

황련의 쥐 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide 및 TNF- α 의 생성억제효과

정효원, 박용기*[#]

동국대학교 한의과대학 본초학교실

Inhibitory effects of *Coptidis Rhizoma* on the LPS-induced production of nitric oxide and TNF- α in mouse macrophage cells

Hyo Won Jung and Yong Ki Park*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
Kyongju 780-714, Korea

ABSTRACT

Objectives : *Coptidis Rhizoma* has been known traditional medicine with antimicrobial activities. We investigated inhibitory effects of *Coptidis Rhizoma* extract on lipopolysaccharide(LPS)-induced nitric oxide production from mouse macrophages.

Methods : After *Coptidis Rhizoma* extract was pretreated in BV2, mouse brain macrophages and RAW264.7 mouse macrophages, cells were activated with LPS. To investigate cytotoxicity *Coptidis Rhizoma* extract, cell viability was measured by MTT assay. The production of nitric oxide(NO) and inducible nitric oxide synthase(iNOS) was determined in each culture supernatant and mRNA by Griess reaction and RT-PCR. The production of TNF- α from cells was measured by ELISA.

Results : *Coptidis Rhizoma* extract significantly inhibited LPS-induced NO production in BV2 and RAW264.7 cells. *Coptidis Rhizoma* extract also greatly suppressed mRNA expression of iNOS in BV2 and RAW264.7 cells activated by LPS.

Conclusion : These data suggests that *Coptidis Rhizoma* extract may have an anti-inflammatory effect through the inhibition of NO production.

Key words : Anti-inflammation, BV2, *Coptidis Rhizoma*, iNOS, lipopolysaccharide, macrophage, NO, RAW264.7

* 제1저자, 교신저자: 박용기, 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
E-mail: yongki@dongguk.ac.kr, Phone: 054-770-2661; Fax: 054-770-2661.
· 접수 : 2006년 5월 10일 · 수정 : 2006년 5월 26일 · 채택 : 2006년 6월 25일

서론

대식세포(macrophage)는 외부자극에 의해 활성화됨으로써 TNF- α , IL-1과 같은 염증사이토카인이나 iNOS와 COX-2에 의해 생성되는 ROS, NO, PEG 등의 염증물질을 다량 분비함으로써 염증을 유발하여 염증질환 발달에 중요한 역할을 하게 된다.¹⁾ 뇌 대식세포인 microglia는 조직손상 시 활성화되어 TNF- α , IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8 등의 염증매개 사이토카인이나 FGF- β , TGF- β 1, nerve growth factor(NGF) 등의 성장인자, brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3(NT-3), NT-4/5 및 NO 등을 분비함으로써 항원을 제거(scavengers)함과 동시에 손상 부위에 염증반응을 유발함으로써 허혈(ischemia), 외상(trauma), 감염(infection), 알츠하이머(Alzheimer's disease) 및 파킨슨병(Parkinson's disease)과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병에도 기여하게 된다.²⁾

NO는 외부항원의 자극으로 활성화된 대식세포에서 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 free radical로서 혈관내 항상성 유지(vascular homeostasis)나 뇌신경전달물질 조절(neurotransmission), 항암효과(anti-tumor activity), 세포독성(cell toxicity) 등 다양한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.³⁾ 특히 bacterial lipopolysaccharide(LPS)는 염증을 유발하는 주요 inflammagen으로서⁴⁾, 대식세포를 활성화시켜 NO, TNF- α , monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage inflammatory peptide-1 α (MIP-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 등 염증반응 매개물질을 분비하게 하며, 이와 같은 세포독성물질은 조직 내 염증반응을 촉진시킴으로써 병 발달에 기여하게 된다.⁵⁻⁸⁾ 따라서 최근에는 천연물제제를 이용하여 병원균 감염(microbial infection)에 의한 염증질환이나 류마티스관절염(rheumatoid arthritis), 신부전증(renal failure)과 같은 만성염증성 질환(chronic inflammatory disease)이나 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease)과 같은 다양한 염증질환을 대상으로 NO와 같은 염증매개물질의 생성이나 활성을 억제할 수 있는 항염증 효과에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.⁹⁻¹³⁾

천황련(川黃連; *Coptidis chinensis* FRANCH.)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 여러해살이 초본식물로서 중국이 원산이며 한국, 일본, 중국 등지에서 재배하고 있고, 주로 산지의 습지에서 서식하며

