

桑黃 물추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 Nitric Oxide production에 미치는 영향

김상찬* · 정연숙 · 이재령 · 김영우 · 변부형 · 권택규¹ · 서성일¹ · 변성희 · 권영규

대구한의대학교 한의학과, 1: 계명대학교 의과대학

Inhibitory Effect of *Phellinus Igniarius* water extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and Nitric Oxide Production in lipopolysaccharide - activated Raw 264.7 cells

Sang Chan Kim*, Youn Suk Jung, Jae Ryung Lee, Young Woo Kim, Boo Hyeong Byun, Teag Kyu Kwon¹, Seong Il Suh¹, Sung Hui Byun, Young Kyu Kwon

College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University Daegu, 1: College of Medicine, Keimyung University, Daegu

Phellinus igniarius has been clinically used for the treatment of hemorrhoidal fistula, dysmenorrhea and the prevention of cancer in traditional oriental medicine. Recent studies showed that *Phellinus igniarius* produced anti-cancer, anti-metastasis and immuno-modulatory effects. There is lack of studies regarding the effects of *Phellinus igniarius* on the immunological activities. The present study was conducted to evaluate the effect of *Phellinus igniarius* on the regulatory mechanism of cytokines and nitric oxide (NO) for the immunological activities in Raw 264.7 cells. After the treatment of *Phellinus igniarius* water extract, cell viability was measured by MTT assay, NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. COX-2 and iNOS were determined by Immunoblot analysis, and levels of cytokine were analyzed by sandwich immunoassays. Results provided evidence that *Phellinus igniarius* inhibited the production of nitrite and nitrate (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6), and the activation of phosphorylation of inhibitor κ B α (p-I κ B α) in Raw 264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS). These findings suggest that *Phellinus igniarius* can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

Key words : *Phellinus igniarius*, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6

서 론

각종 활엽수의 생목이나 고목 위에서 발생하는 다년생 버섯인 *Phellinus igniarius*는 우리나라를 비롯한 북반구 온대이북에 분포하고 있다. *Phellinus igniarius*는 桑木이라고도 불리는데, 性味는 微苦寒하며¹⁾, 月經不調 崩中帶下 月閉血凝 五痔 腸風下血 痔漏 疥癬 癥瘕 積聚 腹痛 등을 치료한다^{2,3)}. *Phellinus igniarius*에 대한 연구로는 이⁴⁾등이 캄보디아 *Phellinus igniarius* 버섯의 항암 및 면역조절효과를 밝혔고, Han⁵⁾등은 중앙아시아

mice model에서 *Phellinus igniarius*로부터 분리한 polysaccharide로 항종양, 항전이효과를 밝혔고, Ajith⁶⁾등은 *Phellinus igniarius*의 물추출액 및 ethyl acetate추출물이 항종양효과를 가짐을 보고하였다.

또한 Shon^{7,8)} 등은 *Phellinus igniarius*추출물이 antioxidant와 free radical scavenging의 효능이 있음과 *Phellinus igniarius*로부터 분리한 polysaccharide가 cytochrome P450를 억제함을 보고하였다. 그러나, *Phellinus igniarius*버섯 또는 *Phellinus igniarius*버섯에서 분리한 다당체의 항종양작용에 대한 기작은 아직 확실히 밝혀지지 않은 상태이지만, 이들이 주로 대식세포 (macrophage)나 보체계 (complement system) 등의 면역체계를 활성화 시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다⁹⁾. 대식세포는 자연면역 뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항암성 유지에 관여

* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학
· E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247
· 접수 : 2004/03/06 · 수정 : 2004/04/27 · 채택 : 2004/05/24

하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 reactive oxygen species(ROS) 와 IL-1 β , TNF- α 및 IL-6와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1 β , TNF- α 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다¹⁰⁻¹⁵. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 Polygonum tinctorium¹⁶, Melia azedarach¹⁷, Cyperus rotundus^{18,19}, Cudrania tricuspidata²⁰, 當歸²¹, 香附子¹⁹ 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

따라서, 본 연구는 열수추출된 상황(PIE)이 NO production, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 및 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

상황(Wolsung, Daegu, Korea) 300g을 물 9L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거어조로 1차 여과하고 3000 \times g에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. PIE의 수율은 10.5%였으며 실험에서 PIE는 EMEM에 녹여 사용하였다.

