R&D systems(MN, U.S.A.)에서 구입하였다.

넘취 정유의 추출

건조한 넘취(*Ligularia fischeri* var. *spiciformis*)의 잎을 분쇄하여 재료로 사용하였다. 이 식물재료로부터 정유를 추출하기 위하여 수증기증류 장치에서 1.5 kg을 평량하여 6시간동안 증류하였다. 증류물을 에테르로 3회 분획한 후 분획물을 무수 Na₂SO₄로 탈수한 후 건조하여 정유 3.6 g을 얻었다. 이들을 -5°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

세포의 배양

Murine macrophage Raw 264.7 세포는 10% FBS 및 penicillin (100 μ g/ml), streptomycin(100 U/ml) 포함된 RPMI 배지에서 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양했다. Raw 264.7 세포를 2 \times 10⁵/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주한 후 다음날 여러 농도(0.2-0.5-1 μ g/ml)의 시료용액 10 μ l를 넣고 30분 후 1 μ g/ml LPS를 처리하고 24시간 배양하였다.

세포독성 시험

세포배양 접시에 세포가 충분히 자란 경우 scrapper로 분리한

뒤 96 well plate에 2 \times 10⁵/well로 세포를 분주하고 하루 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 배지에 희석하여 첨가 하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약을 넣고 4시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 형성된 formazan을 DMSO 100 μ l를 첨가하여 녹였다. 30분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitrite 양의 측정

Macrophage로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100 μ l를 혼합하여 96 well plates에서 10분동안 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 시험

정유 성분을 처리한 세포 및 대조군을 PBS로 씻어낸 후 lysis buffer(50 mM HEPES pH 7.0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 5 mM NaF, 0.5 mM Na orthovanadate)로 단백질을 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취하여 세포의 파편들을 제거하였다. 상등액을 Bio-Rad 시약으로 정량하여 50 μ g의 단백질을 취했다. 추출된 단백질은 10%의 SDS-polyarylamide gel에 전기영동시킨 후 nitro cellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot 시켰다. 5% skim milk로 하루 밤 동안 blocking한 후 1:500의 비율로 iNOS와 COX-2 antibody를 3시간동안 상온에서 배양한 후 TTBS로 2회 15분 간격으로 세척하였다. 1:1000의 비율로 희석한 rabbit와 goat secondary antibody를 1시간동안 상온에서 배양 시켰다. 다시 TTBS로 3회 15분 간격으로 씻어낸 후 chemiluminescence로 현상하였다.

TNF- α 및 PGE₂ 양의 측정

세포배양액을 취해 각각 R&D kit의 지시에 따라 정량 하였다.

통계학적 분석

실험치의 값은 mean \pm S.D로 나타냈으며 분석은 Student t test로 그 유의성을 나타내었다(*P<0.05, P<0.01**, P<0.001***).

실험결과

Nitrite 형성의 억제

LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 nitrite의 양을 Griess 시약을 사용하여 넘취 정유성분의 NO 생성저해를 조사하였다. 넘취 정유성분은 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였으며(Fig. 1) 실험에 사용된 넘취 정유의 농도에서

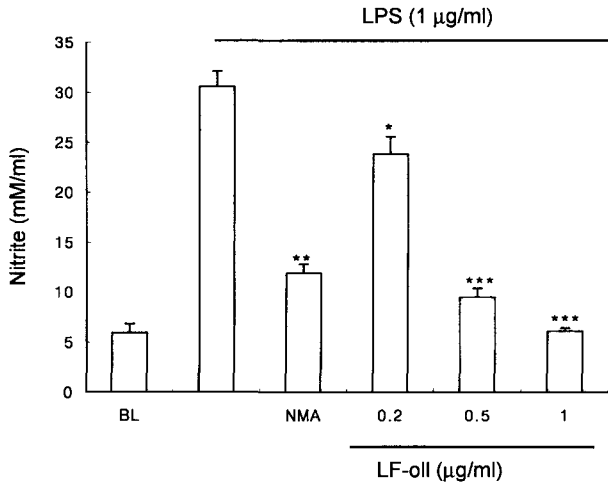


Fig. 1 – Evaluation of nitrite production by RAW 264.7 cells stimulated for 24 h with LPS alone or in combination with increasing concentrations (0.2-0.5-1 µg/ml) of the essential oil of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. The values are the means of at least 3 determinations ± S.D. *p<0.05, ***p<0.001 vs. LPS-treated group.

