

Raw 264.7 cell에서 차가 버섯 에탄올 추출물이 Cytokine 발현에 미치는 영향

변부형**

대구한의대학교

Effects of *Innotus obliquus* Ethanol Extract on Cytokine Expression in Raw 264.7 Cell

Boo-Hyeong Byun**

Daegu Haany university, Daegu, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to investigate the effects *Innotus obliquus* on the cytokine expression in Raw 264.7 cells.

Methods : In Raw 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide(LPS) to Mimic inflammation, *Innotus obliquus* ethanol extract inhibited nitric oxide production in a dose-dependent manner and abrogated inducible nitric oxide sythase(iNOS) and cyclooxygenase (COX-2). The levels of cytokines were analyzed by sandwich immuno assays.

Results and Conclusions : Results provided evidence that *Innotus obliquus* inhibited the production of IL-b, and IL-6 in Raw 264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS). These finding suggested that *Innotus obliquus* can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

Key words : *Innotus obliquus*, iNOS, COX-2, TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, Raw 264.7 cells

**제1저자, 교신저자: 변 부형. 대구한의대학교. Tel: 053-770-2245

· 접수 : 2005년 4월 23일 · 수정 : 2005년 6월 15일 · 채택 : 2005년 6월 20일

緒 論

차가버섯(*Inonotus obliquus*, *Fuscosporia obliqua*)은 소나무 비늘버섯과(Hymenochaetae)에 속하는 다년생의 담자균 버섯으로, 자연 상태에서 시베리아, 핀란드, 노르웨이, 우크라이나, 헝가리 등 북위 45도 이상의 춥고 습한 북반구에 분포하며, 일반적으로 자작나무, 오리나무, 마가목 등의 줄기나 그루터기에 자생하는 극내 한성 버섯이다. 국내에서 자생한다는 보고는 아직 없으며, 백색 부후 균의 일종으로, 자연 상태에서 성장하면 검은색의 균핵 덩어리가 되어 자작나무 등의 줄기에 기생하는 것으로 알려져 있다. 韓醫學에서는 疾病의 發生과 그 治療 方法에 있어서 일찍이 免役學적 概念을 가장 중시하여 왔다고 할 수 있는데, 발병의 원인에 있어 外的要因의 邪氣 보다는 이를 豫防하거나 除去해 내지 못하는 精氣의 부족에 있음을 지적하였다. 물론 外部의 사기 뿐 아니라 몸 안에서 생성된 신생물에 대해서도 그 책임으로 면역력 저하를 강조하여 치병원칙으로 면역력의 능력의 회복에 중점을 두었다¹⁻³⁾. 그동안 면역능의 증진이나 조절에 관련되는 한약물에 대한 많은 연구들이 진행되어 왔으며⁴⁻⁶⁾, 최근에 와서는 수많은 버섯류에서 추출한 다당체 들이나 배양된 균사체에서 다양한 면역효과가 있음이 보고 되고 있다.⁷⁻¹⁴⁾ 이에 저자는 천연물인 차가버섯을 이용하여 추출물을 마련한 후, 차가 버섯 추출물이 cytokine 조절에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 실험재료 및 시약

1) 실험재료

실험에 사용된 차가버섯은 러시아산을 선별, 건조하여 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

2) 시료 추출액의 제조

차가버섯 건조분말 80g에 3차 증류수 700ml를 가하여 83℃에서 8시간동안 진탕 추출하고 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 추출액을 얻고 남은

잔사에 같은 부피의 3차 증류수를 가하고 100℃에서 8시간동안 진탕 추출, 여과하여 추출물을 얻었다. 다시 같은 부피의 3차 증류수를 추출 잔사에 가하여 121℃에서 8hr 동안 추출, 여과하여 추출액을 얻었다. 얻어진 추출물은 동결건조한 후 -20℃의 냉동고에 보관하면서 실험에 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.

2. 세포 배양

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℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘지 않은 cell만 사용하였다.

3. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells (1 \times 10⁶/ml)을 분주하고 PIE를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70℃에서 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.

4. 통계적 검증

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

結 果

1. chaga extract가 LPS 로 유도된 Raw cells의 TNF-α에 미치는 영향

TNF-α는 LPS 반응의 주요 매개체로서 Innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다¹⁵⁾. Macrophage 와 Mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에서 세포 독성을 나타내며, 염증 반응과 관련되어 있다¹⁶⁾. 본 실험에서 LPS는 TNF-α의 분비를 촉진 촉진시켰지만, 농도를 달리한 Chaga extract 3 ug/ml, 10 ug/ml, 30 ug/ml에서는 유의한 결과를 나타내지 않았으나, 100 ug/ml에서는 유의한 효과를 나타내었다(Fig.1).

