大韓本草學會誌 제20권 제2호 (2005년 6월)
Kor. J. Herbology 2005;20(2):7-16

# 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향

변성희#, 양재하, 김상찬*

대구한의대학교 한의학과, 한방생명자원연구센터

# Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF-α , IL-1β, IL-6 and Nitric Oxide production in lipopolysaccharide - activated Raw 264.7 cells

Sung Hui Byun#, Chae Ha Yang, Sang Chan Kim*

Research Center for Biomedical Resources of Oriental Medicine &
College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Korea.

## ABSTRACT

**Objectives** : Scrophulariae Radix (SRE) is commonly used in combination with other herbs as a nutrient and health strengthening agent, and to remove "heat" and replenish vital essence. The water-based extract of this herb can lower blood pressure in both anesthetized and concious animals, and exhibits an anti-inflammatory activity. But, there is lack of studies regarding the effects of SRE on the immunological activities in molecular levels. The present study was conducted to evaluate the effect of SRE on the regulatory mechanism of cytokines and nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells.

**Methods** : After the treatment of Scrophulariae Radix methanol 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** : Results provided evidence that SRE inhibited the production of nitrite and nitrate (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6), and the activation of phospholylation of inhibitor κBα (p-IκBα) in Raw 264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS).

**Conclusion** : These findings suggest that Scrophulariae Radix can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

**Key words** : Scrophulariae Radix, iNOS, COX-2, LPS, cytokine

*교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학
E-mail: sckim@dhu.ac.kr, phone: 053-770-2247; fax: 053-768-6340
#제1저자 : 변성희, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학
E-mail: shbyun@dhu.ac.kr, phone: 053-770-2244; fax: 053-768-6340
· 접수 : 2005년 3월 15일 · 수정 : 2005년 6월 13일 · 채택 : 2005년 6월 20일

# 서 론

Macrophage (대식세포)는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 reactive oxygen species (ROS) 와 interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) 및 interleukin-6 (IL-6)와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다[1,2]. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1β, TNF-α 및 nitric oxide (NO)는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다[3-6]. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 靑黛[7], 苦楝皮[8], 香附子[9,10], 구지뽕나무[11], 款冬花[12], 當歸[13] 등의 한약에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

玄參은 北玄參 (Scrophularia buergeriana Miq.)과 玄參 (S. ningpoensis Hemsl.)의 뿌리를 건조한 것이다. 滋陰降火하는 약재로 腎陰不足을 補할 수 있으며, 특히 邪熱이 內盛하여 腎陰이 부족하여 된 證에 필요한 약이 된다. 또한 溫熱病에 陰液이 손상되어 口渴心煩, 發斑하는 증상을 치료하고, 陰虛로 인한 骨節煩熱을 치료한다. 그리고, 潤燥, 軟堅解毒의 효능이 있어 陰虛證과 熱毒證에 적용하여 치료할 수 있으며, 虛火가 상승하여 발생한 咽喉腫痛을 치료한다[14].

현삼에 대한 연구로는, 지질과산화반응억제등의 항산화효과[15] 항우울효과[16] 항염증효과[17,18] 신경 및 간독성저감효과[19-21] 항치매효과[22] 항당뇨효과[18] 항소양효능[23]등이 보고되었으나, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS)등의 염증관련단백질 및 cytokine에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구는 현삼의 메탄올 추출물 (SRE)이 NO production, iNOS, COX-2발현 및 interleukin-1β (IL-1β), IL-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

# 재료 및 방법

## 1. 추출물의 제조

현삼 (Youngnam pharm., Daegu, Korea)은 300g을 물 3L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000×*g*에서 3분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 0.2μm filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20℃에서 보관하였다. 현삼의 수율은 8.67%였으며 실험시 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 및100 μg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% $CO_2$ 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-1β와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

## 4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 $5\times10^4$ cells/well로 분주한 다음 SRE를 농도별로 처치하여

세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1 - 3.0 mg/ml의 농도로 SRE를 처치하고 37℃, 5% CO2에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처치한 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×/(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

## 5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 $NO_2^-$의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 ㎕와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in $H_2O$) 100 ㎕를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. $NO_2^-$의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 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 lysis 시켰다. Cell lysates를 10,000×$g$로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석,측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2 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 ($1\times10^6$/ml)을 분주하고 SRE를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70℃에서 보관하였다. TNF-α, IL-1β와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

# 결 과

## 1. SRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 SRE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 SRE를 0.1-0.3mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 시간의존적으로 증가하였으며, SRE를 처치한 실험군에서는 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였다. (Fig. 1).