는 세포독성을 나타내지 않았다(세포독성결과는 나타내지 않음). 넙취 정유성분의 nitrite 형성을 억제하는 IC₅₀는 0.3 µg/ml로 확인되었으며 양성 대조군으로는 L-arginine과의 기질경쟁에 의하여 iNOS 저해제로 알려진 L-NMMA(IC₅₀; 35.94 µM)를 사용하였다. 그리고 LPS를 처리하지 않은 세포에서는 nitrite가 소량(5.93 ± 0.9 µM) 생성되었다.

PGE₂와 TNF-α의 형성 억제

LPS 처리에 의해 과 형성되는 PGE₂는 0.2, 0.5 및 1 µg/ml의 넙취 정유에서 모두 유의성 있는 농도 의존적으로 감소를 보였다(Fig. 2). TNF-α에서는 1 µg/ml 넙취 정유 농도에서만 유의성

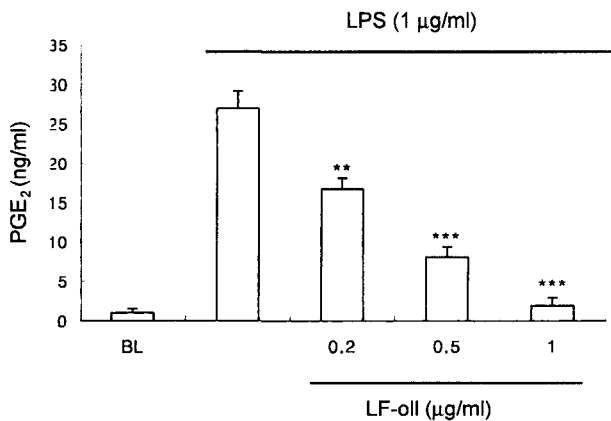


Fig. 2 – Effect of the essential oil of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* on PGE₂ production by LPS-induced RAW 264.7 macrophage for 24 h. The values are means of 3 determinations ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. LPS-treated group.

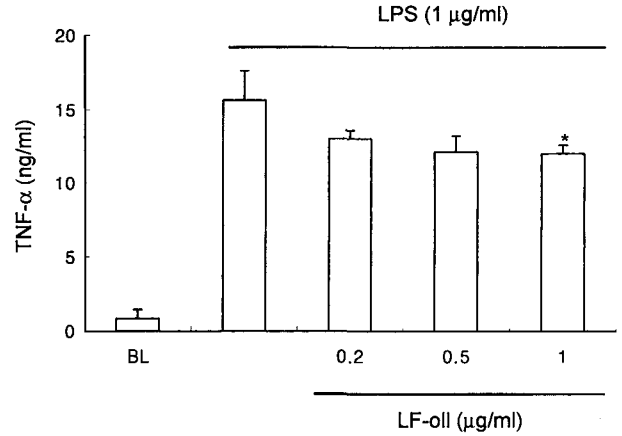


Fig. 3 – Effect of the essential oil of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* on LPS-induced TNF-α production by RAW 264.7 cells. Cells were incubated with LPS for 24 hr. The values, expressed as ng of TNF-α, are means of 3 determinations ± S.D. *p<0.05 vs. LPS-treated group.