2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

3. 시약

LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (USA), Cayman (USA), Zymed (USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (USA)에서 구입하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well로 분주한 다음 PIE를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세

포에 0.1 - 3.0 mg/ml의 농도로 PIE를 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100 \times /(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO²의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 μ l Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 μ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO²의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 \times g로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti p-I-kBa antibody를 사용하여 p-I-kBa protein을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2, p-I-kBa protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

7. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells (1 \times 10⁶/ml)을 분주하고 PIE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

8. 통계적 검증

실험 결과는 mean \pm S.D로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결 과

1. PIE가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 PIE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 PIE를 0.1-3.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS농도 의존적으로 증가하였으며, PIE를 0.3mg/ml 처리한 실험군에서는 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, PIE 1.0과 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 12h, 18h 및 24h에서 유의한 NO생성억제를 나타내었다 (Fig. 1).

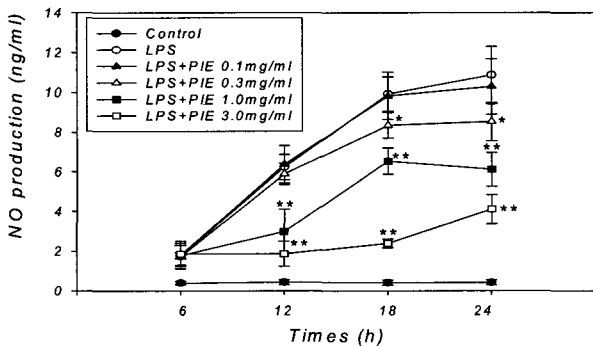


Fig. 1. Effects of PIE on the production of NO by LPS. Inhibition of NO production by PIE in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of PIE dissolved in ENEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Methods section. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. †significant as compared to LPS alone, *P < 0.05, **P < 0.01.

2. PIE가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

PIE가 1.0 및 3.0mg/ml (6h, 12h, 18h, 24h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, PIE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, PIE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 PIE의 1.0 및 3.0mg/ml농도는 6-24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2).

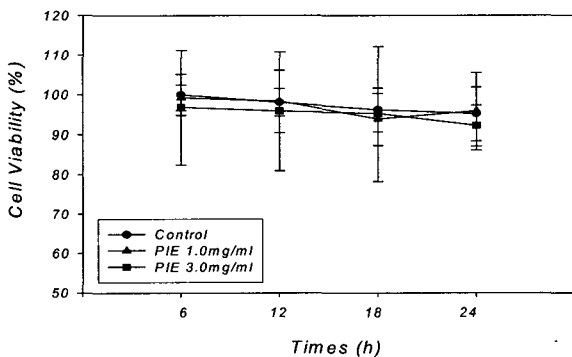


Fig. 2. The cell viability was measured after indicated time. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments.

3. PIE가 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS 발현에 미치는 영향

NO 생성 억제기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의

iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 PIE 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어 들었으며, PIE 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 PIE를 동시처리시 PIE 농도 의존적으로 iNOS단백질의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. PIE단독으로는 1.0 및 3.0mg/ml에서 iNOS단백질의 양에는 변화를 일으키지 않았다 (Fig. 3).

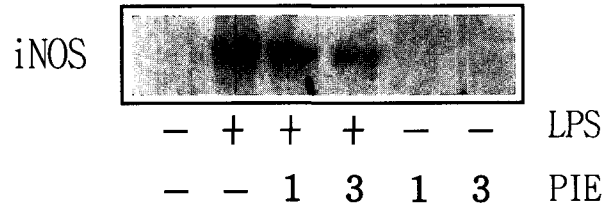


Fig. 3. Effect of PIE on the induction of iNOS by LPS. Inhibition of LPS-inducible iNOS protein expression by PIE. The level of iNOS protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without PIE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

4. PIE가 LPS로 유도된 Raw cell의 COX-2발현에 미치는 영향

Prooxidant나 proinflammatory stimuli (i.e. TPA, LPS, TNFα, ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NFκB의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다^{22,23}. 본 실험에서 LPS처리시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 PIE 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양이 줄어들었다. 그러나, PIE 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양에 큰 변화가 없었다 (Fig. 4).