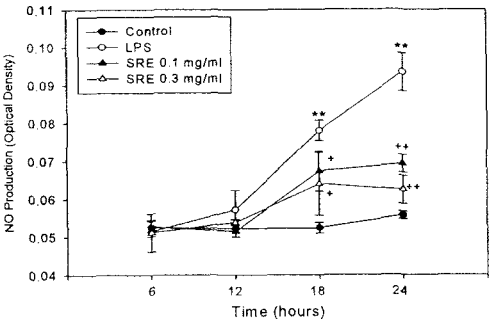


Fig. 1. Effects of SRE on the production of NO in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of SRE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 ㎍/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experimets. (*: significant as compared to control, **P<0.01, +: significant as compared to LPS alone, at concomitant time +P< 0.05 ++P<0.01).

## 2. SRE가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

SRE가 0.1및 0.3mg/ml (18h, 24h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, SRE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, SRE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 SRE의 0.1 및 0.3mg/ml 농도는 6-24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2).

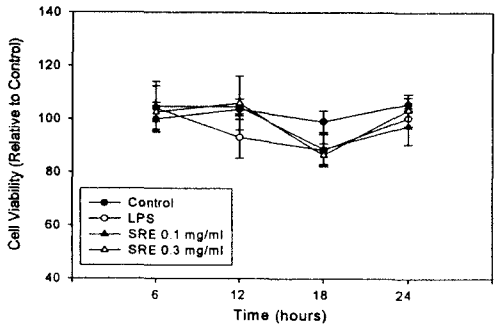


Fig. 2. Effects of SRE on the cell viability in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of SRE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μg/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experimets.

## 3. SRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS 발현에 미치는 영향

NO 생성 억제기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 SRE 0.1mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 줄어 들었으며, SRE 0.3mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 더욱 현저히 감소하여. SRE 농도 의존적으로 iNOS단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

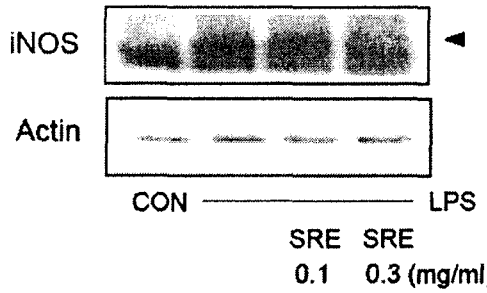


Fig. 3. Effect of SRE on the induction of iNOS by LPS. Inhibition of LPS-stimulated iNOS protein expression by SRE. The level of iNOS protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) with or without SRE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

## 4. SRE가 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[24,25]. 본 실험에서 LPS처치시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 SRE 0.1mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 줄어들었으며, SRE 0.3mg/mll을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 더욱 현저히 줄어들어 SRE는 농도 의존적으로 COX-2의 생성억제를 나타내었다. (Fig. 4).

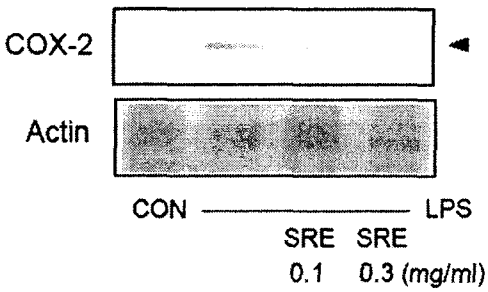


Fig. 4. Effect of SRE on the induction of COX-2 by LPS. Inhibition of LPS-stimulated COX-2 protein expression by SRE. The level of COX-2 protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) with or without SRE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

## 5. SRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 TNF-α에 미치는 영향

TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다[26]. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다[27]. 본 실험에서 LPS는 TNF-α의 분비를 촉진시켰으며, SRE 0.1 및 0.3 mg/ml은 TNF-α를 유의성있게 감소시켰다 (Fig. 5).