한방에서는 11월경에 5-6년 된 천황련의 뿌리를 채취하여 햇볕에 말려 사용한다.^{4,15)} 일반적으로 황련은 苦, 寒, 無毒하고 心, 肝, 胃, 大腸經 등에 작용하며, 淸熱濕燥, 淸心除煩, 瀉火解毒 등의 효능이 있어 濕熱下痢, 痞滿, 嘔吐, 心化亢盛, 心煩不寐, 胃火牙痛, 消渴, 吐血下血, 耳目重痛 등의 병을 치료하는데 사용하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 또 황련의 주성분으로는 isoquinoline 계열 alkaloid인 berberin이며 기타 coptisine, epiberberin, feluric acid, magnoflorine, palmatine, worenine 등의 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 특히 황련의 berberin성분은 폐렴쌍구균, 콜레라균, 탄저병균, 과상풍균 및 결핵균 등 다양한 주요 질병균에 강한 항균작용(antimicrobial activity)을 나타내며, 항염증, 지혈, 혈압하강작용, 항암작용 등이 있는 것으로 알려져 있고, 중추신경억제 작용이나 신장염 치료 및 기관지평활근 확장에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁶⁻²⁰⁾

따라서 본 연구는 천황련 추출액의 활성화된 대식세포로부터 LPS 자극에 의해 유도되어지는 NO 생성에 억제효과를 조사함으로써 황련의 항염증효과를 검증하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 추출물 제조

천황련 200g을 80% MeOH로 3시간 전탕한 후 그 여액을 2겹 여과지로 여과하고 회전식 증발기(rotary evaporator)로 감압농축한 후 동결건조하여 -80°C에서 보관하였다. 세포배양액 처리 시 천황련을 3차 증류수로 녹인 천황련 추출물을 cell strainer(0.45 μ m; BD Falcon)로 filter하여 사용하였다.

2. 세포배양

쥐의 뇌 대식세포(murine microglia line)인 BV2 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Mediatech), 100U/mL penicillin(GibcoBRL) 및 streptomycin(GibcoBRL)이 포함된 DMEM (Mediatech) 배지에서, 쥐의 복강(ascites) 대식세포인 RAW264.7 세포는 10% FBS, 100U/mL penicillin과 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3. 세포독성검정

각 세포(5 \times 10⁴ cells/well)를 96-well culture plate(Nunc)에 100 μ l 배지와 함께 24시간 배양한(37°C, 5% CO₂) 후, 여러 농도(0.05~1 mg/ml)의 천황련 추출액을 처리하여

다시 24시간 동안 배양하였다. 여기에 5mg/ml 농도의 MTT 용액(Roche)을 50 μ l 씩 넣고 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, 100 μ l의 solubilization 용액 첨가하여 formazan 결정을 용해하였다. 이를 overnight 배양한 다음 microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 550-600nm에서 흡광도를 측정하고 세포독성 정도는 무처리구 100%를 기준으로 상대적인 cell viability의 퍼센트(%)로 나타내었다.

4. Nitric oxide 생성량 측정

각 세포로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중 존재하는 NO²의 형태를 Griess 시약 반응을 이용하여 측정하였다. 즉, BV2 및 RAW264.7 세포를 1 \times 10⁶cells/ml로 24-well plate에 배양하고 천황련 추출액을 농도별 처리한 다음 30분간 배양하고 1 μ g/ml LPS를 처리하여 세포 활성화를 유도하여 24시간 배양하였다. 세포로부터의 NO 생성은 수거된 세포 배양액 50 μ l에 Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5% H3PO4) 100 μ l를 넣고 15분간 암반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도(μ M)는 NaNO₂ 표준액을 기준으로 측정된 농도를 기준으로 환산하여 계산하였다.