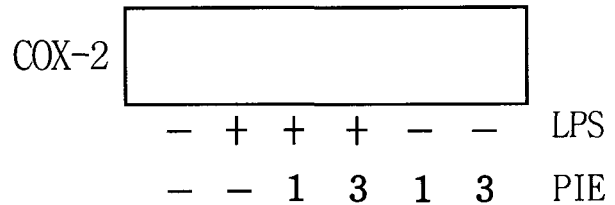


Fig. 4. Effect of PIE on the induction of COX-2 by LPS. Inhibition of LPS-inducible COX-2 protein expression by PIE. The level of COX-2 protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without PIE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

5. PIE가 LPS로 유도된 Raw cell의 p-IκB발현에 미치는 영향

Virus나 bacteria 감염시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되는 NFκB는 iNOS나 TNFα유전자의 발현에 관련된다²⁴. Resting cell에서 NFκB는 cytoplasm에서 inhibitory molecule인 IκBa, IκBβ, IκBε, p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NFκB signaling cascade가 활성화되면 IκB, p105, p100이 degradation되면서 NFκB가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. IκB protein의 종류는 IκBa, IκBβ, IκBε등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NFκB의 inhibitory protein은 IκBa이다²⁵. 본 실험에서는 IκBa의 phosphorylated form을 측정하였다. LPS처리시에는 p-IκBa 단백질이 유도되었으나, PIE 1.0mg/ml를 처리한 실험군에서는 p-IκBa의 양이 줄어들었으며,

PIE 3.0mg/ml를 처치한 실험군에서는 p-I κ B α 의 양이 현저히 줄어들어 용량의존적 감소를 보였다(Fig. 5).

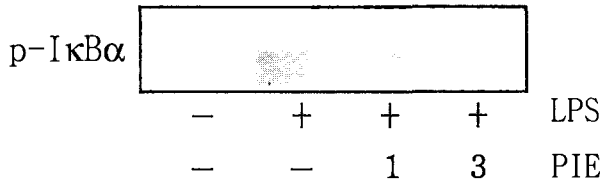


Fig. 5. Effect of PIE on the induction of p-I κ B α by LPS. Inhibition of LPS-inducible p-I κ B α protein expression by PIE. The level of p-I κ B α protein was monitored 5min after treatment of cells with LPS (1 μ g/ml) with or without PIE pretreatment (i.e. 1h before LPS).

6. PIE가 LPS로 유도된 Raw cell의 TNF- α 에 미치는 영향

TNF- α 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다²⁴). Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- α 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다²⁶). 본 실험에서 LPS는 TNF- α 의 분비를 촉진시켰지만, PIE 1.0 및 3.0 mg/ml은 유의한 결과를 나타내지 않았다(Fig. 6).

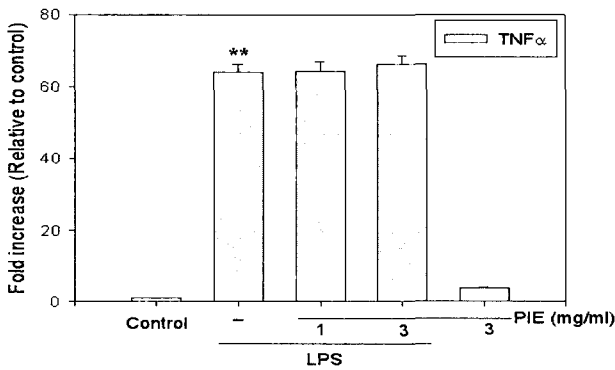


Fig. 6. The effect of PIE on LPS-inducible TNF- α production. Production of TNF- α was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of PIE for 6 h. The amount of TNF α was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. (*: significant as compared to control, **P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, ++P < 0.01).