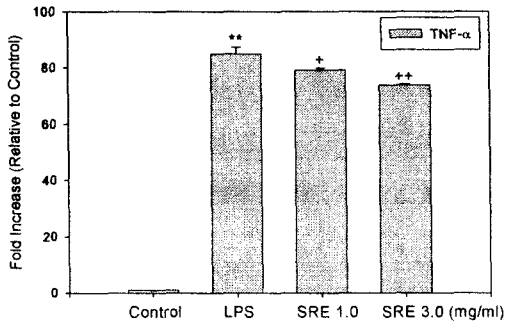


Fig. 5. The effect of SRE on LPS-inducible TNF-α production. Production of TNF-α was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of SRE for 6 h. The amount of TNF-α was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean ± S.D. with three separate experimets. (*: significant as compared to control, $**P<0.01$,+: significant as compared to LPS alone, $++P<0.01$).

## 6. SRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1β에 미치는 영향

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 활성화한다[27]. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SRE 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1β를 유의성있게 감소시켰다. 그러나 1mg/ml에서는 LPS로 유도된 IL-1β의 감소가 나타나지 않았다 (Fig. 6).

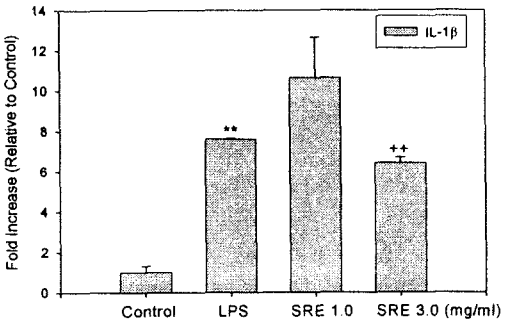


Fig. 6. The effect of SRE on LPS-stimulated IL-1b production. Production of IL-1b was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of SRE for 6 h. The amount of IL-1b was measured by immunoassay as described in Experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (*: significant as compared to control, $**P<0.01$, +: significant as compared to LPS alone, $++P< 0.01$)

## 7. SRE가 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 증가한다[27].

본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으나, SRE 1.0mg/ml 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 감소시키지 못하였다 (Fig. 7).

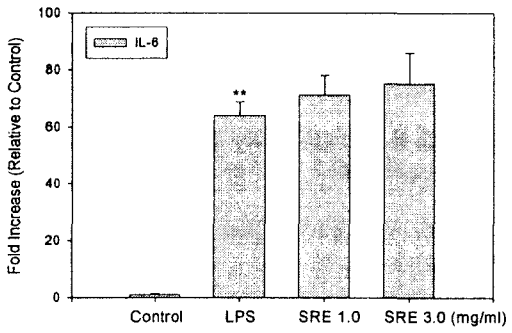


Fig. 7. The effect of SRE on LPS-stimulated IL-6 production. Production of IL-6 was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of SRE for 6 and 12 h. The amount of IL-6 was measured by immunoassay as described in Experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (*: significant as compared to control, **P<0.01)

## 고 찰

현삼은 北玄參 (*Scrophularia buergeriana* Miq.)과 玄參 (*S. ningpoensis* Hemsl.)의 뿌리를 건조한 것이다. 滋陰降火하는 약재로 腎陰不足을 補할 수 있으며, 특히 邪熱이 內盛하여 腎陰이 부족하여 된 證에 필요한 약이 된다. 또한 溫熱病에 陰液이 손상되어 口渴心煩, 發斑하는 증상을 치료하고, 陰虛로 인한 骨節煩熱을 치료한다. 그리고, 潤燥, 軟堅解毒의 효능이 있어 陰虛證과 熱毒證에 적용하여 치료할 수 있으며, 虛火가 상승하여 발생한 咽喉腫痛을 치료한다.[14]