5. iNOS 유전자의 발현

세포로부터 NO의 합성효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 유전자 발현을 조사하기 위해 각 세포(1 \times 10⁶cells/ml)를 6-well plate에 배양하고 천황련 추출물을 농도별(0.05~1 mg/ml)로 30분간 처리하였다. 여기에 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 3시간 동안 배양한 후 세포를 수거하여 5,000rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 수집된 세포들로부터 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 분리하였으며, oligo-(dT) primer와 Improm-IITM reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15min 조건으로 cDNA를 합성하였다. 각 세포의 mRNA로부터 합성된 cDNA 1 μ g에 iNOS primers[Fw; 5'-GACCAGTATAAGGCAAGCAC-3', Rv; 5'-CTTGTCTTTGACCCAGTAGC-3'] 및 10 \times buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 1U Tag polymerase(Takara) 등을 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 60°C에서 30초 및 extension을 위해 70°C에서 60초 조건에서 30 cycles로 PCR을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로

GAPDHs[Fw; 5'-CTCGTGGAGTCTACTGGTGT-3', Rv; 5'-GTCATCATACTTGGCAGGTT-3']를 사용하였다.

6. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균 \pm 평균표준오차 (standard deviation; SD)로 나타내었으며 통계학적 분석은 Student *t-test*로 검정하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

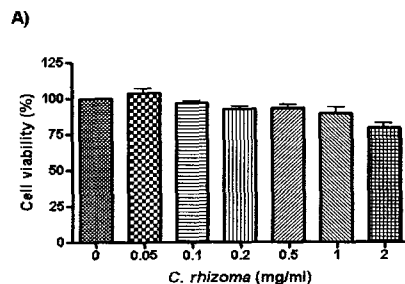
결 과

1. 천황련 추출물의 독성검정

천황련 추출물의 세포독성(cell toxicity)을 조사하기 위해서 BV2 및 RAW264.7 세포에 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1mg/ml의 천황련 추출물을 처리한 후 MTT assay를 수행하였다.

BV 세포의 경우(Fig. 1A), 천황련 추출물 처리에 의한 세포생존도(cell viability; %)는 무처리구 생존율(100%)을 기준으로 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml 및 2mg/ml 농도 처리 시 각각 103.7 \pm 5.59%(mean \pm SD), 97.16 \pm 1.67%, 92.67 \pm 3.15%, 89.39 \pm 7.67% 및 79.33 \pm 5.17%로 측정되었으며, 2mg/ml의 천황련 추출물 농도에서만 무처리구 대비 유의성이 나타났다(*p*<0.05). 한편, RAW264.7 세포에서는(Fig. 1B) 천황련 추출물의 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml 농도처리에서 세포생존도가 각각 96.34 \pm 2.11%, 94.97 \pm 2.87%, 91.94 \pm 1.11%, 88.49 \pm 3.92%, 80.50 \pm 0.53 및 73.92 \pm 4.65%로 나타났으며, 0.5mg/ml, 1mg/ml 및 2mg/ml의 천황련 추출물 농도에서 무처리구와 비교하여 유의성이 나타났다(*p*<0.05).

따라서 천황련 추출물은 BV2 및 RAW264.7 대식 세포에서 모두 천황련 추출물 1mg/ml 농도까지 80% 이상의 세포생존도를 나타내어 독성이 없는 것으로 나타났다.



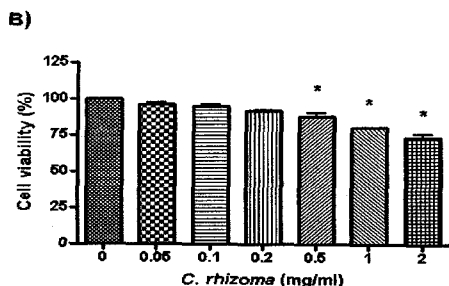


Fig. 1. Cell cytotoxicity of *Coptidis rhizoma* extract in BV2(A) and RAW264.7(B) cells. After cells(5×10^4 cells/well) were cultured with various concentrations of *Coptidis rhizoma* extract with LPS for 24h, cell viability was measured in the culture supernatants by MTT assay. The results show mean value of three independent experiments(SD = bars). * $p < 0.05$ vs. LPS-treated group, n=3.

2. 천황련 추출물에 의한 NO 생성 억제효과

천황련 추출물이 LPS로 유도된 NO 생성억제에 미치는 영향을 조사하기 위해서 천황련 추출물을 세포에 처리한 다음, LPS에 의해 활성화된 세포로부터 생성되는 NO의 양을 Griess reagent로 측정하였다.