있게 (16±2.0 ng/ml에서 12±0.3 ng/ml으로) 감소 하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

COX-2와 iNOS 단백질 발현저해

넙취 정유에 의한 염증인자 (NO 및 PGE₂)의 억제와 iNOS와 COX-2단백질 발현과 상관성을 알아보기 위하여 western blot으로 단백질의 발현을 조사하였다. LPS에 의해 iNOS 단백질은 뚜렷하게 증가하였으며(Densitometer 측정에서 control 대비 70

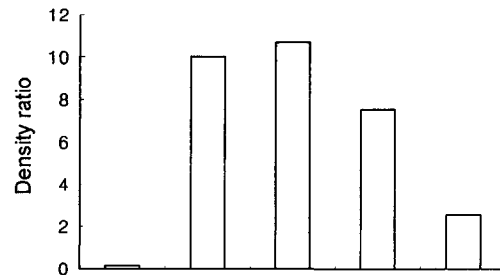
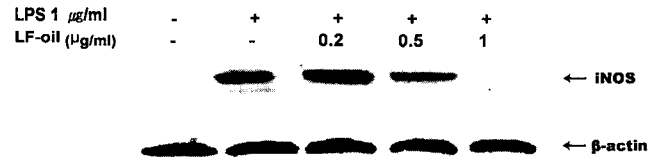


Fig. 4 – Modulation by the essential oil of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* of LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from control or 24 h-LPS (1 µg/ml) stimulated cells alone or in combination with increasing concentrations (0.2-0.5-1 µg/ml) of the essential oil of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. All lanes contained 50 µg of total proteins. A representative immunoblot from three separate experiments is shown.

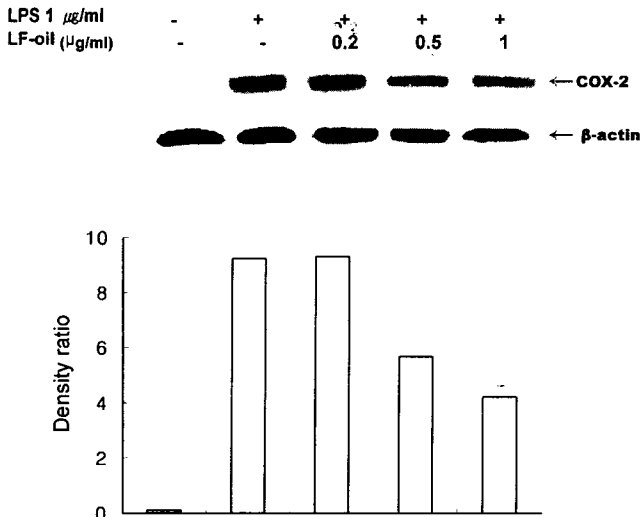


Fig. 5 - Modulation by the essential oil of *Ligularia fischeri* var. spiciformis of LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from control or 24 h-LPS (1 µg/ml) stimulated cells alone or in combination with increasing concentrations (0.2-0.5-1 µg/ml) of the essential oil of *Ligularia fischeri* var. spiciformis. All lanes contained 50 µg of total proteins. A representative immunoblot from three separate experiments is shown.

배), 넘취 정유는 iNOS를 농도 의존적으로 발현을 저해하였으며, 1 µg/ml 농도에서는 80% 이상의 감소를 나타내었다(Fig. 4). iNOS와 유사한 경향으로 넘취 정유성분은 LPS에 의해 유도되는 COX-2 단백질을 감소시킴을 확인할 수 있었다(Densitometer로 1 µg/ml에서 LPS대비 53%감소)(Fig. 5). 이상의 결과를 바탕으로 넘취 정유에 의한 nitrite와 PGE₂의 감소는 단백질 발현의 조절에 의한 것임을 알 수 있었다.