박 등[15]은 현삼이 지질과산화반응억제등의 항산화효과를 밝혔으며, Xu 등[28]은 현삼의 항우울효과를, Diaz 등[17]은 현삼의 phenylpropanoid glycosides가 in vitro에서 anti-inflammatory activity를 가짐을 보고하였고, Kim 등[19]은 현삼의 iridoids가 glutamate로 유도된 신경독성을 경감시킴을 보고하였으며, Kim 등[22] 현삼으로부터 추출한 E-p-methoxycinnamic acid가 항치매작용이 있음을 보고하였고, Ahmed 등[18]은 현삼의 iridoid인 scropolioside-D2와 harpagoside-B가 항당뇨효과와 항염증효과를 가짐을 보고하였으며, Kim 등[20]은 90% MeOH로 추출한 현삼에서 4가지의 새로운 iridoid glycosides, 8-O-E-p-methoxycinnamoylharpagide, 8-O-Z-p-methoxycinnamoylharpagide, 6′-O-E-p-methoxycinnamoylharpagide, 6′-O-Z-p-methoxycinnamoylharpagide와 E-harpagoside, Z-harpagoside와 harpagide가 glutamate로 유도된 neurotoxicity를 약화시킴을 보고하였고, Lee 등[21]은 현삼의 phenylpropanoid성분이 $CCl_4$로 유도된 간독성에 대하여 보호효과를 가짐을 보고하였고, Stevenson 등[29]은 현삼의 acylated iridoid glycosides가 상처치유의 효과를 가짐을 보고하였다. 또한 Tohda 등[23]은 현삼의 methanol추출물이 substance P에 의해 유도된 itch-scratch response를 경감시키는 anti-pruritic 효능을 보고하였으나, COX-2, iNOS등의 염증관련단백질 및 cytokine에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구는 현삼의 메탄올 추출물 (SRE)이 NO production, iNOS, COX-2발현 및 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다[30]. Inducible NOS (iNOS)는 염증시 대량으로 생성되고, constitutively expressed NOS (cNOS)는 저농도에서 생리적으로 작용한다[31]. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, cNOS 에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endotherial 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 (TNFα)등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 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, 염증반응유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다[7,8,11,32,33]. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 SRE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 SRE를 0.1-0.3mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS농도 의존적으로 증가하였으며, SRE를 0.1과 0.3mg/ml 처치한 실험군에서는 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, SRE가 0.1및 0.3mg/ml (18h, 24h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, SRE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, SRE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 SRE의 0.1 및 0.3mg/ml농도는 6-24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 SRE 0.1mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 줄어들었으며, SRE 0.3mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 SRE를 동시처리시 SRE 농도 의존적으로 iNOS단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

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[24-26]. 또 Monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1β, TNF-α와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다[34]. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료의 target molecule이 되고 있다[26]. 본 실험에서는 LPS처치시에 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으며, LPS에 SRE 0.1mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 줄어들었으며, SRE 0.3mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 현저히 줄어들었다.

TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다[26]. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다[27]. 본 실험에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SRE 0.1 및 0.3 mg/ml은 유의한 감소를 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 활성화한다[27]. 또한 IL-1은 septic shock[35], burn[36], 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury[37]의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다[38]. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, SRE는 LPS로 유도된 IL-1β를 SRE 0.1mg/ml에서는 감소시키지 못하였지만, SRE 0.3mg/ml의 농도에서는 현저히 감소시켰다. Monocyte나 macrophage에서 분비되는 또 다른 cytokine인 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antobody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다[27]. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으나, SRE는 LPS로 유도된 IL-6를 감소시키지 못하였다.

## 결 론

玄蔘 메탄올추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 cytokine의 level, nitric oxide production, iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 玄蔘은 NO의 생성량 및 iNOS의 발현을 억제하였으며, COX-2는 일부 농도에서 발현을 억제하였다. 玄蔘은 또한 IL-1β 및 TNF-α의 proinflammatory cytokine을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 玄蔘이 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 NO 및 과량의 proinflammatory cytokine생성과 관련된 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

## Acknowledgment

This work was supported by grant R12-2003-002-03002-0 from the basic research program of the Korea Science and Engineering Foundation.