BV2 세포의 경우 무처리 대조구(control)에서는 NO의 생성이 $0.41 \pm 0.41 \mu\text{M}$ 로 거의 검출되지 않은 반면, LPS 처리가 세포를 활성화시킴으로써 $35.61 \pm 2.14 \mu\text{M}$ 농도로 NO 생성이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 이는 0.05 mg/ml , 0.1 mg/ml , 0.2 mg/ml , 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml 농도의 천황련 추출물 처리에 의해 각각 $34.27 \pm 4.94 \mu\text{M}$, $34.74 \pm 1.72 \mu\text{M}$, $29.24 \pm 0.94 \mu\text{M}$, $25.35 \pm 1.54 \mu\text{M}$ 및 $22.17 \pm 1.97 \mu\text{M}$ 농도로 NO가 검출되었으며, LPS에 의해 유도된 NO가 천황련 추출물 처리농도에 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다.

한편, RAW264.7 세포의 경우(Fig. 2B)에 BV2 세포에서와 마찬가지로 대조구에서는 NO가 검출되지 않았으며($1.32 \pm 0.01 \mu\text{M}$) LPS 처리에 의해 현저히 증가하였다($21.49 \pm 0.04 \mu\text{M}$). 또한 천황련 추출물 처리농도 0.05 mg/ml , 0.1 mg/ml , 0.2 mg/ml , 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml 에서 $20.91 \pm 0.02 \mu\text{M}$, $16.49 \pm 5.02 \mu\text{M}$, $14.79 \pm 0.03 \mu\text{M}$, $10.81 \pm 0.11 \mu\text{M}$ 및 $8.39 \pm 2.16 \mu\text{M}$ 농도의 NO가 검출되었다. 이를 통해 LPS 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 세포로부터 분비되는 NO는 천황련 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되어짐을 알 수 있었다.

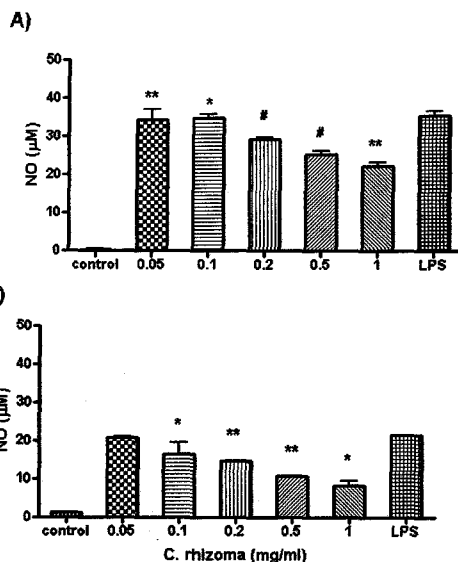


Fig. 2. Inhibitory effect of *Coptidis rhizoma* on LPS-induced nitric oxide production from BV2(A) and RAW264.7(B) cells. Cells(5×10^5 cells/ml) were incubated with various concentrations of *Coptidis rhizoma* in the presence of LPS($1 \mu\text{g/ml}$) for 24h. NO production from cells was determined in culture supernatant by Griess reagent. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ vs. LPS-treated group, n=3.

3. 천황련 추출물에 의한 TNF-α 생성 억제효과

천황련 추출물이 LPS로 유도되는 TNF-α의 생성을 억제시키는 지 조사하기 위해서 여러 농도의천황련 추출물을 BV2 및 RAW264.7 세포에 각각 처리한 다음, LPS에 의해 활성화된 세포로부터 생성되는 TNF-α의 양을 세포배양액으로부터 ELISA로 측정하였다(Fig. 3).

BV2 세포에서는(Fig. 3A) 무처구에서 TNF-α 생성($2.29 \pm 0.09 \text{ pg/ml}$)이 매우 낮은 반면, LPS 자극 후 세포가 활성화됨으로써 TNF-α 생성이 현저히 증가하였다($26.66 \pm 0.29 \text{ pg/ml}$). 이렇게 LPS에 의해 유도된 TNF-α의 생성은 천황련 추출물을 0.05 mg/ml , 0.1 mg/ml , 0.2 mg/ml , 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml 농도로 처리하였을 경우, 각각 $22.72 \pm 0.28 \text{ pg/ml}$, $19.93 \pm 0.55 \text{ pg/ml}$, $18.77 \pm 0.16 \text{ pg/ml}$, $19.01 \pm 0.19 \text{ pg/ml}$ 및 $7.97 \pm 1.62 \text{ pg/ml}$ 로 검출되어, 천황련 추출물 처리농도 1 mg/ml 에서 TNF-α 생성이 현저히 억제되는 것으로 나타났다.