7. PIE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1 β 에 미치는 영향

IL-1 β 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF α , IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 β 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다²⁶). 본 실험에서 LPS는 IL-1 β 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, PIE 1.0 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1 β 를 유의성있게 감소시켰다. 그러나 IL-1 β 의 감소가 PIE의 농도에 의존적이지는 않았다(Fig. 7).

8. PIE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-6에 미치는 영향

주로 Monocyte, macrophage IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진한다. IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가한다²⁶). 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, PIE 1.0 및 3.0

mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 농도의존적으로 유의성있게 감소시켰다(Fig. 8).

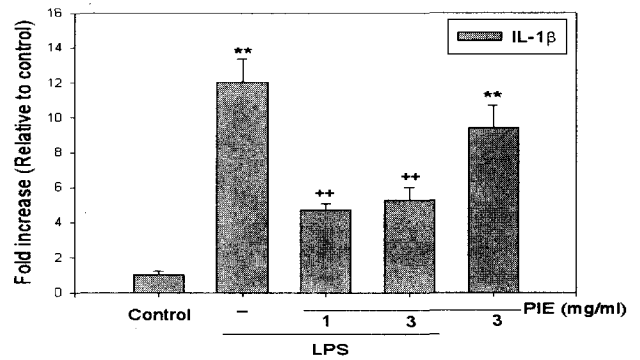


Fig. 7. The effect of PIE on LPS-inducible IL-1 β production. Production of IL-1 β was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of PIE for 12 h. The amount of IL-1 β was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. (*: significant as compared to control, **P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, ++P < 0.01).

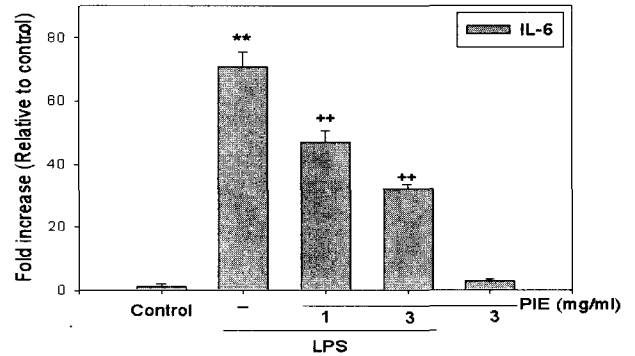


Fig. 8. The effect of PIE on LPS-inducible IL-6 production. Production of IL-6 was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of PIE for 6 h. The amount of IL-6 was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. (*: significant as compared to control, **P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, ++P < 0.01).

고찰

각종 활엽수의 생목이나 고목 위에서 발생하는 다년생 버섯인 桑黃은, 微苦寒하며¹⁾, 月經不調 崩中帶下 月閉血凝 五痔 腸風 下血 痔漏 疥癬 癩癧 積聚 腹痛 등을 치료한다^{2,3)}.

버섯종류의 약재는 근래들어 연구가 활발해진 분야 중의 하나이다. 예로 표고버섯으로부터 분리한 lentinan, 치마버섯으로부터 분리한 schizorhylan, 운지로부터 분리한 krestin, 상항으로부터 분리한 meshima등과 같은 다당체는 현재 항암 및 면역요법제등으로 널리 사용되어 지고 있다⁹⁾. 桑黃에 대한 연구로는 이⁴⁾등이 항암 및 면역조절효과를 밝혔고, Han⁵⁾, Ajith⁶⁾등은 항종양, 항전이효과를 보고하였다. 또한 Shon^{7,8)} 등은 桑黃추출물이 antioxidant와 free radical scavenging의 효능이 있음과 桑黃으로부터 분리한 polysaccharide가 cytochrome P450를 억제함을 보고하였다. 이와 같은 桑黃버섯 또는 桑黃버섯에서 분리한 다당체의 항종양작용에 대한 기작은, 아직 확실히는 밝혀지지 않은 상태이지만, 이들이 주로 대식세포 (macrophage)나 보체계 (complement system) 등의 면역체계를 활성화 시켜 항종양 효과