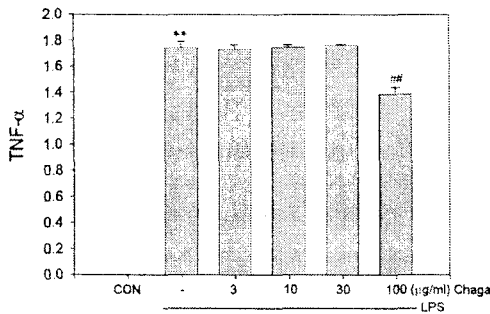


Fig.1 The effects of Chaga extract on LPS-inducible TNF-α Production
Production of TNF-α was measured in the medium of raw264.7 cells cultured with LPS (1ug/ml) in the presence or absence of Chaga extract for 6hr. Data represent the mean±S.D with three separate experiments. (*:significant as compared to control,**p<0.01,#:significant as compared to LPS alone, ##p<0.01)

2. Chaga extract가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1β에 미치는 영향

IL-1β는 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-1β는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화 한다¹⁷⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, Chaga extract 은 LPS로 유도된 IL-1β를 유의성 있게 감소시켰다. 그러나 IL-1β의 감소가 Chaga extract의 농도의존적인 것으로 나타났다(Fig.2).

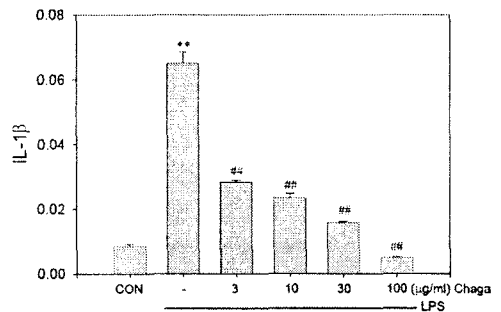


Fig.2 The effects of Chaga extract on LPS-inducible IL-1β Production
Production of IL-1β was measured in the medium of raw264.7 cells cultured with LPS (1ug/ml) in the presence or absence of Chaga extract for 6hr. Data represent the mean±S.D with three separate experiments. (*:significant as compared to control,**p<0.01,#:significant as compared to LPS alone, ##p<0.01)

3. Chaga extract 가 LPS 로 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 염증 병소에서 항상 증가 한다¹⁷⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의 성 있게 증가시켰으며, Chaga

extract 3ug/ml, 10ug/ml, 30 ug/ml 및 100 ug/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3).

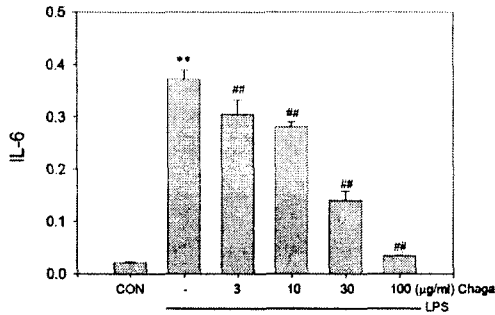


Fig.3 The effects of Chaga extract on LPS-inducible IL-6 Production
Production of IL-6 was measured in the medium of raw264.7 cells cultured with LPS (1ug/ml) in the presence or absence of Chaga extract for 6hr. Data represent the mean±S.D with three separate experiments. (*.significant as compared to control,**p<0.01,#:significant as compared to LPS alone, ##p<0.01)

考 察

韓醫學에서는 疾病의 發生과 그 治療 方法에 있어서 일찍이 免役學적 概念을 가장 중시하여 왔다고 할 수 있는데, 발병의 원인에 있어 外的要因의 邪氣 보다는 이를 豫防하거나 除去해 내지 못하는 精氣의 부족에 있음을 지적하였다. 물론 外部의 사기 뿐 아니라 몸안에서 생성된 新생물에 대해서도 그 책임으로 면역력 저하를 강조하여 治病원칙으로 면역력의 능력의 회복에 중점을 두었다.¹⁻³⁾ 그 동안 면역능의 증진이나 조절에 관련되는 한약물에 대한 많은 연구들이 진행되어 왔으며^{4,6)}, 최근에 와서는 수많은 버섯류에서 추출한 다당체 들이나 배양된 균사체에서 다양한 면역 효과가 있음이 보고 되고 있다.⁷⁻¹⁴⁾

예로부터 표고버섯으로부터 분리한 lentinan, 치마버섯으로부터 분리한 schizorhyllan, 운지로부터 분리한 krestin, 상황으로부터 분리한 meshima등과 같은 다당체는 현재 항암 및 면역요법제등으로 널리 사용되어 지고 있다.¹⁸⁾ 桑黃에 대한 연구로는