RAW264.7 세포(Fig. 3B)의 경우에도 BV2 세포에서와 유사하게 무처리구($2.29 \pm 0.09 \text{ pg/ml}$)에서는

TNF- α 가 거의 검출되지 않은 반면, LPS 처리구 (45.67 \pm 3.19 pg/ml)에서 증가되었으며, 천황련 추출물 처리농도 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.5mg/ml 및 1 mg/ml에서 각각 43.71 \pm 3.05 pg/ml, 42.32 \pm 3.27 pg/ml, 37.99 \pm 2.28 pg/ml, 32.60 \pm 0.95 pg/ml 및 16.75 \pm 3.24 pg/ml의 TNF- α 농도가 검출되어 LPS 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 세포로부터 분비되는 TNF- α 가 천황련 추출물 처리에 의해 유의적으로 억제됨을 알 수 있었다.

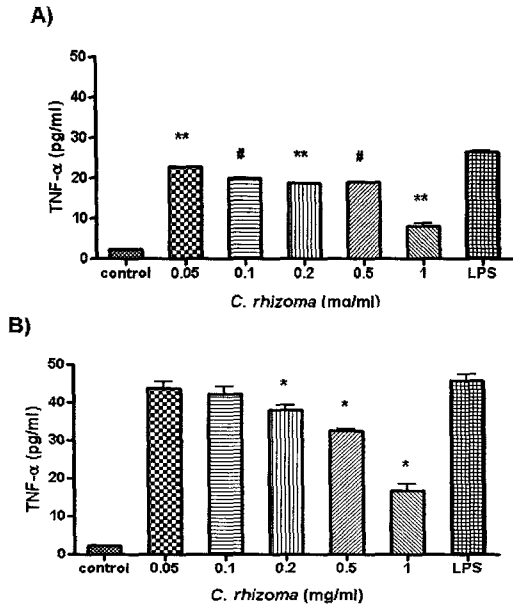


Fig. 3. Inhibitory effect of *Coptidis rhuzoma* on LPS-induced TNF- α production from BV2(A) and RAW264.7(B) cells. Cells(5×10^5 cells/ml) were incubated with various concentrations of *Coptidis rhuzoma* extract in the presence of LPS(1 μ g/ml) for 24h. TNF- α production from cells was determined in culture supernatant by ELISA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and # $p < 0.0001$ vs. LPS-treated group, n=3.

4. 천황련 추출물의 iNOS mRNA 발현 억제효과

LPS에 의해 유도된 iNOS의 mRNA 발현에 대한 천황련 추출물 효과를 조사하기 위하여 BV2 및 RAW264.7 세포에 1mg/ml 농도의 천황련 추출물과 LPS를 처리한 다음 각 세포로부터 mRNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 4).

BV2(Fig. 4A) 및 RAW264.7(Fig. 4B) 세포 모두 iNOS 유전자의 발현이 무처리구에서는 관찰되지 않

았으며, LPS 처리에 의해 증가하였다. 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS 유전자 발현이 1mg/ml 농도의 천황련 추출물 처리에 의해 억제되는 것으로 나타났다.

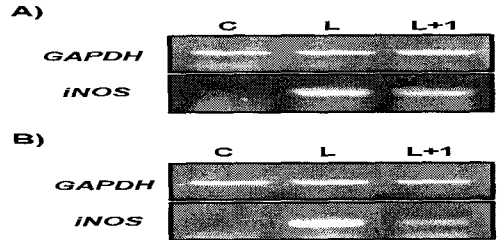


Fig. 4. Inhibitory effect of *Coptidis rhuzoma* on mRNA expression of iNOS in BV2(A) and RAW264.7(B) cells. Cell were incubated with each concentration of *Coptidis rhuzoma* extract at the presence of LPS for 3h. mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR.