# 참고문헌


1. 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. 2000;10:8-15.
2. 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. 1990;144:1425-1431.
3. 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. 1996;211:24-32.
4. Corbett JA, and Mac Daniel ML : Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide syntheses. J. Exp. Med. 1995;181:559-568.
5. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL : TNF and IFNγ potentiate the deleterious effects of IL-1β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 1994;6:399-406.
6. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지. 1999;39:52-63.
7. 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. 2000;28:217-226.
8. 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. 2000;406:301-309.
9. 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. 2001;76:59-64.
10. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):771-776.
11. 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-and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol. 2000;35:21-28.
12. T.G. Yoon, B.H. Byun, T.K. Kwon, S.I. Suh, S.H. Byun, Y.K. Kwon, S.C. Kim. Inhibitory effect of Farfarae Flos water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(3):908-913.
13. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정헌택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. 대한한의학방제학회지. 2002;10(2):189-197.
14. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1992:192-193.
15. 박용기, 강병수. 현삼의 항산화작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1998;13(1):201-220.
16. Xu C, Luo L, Tan RX. Antidepressant effect of three traditional Chinese medicines in the learned helplessness model. J Ethnopharmacol. 2004;91(2-3):345-349.
17. Diaz AM, Abad MJ, Fernandez L, Silvan AM, De Santos J, Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from Scrophularia scorodonia: in vitro anti-inflammatory activity. Life Sci. 2004;74(20):2515-2526.
18. Ahmed B, Al-Rehaily AJ, Al-Howiriny TA, El-Sayed KA, Ahmad MS. Scropolioside-D2 and harpagoside-B: two new iridoid glycosides from Scrophularia deserti and their antidiabetic and antiinflammatory activity. Biol Pharm Bull. 2003;26(4):462-467.

19. Kim SR, Koo KA, Sung SH, Ma CJ, Yoon JS, Kim YC. Iridoids from Scrophularia buergeriana attenuate glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures. J Neurosci Res. 2003;74(6):948-955.
20. Kim SR, Lee KY, Koo KA, Sung SH, Lee NG, Kim J, Kim YC. Four new neuroprotective iridoid glycosides from Scrophularia buergeriana roots. J Nat Prod. 2002;11:1696-1699.
21. Lee EJ, Kim SR, Kim J, Kim YC. Hepatoprotective phenylpropanoids from Scrophularia buergeriana roots against CCl(4)-induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. Planta Med. 2002;68(5):407-411.
22. Kim SR, Kang SY, Lee KY, Kim SH, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. Anti-amnestic activity of E-p-methoxycinnamic acid from Scrophularia buergeriana. Brain Res Cogn Brain Res. 2003;17(2):454-461.
23. Tohda C, Kakihara Y, Komatsu K, Kuraishi Y. Inhibitory effects of methanol extracts of herbal medicines on substance P-induced itch-scratch response. Biol Pharm Bull. 2000;23(5):599-601.
24. Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. Food Chem Toxicol. 2002;40(8): 1091-1097.
25. 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-kappa B activation. Mutat Res. 2001;480-481:243-268.
26. 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-κBα phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. British journal of pharmacology. 2003;139:11-20.
27. 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):355-361.
28. Xu C, Luo L, Tan RX. Antidepressant effect of three traditional Chinese medicines in the learned helplessness model. J Ethnopharmacol. 2004;91(2-3):345-349.
29. Stevenson PC, Simmonds MS, Sampson J, Houghton PJ, Grice P. Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from Scrophularia nodosa. Phytother Res. 2002;16(1):33-35.
30. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature, 1988;333:664-666.
31. Kubes p. Inducible nitric oxide synthase; a little bit og good in all of us. Gut. 2000;47:6-9.
32. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 2001;69:625-635.
33. 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. 2001;76: 119-123.
34. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. Curr Opin Pharmacol. 2004;4(2):116-123.
35. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med, 1993;119:771-778.
36. 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;23:311-319.
37. 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. 1997;63:143-148.

38. 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.