를 나타내는 것으로 보고 되고 있다⁹⁾. 본 연구에서는 열수추출된 상황(PIE)이 LPS로 activated된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하여, 상황이 면역체계에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다²⁷⁾. Inducible NOS (iNOS)는 염증시 대량으로 생성되고, constitutively expressed NOS (cNOS)는 저농도에서 생리적으로 작용한다²⁸⁾. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- α (TNF α) 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근 세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다^{16,17,20,29,30)}. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Raw 264.7 cell에서 PIE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 PIE를 0.1-3.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS농도 의존적으로 증가하였으며, PIE를 0.3mg/ml 처리한 실험군에서는 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, PIE 1.0과 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 12h, 18h 및 24h에서 유의한 NO생성억제를 나타내었다. PIE가 1.0 및 3.0mg/ml (12h, 18h, 24h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, PIE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, PIE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 PIE의 1.0 및 3.0mg/ml농도는 6-24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 PIE 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었으며, PIE 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 PIE를 동시처리시 PIE 농도 의존적으로 iNOS단백질의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. PIE단독으로는 1.0 및 3.0mg/ml에서 iNOS단백질의 양에는 변화를 일으키지 않았다. COX-2는 prooxidant나 proinflammatory stimuli (i.e. TPA, LPS, TNF α , ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NF κ B의 활성화를 경유하여 생

성되고, prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다^{22,23)}. 또 Monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1 β , TNF- α 와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다³¹⁾. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료의 target molecule이 되고 있다²⁴⁾. 본 실험에서는 LPS에 PIE 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양이 줄어들었으나, PIE 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양에 큰 변화가 없었다. Prooxidant나 proinflammatory stimuli (i.e. TPA, LPS, TNF α , ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NF κ B의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다²²⁻²⁴⁾.

본 실험에서 LPS처리시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 PIE 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양이 줄어들었으나, PIE 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양에 큰 변화가 없었다. iNOS나 COX-2의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NF κ B, AP-1, C/EBP등이 있으며²⁴⁾, 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NF κ B이다³²⁾. NF κ B는 cell apoptosis의 억제, cell cycle regulation, oncogenesis등과도 관련이 있으며²⁵⁾, virus나 bacteria 감염시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF α 유전자의 발현에 관련된다²⁴⁾. Resting cell에서 NF κ B는 cytoplasm에서 inhibitory molecule인 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NF κ B signaling cascade가 활성화되면 I κ B, p105, p100이 degradation되면서 NF κ B가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. I κ B protein의 종류는 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ 등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NF κ B의 inhibitory protein은 I κ B α 이다²⁵⁾. 본 실험에서는 I κ B α 의 phosphorylated form을 측정하였다. LPS처리시에는 p-I κ B α 단백질이 유도되었으나, PIE 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 p-I κ B α 의 양이 줄어들었으며, PIE 3.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 p-I κ B α 의 양이 현저히 줄어들어 용량의존적 감소를 보였다. 이는 iNOS나 COX-2의 감소 기작에, NF κ B의 translocation이 PIE에 의해 억제됨을 간접적으로 시사하는 것이라 할 수 있다.

TNF- α 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다²⁴⁾. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- α 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다²⁵⁾. 본 실험에서 LPS는 TNF- α 의 분비를 촉진시켰지만, PIE 1.0 및 3.0 mg/ml은 유의한 결과를 나타내지 않았다. 한편, IL-1 β 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF α , IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 β 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다²⁶⁾. 또한 IL-1은 septic shock³³⁾, burn³⁴⁾, 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury³⁵⁾의 경우에 prostaglandins,

leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide 등의 매개물 질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다³⁶⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-1 β 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, PIE 1.0 및 3.0 mg/ml 은 LPS로 유도된 IL-1 β 를 유의성있게 감소시켰다. 그러나 IL-1 β 의 감소가 PIE의 농도에 의존적이지는 않았다. Monocyte나 macrophage에서 분비되는 또 다른 cytokine인 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다²⁶⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, PIE 1.0 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰다.