Han¹⁹⁾, Ajith 등²⁰⁾은 항종양, 항전이 효과를 보고하였다. 또한 Song 등¹⁸⁾은 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 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고 되고 있다²⁰⁾. 본 연구에서는 차가버섯추출물이 LPS로 activated된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 면역관련 지표들에 미치는 영향을 평가하여, 차가버섯추출물이 면역체계에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

본 실험에서 측정된 TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다¹⁵⁾. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다¹⁶⁾. 본 실험에서 LPS는 TNF-알파의 분비를 촉진 촉진시켰지만, 농도를 달리한 Chaga extract 3 ug/ml, 10 ug/ml, 30 ug/ml에서는 유의한 결과를 나타내지 않았으나, 100 ug/ml에서는 유의한 효과를 나타내었다. 한편, IL-1β는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNFα, IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1β는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다²¹⁾. 또한 IL-1β은 septic shock²²⁾, burn¹⁷⁾, 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury²³⁾의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide등의 매개물 질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다²⁴⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, 차가추출물은 LPS로 유도된 IL-1β를 유의성 있게 감소시켰다. 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 있다²⁴⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, 차가추출물은 LPS로 유도된 IL-6를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다. 이상의 결과를 종합해 보면 차가추출물은 IL-1β,

IL-6의 proinflammatory cytokine을 유의성 있게 억제하므로 proinflammatory cytokine과 관련된 면역 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

結 論

cytokine 조절에 미치는 차가 추출물의 영향을 관찰한 결과, LPS는 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, 차가 추출물은 LPS로 유도된 IL-6를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다. 이러한 결과를 미루어 볼 때, 차가추출물은 IL-1 β , IL-6의 proinflammatory cytokine을 유의성 있게 억제하므로 proinflammatory cytokine과 관련된 면역 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

감사의 말씀

본 논문은 2004년도 대구한의대학교 기린연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

參考文獻

- 왕기 외. 황제내경소문급석. 서울:성보사. 1985:1-14,60,146, 124-331.
- 홍원식. 정교 황제 내경영추. 서울:동양의학 연구원출판부. 1985:11, 38, 104, 124, 159, 211, 249, 287, 317, 331.
- 이중재. 의종필독. 대북:중합출판사 1976:410, 412, 473.
- 임미양. 부정항암당이 항종양면역반응에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1988;19:234-250.
- 박혜준. 팔물당이 항암 및 면역 기능에 미치는 실험적 효과. 대한한의학회지. 1988;19:327-338.
- 이주희. 길경당과 길경탕가미방이 S-180에 대한 항암효과 및 면역반응에 관한 실험적 연구. 경희한의대 논문집. 1988;21:225-250.
- 정규선. 버섯성분이 Hela 배양세포에 미치는 영향. 서울:숙명여자대학교 대학원 박사학위논문. 1978.
- 이송애. 치마버섯, 목이버섯의 항암성분에 관한 연구. 한국균학회지. 1982;10:21-29.
- 조희정. 구름버섯의 항암성분에 관한 연구. 한국균학회지. 1988;16:89-97.
- 정경수. 표고버섯의 항암성분에 관한 연구. 서울:한국균학회지. 1982;10:54-68.
- 김성환. 영지버섯다당체의 마우스 대식세포 면역증강 효과. 한국식품영양과학회지. 1997;13:61-82.
- 임은정. 양송이 버섯 알카리 추출물로부터 분리한 보체계 활성화 단백질다당에 관한 연구. 대구:영남대학교 대학원 석사학위논문. 1996.
- 정영미. 싸리버섯 추출물의 면역 조절 및 항종양작용에 관한 연구. 대구:영남대학교 대학원 박사학위논문. 1996.
- 조미경. 황금빨나팔버섯이 S-180에 대한 항종양 효과. 서울:숙명여자대학교 대학교 대학원 석사학위논문. 1990.
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. British journal of pharmacology. 2003;139:11-20.
- F Chen, V Castranova, X Shi.. New insight into the role of nuclear factor-kB in cell growth regulation. AJP, 2001:387-397.
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. 2003;37(6):355-61.
- Song CH, Ra KS, Yang BK, Jeon YJ. Immuno-stimulating activity of Phellinus linteus. The Koren journal of mycology. 1998;26(1):86-90.
- 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. 1999;41(2):157-64.
- Ajith TA, Janardhanan KK. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, Phellinus rimosus (Berk) Pilat. J Ethnopharmacol. 2003;84(2-3):157-62.
- Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 1993;119:771-8.

22. Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1b in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:311-9.
23. 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 a ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation.* 1997;63:143-8.
24. Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery.* 2004;135(5):544-554.