고찰

대식세포는 동물체내의 모든 조직에 존재하는 면역세포로서 외부 이물질을 포식하고 탐식하여 죽은 세포를 제거하는 고전적인 기능 외에 TNF- α , IL-1 등의 염증사이토카인이나 eicosanoids, ROS, NO, superoxide(O $_2^-$) 등의 염증물질을 다량 분비함으로써 병 발달에 기여한다^{6,9,29}. NO는 대식세포 및 간세포 (hepatocyte)에서 L-arginine으로부터 iNOS에 의해 합성되는데, 특히 LPS나 interferon-gamma(IFN- γ) 등의 자극으로 활성화된 대식세포로부터 NO의 과도한 생성은 세포독성과 염증반응을 유발함으로써 다양한 만성염증성질환 발달에 기여한다^{22,23}. 따라서 최근에는 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO 생성을 효과적으로 억제하는 억제제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며 다양한 염증질환의 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다²⁴⁻²⁶.

황련은 민가에서 설사나 위열로 인한 구토에 효과적이며 해열과 해독작용이 뛰어난 약제로 알려져 있으며 특히 황련의 berberin 성분이 장내 번식하는 세균이나 진균 감염에 강한 항균작용을 나타내어 장내 대장균의 가스 생성을 억제시키고 발효작용을 개선시키는 것으로 알려져 있다^{5,16}. 황련추출물과 관련된 최근 연구 동향은 황련추출물이 NO를 효과적으로 제거할 수 있으며^{13,16}, 치아우식증을 유발하는 *Streptococcus mutans*의 생장과 균체부착 등을 억제하고²⁷ 저장과실에 처리 시 품질저하를 최소화시키며²⁸, 천식세포상피 모델에서 천식의 염증반응에 중요한

사이토카인인 IL-6, IL-16 및 granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) 유전자의 발현을 억제하는데 효과적이며¹⁸⁾ 식중독을 유발하는 세균 증식에 대해 강력한 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다²⁴⁾.

따라서 본 연구는 BV2 및 RAW264.7 대식세포에 천황련 추출물을 처리함으로써 LPS에 의해 생성되는 NO 및 TNF- α 에 대한 억제효과를 조사하고자 수행되었으며, 천황련 추출물의 항염증효과를 확인하였다.

천황련 추출물에 의한 NO 제거효과는 1mg/ml 농도의 천황련 추출물을 세포에 처리하였을 때, 가장 높게 나타났으며, LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 3배 이상 감소시킨 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 천황련 추출물이 NO 합성효소인 iNOS의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 천황련 추출물 처리는 두 종류 세포 모두에서 LPS에 의해 유도된 iNOS 유전자 발현을 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서 천황련 추출물이 LPS에 의해 유도되는 iNOS 유전자의 발현을 억제시킴으로서 iNOS 생성을 억제하고 NO 생성을 효과적으로 감소시키는 것으로 보인다. 활성산소종의 일종인 NO는 L-arginine으로부터 NO 합성경로(NO synthase pathway; NOS)를 통하여 생성되는 작은 분자량(short-lived)의 자유라디칼로서 세포내 항상성의 유지, 신경전달물질의 운반(neurotransmission), 항암작용(antitumor activity) 및 세포독성 등에 관여하는 세포신호전달자로서 매우 중요한 역할을 한다⁴⁾. NO는 LPS나 IFN- γ , TNF- α 또는 β -amyloid 등의 자극원에 의해 대식세포로부터 NO 합성효소인 iNOS가 합성되고, NO free radical이 산소와 반응함으로써 peroxynitrite(ONOO-)를 형성하여 pro-oxidant molecule인 NO가 다량 생성되어 강력한 세포독성을 나타내게 된다^{25,29)}. 다양한 자극원들 중 특히 LPS에 의해 활성화된 대식세포의 경우 LPS 신호전달경로를 통해 NF- κ B가 활성화되고 iNOS mRNA 발현이 유도되어 iNOS 합성경로에 의존적으로 NO가 생성되게 된다^{24,30)}. 본 연구결과에서 천황련 추출물은 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 iNOS 유전자 발현을 효과적으로 감소시킴으로서 NO 생성이 억제되어질 수 있는 것으로 나타났다. NO는 전염증성(pro-inflammation) 또는 항염증성(anti-inflammation) 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 NO 생성은 오히려 세포를 파괴하고 shock에 의한 혈관확장 및 염증반응을 촉진하여 조직에 독성으로 작용하여 손상을 유발하게 된다. 따라서 iNOS 발현을 차단함으로써 NO 생성을

억제시킬 수 있는 천황련 추출물이 다양한 염증성 질환치료에 효과적일 수 있음을 알 수 있었다. 비록 천연물의 iNOS 생성에 대한 cellular mechanism이 정확히 밝혀져 있지는 않지만, NO 생성을 억제하는 약물의 경우 전처리가 iNOS promoter activity를 억제하거나 iNOS 유전자의 전사(transcription)를 억제하는 것으로 알려져 있다³¹⁾.