고 찰

대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 한다. LPS에 의한 대식세포의 활성화는 다양한 염증매개물질 (IL-1, IL-6, TNF-α)등을 유도하며, 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다.^{14,15)} 이러한 과정을 설명하기 위해서 Raw 264.7 세포를 LPS에 24시간 노출시키게 되면 뚜렷하게 NO가 축적되는데 넘취 정유성분은 이러한 NO의 생성억제를 세포독성이 없는 농도에서 농도 의존적으로 억제하였다. Western blot으로 분석한 결과 LPS에 의한 iNOS의 발현 및 NO 형성이 넘취 정유에 의해 억제됨이 매우 유사한 경향으로 나타냄으로서 NO의 억제는 iNOS의 발현저해를 경유한 것임을 알 수 있었다.

다수의 항염증제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성화저해에 의한 것이다.¹⁶⁾

COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘어 지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin의 합성에 작용한다.¹⁷⁾ 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다.^{16,17)} 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다. 넘취의 정유성분은 LPS에 의해 형성되는 iNOS의 발현 억제 뿐만 아니라 COX-2 발현 억제 및 이에 따른 PGE₂의 형성도 감소시킨다. 이러한 iNOS 및 COX-2의 발현에는 NF-κB가 promoter로 작용하여 발현을 조절함으로써 앞으로 이러한 유전자의 발현 조절물질 등의 활성화도 연구 되어야 한다.

염증전구물질인 TNF-α, IL-1 그리고 IL-6는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 모두 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있다. 이러한 cytokine들은 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 염증반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다.^{18,19)} 넘취 정유에 의한 TNF-α의 생성 저해는 염증전구물질의 형성억제를 나타내는 것이다.

본 실험 결과를 요약하면 nitrite, PGE₂, TNF-α 형성억제 및 iNOS, COX-2의 발현억제는 넘취 정유성분이 염증성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약품의 개발가능성을 제시하고 있는 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 2001 보건 의료기술개발사업(01-PJ2-PG3-21604-0008) 지원으로 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. : Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109 (1991).
- 2) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
- 3) Knowles, R. G. and Mocada, S. : Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS.* **17**, 399 (1992).
- 4) Stuehr, H. H. J., Kwon, N. S., Weise, M. and Nathan, C. : Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA.* **88**, 7771(1991).
- 5) McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. : Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749 (1993).
- 6) Weisz, A., Cicatiello, I. and Esumi, H. : Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by

- interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and N^G-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **316**, 209 (1996).
- 7) Duerksen-Hughes, P. J., Day, D., Laster, S. M. A., Zacharidaes, N. A., Aquino, L. and Gooding, L. R. : Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J. Immunol.* **149**, 2114 (1992).
 - 8) Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T. and Huez, G. : Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J. Inflamm.* **46**, 1 (1995).
 - 9) Choi, O. J. : Usage and Constituents of Medicinal Plants. Ilweolseogak, Seoul, p. 62 (1991).
 - 10) Kuhara, K., Takanashi, H., Hirono, I., Furuya, T. and Asada, Y. : Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Ligularia dentata*. *Cancer Lett.* **10**, 117 (1980).
 - 11) Wang, W. S., Gao, K., Yang, L. and Jia, Z., J. : Eremophilenolides from *Ligularia fischeri*. *Planta Med.* **66**, 189 (2000).
 - 12) Kim, Y. K., Kim, R. G., Park, S. J., HA, J. H., Choi, J. W., Park E. J. and Lee, K. T. : In vitro antiinflammatory activity of kalopanaxsaponin A isolated from *Kalopanax pictus* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull.* **25**, 472 (2002).
 - 13) Park, H. J., Lee, K. T., Jung, W. T., Choi, J. W. and Kadota, S. : Protective Effects of syringin isolated from *Kalopanax pictus* on galactosamine induced hepatotoxicity, *Natural Medicine.* **53**, 113 (1999).
 - 14) Vane, J. R. : Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New. Biol.* **23**, 232 (1971).
 - 15) Funk, C. D., Frunk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. : Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**, 2304 (1991).
 - 16) Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Ksaxon, P. : Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12013 (1994).
 - 17) Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K. : Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3228 (1994).
 - 18) Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. : Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 397 (1996).
 - 19) Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N. and Matsushima, K. J. : Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc. Biol.* **56**, 559 (1994).