이러한 연구결과는 PIE가 NF κ B의 억제단백질중의 하나인 I κ B α 의 phosphorylation을 억제하여 NF κ B가 핵안으로 translocation되는 기작을 억제하며, 그러한 결과로 NO, iNOS, IL-1, IL-6의 감소가 초래되는 것을 의미한다.

결 론

桑黃 불추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 cytokine의 level, nitric oxide의 production, iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 桑黃은 p-I κ B α 를 억제하고, iNOS의 발현 및 NO의 생성량을 억제하였으며, COX-2는 일부 농도에서 발현을 억제하였다. 桑黃은 또한 IL-1, IL-6 등의 proinflammatory cytokine을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 桑黃이 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 NO 및 과량의 proinflammatory cytokine생성과 관련된 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순, 중약대사전, pp 2836, 도서출판 정담, 서울, 한국, 1998.
2. 허준, 동의보감, pp 163, 326, 남산당, 서울, 한국, 1987.
3. 김진수, 김정효, 이효정, 길재호, 김성훈, 김동희. 산지별 상황버섯의 사이토카인 조절효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지, 17(4):898-904, 2003.
4. 이효정, 이효정, 박정민, 송규용, 강경선, 김성훈. 갑보디안 상황버섯의 항암 및 면역조절작용에 대한 연구. 동의생리병리학회지, 16(2):332-337, 2002.
5. Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH, Kim HM. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology*. 41(2):157-64, 1999.

6. Ajith TA, Janardhanan KK. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *J Ethnopharmacol*. 84(2-3), 157-62, 2003.
7. Shon MY, Kim TH, Sung NJ. antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food chemistry*. 82:593-597, 2003.
8. Shon YH, Nam KS. Inhibition of cytochrome P450 isozymes in rat liver microsomes by polysaccharides derived from *Phellinus linteus*. *Biotechnol Lett*. 25(2), 167-72, 2003.
9. Song CH, Ra KS, Yang BK, Jeon YJ. Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. *The Korean journal of mycology*. 26(1):86-90, 1998.
10. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol*. 10, 8-15, 2000.
11. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol*. 144, 1425-1431, 1990.
12. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 211, 24-32, 1996.
13. Corbett JA, Mac Daniel ML. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med*. 181, 559-568, 1995.
14. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*, 6:399-406, 1994.
15. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가?. 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39, 52-63, 1999.
16. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 28, 217-226, 2000.
17. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406, 301-309, 2000.
18. Seo WG, Pae HO, Oh GS, KY Chai, Kwon TO, YG Yun, NY Kim, HT Chung. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 76, 59-64, 2001.
19. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물

- 의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동아시아병리학회지, 17(3):771-776, 2003.
20. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol* 35, 21-28, 2000.
 21. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. 대한한의학방제학회지. 10(2):189-197, 2002.
 22. Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* 40(8):1091-7, 2002.
 23. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res.* 480-481, 243-68, 2001
 24. Lee AK, Sung SH, Kim YC and Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology.* 139, 11-20, 2003.
 25. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 159(2), 387-97, 2001.
 26. 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.* 37(6):355-61, 2003.
 27. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature,* 333, 664-666, 1988.
 28. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase; a little bit of good in all of us. *Gut,* 47, 6-9, 2000.
 29. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 69:625-635, 2001.
 30. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 76:119-123, 2001.
 31. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 4(2):116-23, 2004.
 32. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 오미소독음이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. 동아시아병리학회지, 16(5):921-927, 2002.
 33. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med,* 119, 771-8, 1993.
 34. Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1 β in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest.* 23, 311-9, 1993.
 35. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation,* 63, 143-8, 1997.
 36. Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery.* 135(5):544-554, 2004.