한편, bacterial endotoxin인 LPS는 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF)와 관련하여 강력한 염증반응을 유도하는 물질로서 TNF- α 를 포함한 다양한 전염증사이토카인 분비를 통해 대식세포는 LPS에 대한 면역반응을 하게 된다³²⁾. TNF- α 는 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 다량 분비되어 패혈증(septic shock)이나 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에서 병 발달에 매우 중요한 역할을 하는 사이토카인이며, TNF- α 의 증가는 암, 악액질(cachexia), 당뇨, 비만 등 대사성질환에서 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다^{32,33)}. 최근에는 대식세포의 LPS 인식기전의 이해 및 염증유발 관련 유전자의 발굴, 나아가 이들의 조절을 통한 염증질환 치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 과도하게 분비되는 TNF- α 를 효과적으로 억제시킬 수 있는 약제 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다^{32,33)}. 본 연구결과에서 천황련추출액은 BV2 및 RAW264.7 세포에서 모두 LPS에 의해 유도된 TNF- α 생성을 유의적으로 감소시켰으며, RAW264.7 세포의 경우 천황련추출물 처리 농도에 의존하여 TNF- α 생성이 억제되었다(Fig. 3). TNF- α 억제효과를 지니는 특정약물의 분자생물학적 작용기전은 일반적으로 TLRs(toll-like receptors)를 통한 LPS 인식과 PI3-kinase/Ark, ERK1/2, JUK, p38 등의 MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 및 NF- κ B 활성화와 연관되는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 또한 특정약물에 의한 NO 생성의 억제효과는 주로 ROS 제거와 연관되는데, ROS역시 MAPKs 및 nuclear transcription factors c-Jun 및 NF- κ B 등을 활성화 시킨다^{34,36)}. ROS 신호전달경로는 대식세포 활성화의 일반적인 경로로서 세포독성의 매개 및 신호전달자로서의 기능을 모두 나타낸다. 따라서 TNF- α 및 NO 생성을 억제하는 천황련 추출물의 항염증 효과 역시 대식세포에서 LPS 자극과 연관되는 MAPKs, NF- κ B 및 ROS 등의 신호전달경로를 차단함으로써 TNF- α 및 iNOS 유전자의 발현을 억제시키는 것과 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다. 결론적으로 본 연구를 통해 천황련 추출물이

TNF- α 와 같은 전염증사이토카인 및 NO의 과도한 생성을 효과적으로 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타내며, 이런 천황련 추출물은 단독 또는 기타 약제와의 혼합을 통해 차후 다양한 염증성 질환을 개선하기 위한 치료제로 개발 가능할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 만성 염증성 질환 치료를 위한 항염증 한약제를 개발하기 위해서 BV2 및 RAW264.7 두 종류의 대식세포주를 이용하여 천황련 추출물의 항염증효과를 조사하였다. 천황련 추출물의 세포독성은 두 세포 모두에서 1mg/ml 농도까지 나타나지 않았으며, LPS에 의해 유도된 NO 및 TNF- α 의 생성은 천황련 추출물 처리에 의해 유의적으로 감소되었다. 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS 유전자 발현이 두 세포 모두에서 천황련 추출물 처리에 의해 억제되었다. 따라서 LPS로 유도되는 NO 및 TNF- α 의 생성을 효과적으로 억제시킴으로써 항염증효과를 보이는 천황련 추출물은 앞으로 염증성질환 치료를 위한 약제로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 연구비 지원(과제번호: B050024) 및 동국대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Report* 2000;2:216-224.
2. Murabe Y, Sano Y. Morphological studies on neuralgia. VI. Postnatal development of microglia cells. *Cell Tissue Res.* 1982;225:469-485.
3. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8514-9.

4. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
5. Meme W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J.* 2006;20:494-6.
6. Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM Jr, Brachova L, Yan SD, Walker DG, Shen Y, Rogers J. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 2001;35:72-9.
7. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke.* 1997;28:1233-44.
8. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 1992;587:250-6.
9. 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 beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:301-9.
10. 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.* 2000;35:21-8.
11. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, Chung HT. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:59-64.
12. Kamiyama H, Takano S, Ishikawa E, Tsuboi K, Matsumura A. Anti-angiogenic and immunomodulatory effect of the herbal medicine

- "Juzen-taiho-to" on malignant glioma. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:2111-6.
13. Kim YJ, Park JW, Lee MJ, Kim JK and Cho DY. Nitrite scavenging activity of water-extract from *Scutellaria baicalensis* Georgia and *Coptis chinensis* Franch. *J. Oriental Med. Pathol.* 2000;14:108-118.
 14. Bae JH. Antimicrobial effect of *Plagiorhegama dubium* extracts on food-borne pathogen. *Korean J. Food & Nutr.* 2005;18:81-87.
 15. Sin KH, An DK, Woo ER, Park HK, Lee JS and Yun WS. A study on the extracion efficiency of berberine in *Coptidis rhizoma*. *J. Kor. Analytical Sci.* 1997;10:83-91.
 16. An BJ, Lee JT, Lee CE, Kim JH, Son JH, Kwak JH, Lee JY, Park TS, Bae HJ, Jang MJ and Jo C. A study on physiological activities of *Coptidis rhizoma* and application for cosmetic ingredients. *Kor. J. Herbalogy.* 2005;20:83-91.
 17. Chun SC, Jee S. and Lee S. The antimicrobial activity of *Naesohwangryuntang* and its composition oriental medicines. *Kor. J. Herbalogy* 2004;19:51-60.
 18. Kim DI, Jung HJ, Jung SK and Lee HG. The inhibitory effects of *schzandrae fructus* and *coptidis rhizoma* on the IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level of BEAS-2B human epithelial cells. *K.H.M.* 2001;17:199-213.
 19. Yamahara J. Central depressive action of *Coptidis rhizoma* and its constituents. *Nipp. Yaku. Zas.* 1976;72:899-908.
 20. Hattori T, Furuta K, Nagao T, Nagamatsu T, Ito T and Shzuki Y. Studies on the antinephritic effect of plant components(4): Reduction of protein excretion by berberine and coptisine in rats with original-type anti-GMB nephritis. *Jpn J. Pharmacol.* 1992;59:156-169.
 21. Merrill JE. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev. Neurosci.* 1992;14:1-10.
 22. S.B. Abramson, M. Attur, A.R. Amin and R. Clancy, Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis, *Curr Rheumatol Resp* 2001;3:535 - 564.
 23. G.C. Brown, Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase, *FEBS Lett* 1995;693:136 - 139.
 24. E. Moilanen, B. Whittle and S. Moncada, Nitric oxide as a factor in inflammation. In: J.I. Gallin and R. Snyderman, Editors, *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, Williams and Wilkins, Philadelphia. 1999:787 - 800.
 25. A. Hobbs, A. Higgs and S. Moncada, Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191 - 220.
 26. L. Sautebin, Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy, *Fitoterapia.* 2000;71:S48 - S57.
 27. Jang GH, An BY, Oh SH, Choi DS and Kwon YJ. Anticariogenic effects of *Coptis chinensis* Franch Extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 2000;32:1396-1402.
 28. Cho SH, Park UP and Jung SK. Changes in the keeping quality of strawberry and cucumber treated with Korean medical herb extracts. *Kor. J. Gerontol.* 2000;7:145-150.
 29. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
 30. S. Moncada, R.M. Palmer and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol Rev.* 1991;43:109 - 142.
 31. H. Kleinert, C. Euchenhofer, I. Ihrig-Biedert and U. Forstermann, Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kB, *Mol Pharmacol.* 1996;49:15 - 21.
 32. Guha M and Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling* 2001;13:85-94.
 33. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 1998;273:974-80.
 34. Witkamp R, Monshouwer M. Signal

transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q.* 2000;22:11-6.

35. Jhun BS, Jin Q, Oh YT, Kim SS, Kong Y, Cho YH, Ha J, Baik HH, and Kang I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses LPS-induced TNF- α production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/A γ activation in RAW264.7 murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;318:372-380.