

원 지

## 樺皮의 抗炎 效果에 關한 研究

유미현, 박은경, 김영훈, 이연아<sup>1)</sup>, 이상훈<sup>1)</sup>, 양형인<sup>1)</sup>, 홍승재<sup>4)</sup>, 백용현<sup>3)</sup>, 박동석<sup>3)</sup>, 한정수<sup>2)</sup>, 유명철<sup>2)</sup>, 김경수  
경희대학교 동서 골관절연구원, 경희대학교 의과대학 내과학교실<sup>1)</sup>, 경희대학교 의과대학 정형외과학교실<sup>2)</sup>  
경희대학교 한의과대학 침구학교실<sup>3)</sup>  
포천중문의과대학 류마티스내과학교실<sup>4)</sup>

### Anti-inflammatory Effects of an Ethanolic Extract from *Betula Platyphylla*

Mi-Hyun Ryu, Eun-Kyung Park, Young-Hoon Kim, Yeon-Ah Lee<sup>1)</sup>, Sang-Hoon Lee<sup>1)</sup>,  
Seung-Jae Hong<sup>4)</sup>, Yong-Hyeon Baek<sup>3)</sup>, Dong-Suk Park<sup>3)</sup>, Jung-Soo Han<sup>2)</sup>,  
Myung-Chul Yoo<sup>2)</sup>, Hyung-In Yang<sup>1)</sup>, Kyoung-Soo Kim

East-West Bone & Joint Research Center, Dept. of Internal Medicine<sup>1)</sup>, Dept. of Orthopedic Surgery<sup>2)</sup>, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Dept. of Internal Medicine, College of Medicine, Pochon CHA University, Pochon<sup>3)</sup>, South Korea

**Objectives :** *Betula Platyphylla* (BP) is a traditional analgesic, anti-fungal, anti-inflammatory herb used in Chinese medicine. However, no information is available to explain its action. In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of BP to elucidate the molecular pharmacological activity in the ethanol extract of BP(BPE).

**Methods :** We performed MTS assay in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW264.7 macrophages with BPE. Nitrite was measured by Griess assay, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in LPS induced RAW264.7 macrophages with BPE. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2) were determined by Western blot. Activation of nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

**Results :** BPE significantly suppressed production of nitric oxide (NO) and PGE<sub>2</sub> in LPS-induced RAW264.7 macrophages in a dose-dependent manner. The maximal inhibition rate of NO and PGE<sub>2</sub> production by BPE was ca. 88.8% and 93% at the concentration of 100  $\mu$ g/ml (non-cytotoxic concentration), respectively. BPE also decreased iNOS protein and COX-2 protein in LPS-induced RAW264.7 macrophages. EMSA demonstrated that BPE inhibited the DNA binding activity of the NF- $\kappa$ B.

**Conclusions :** These results suggest that BPE inhibits NF- $\kappa$ B-mediated gene expression and downregulates inflammatory mediator production in RAW264.7 macrophages.

**Key Words:** *Betula Platyphylla*, anti-inflammatory effect

## 緒 論

- 접수 : 2006년 2월 8일 · 논문심사 : 2006년 2월 12일
- 채택 : 2006년 2월 22일
- 교신저자 : 김경수, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 동서 골관절연구원 (Tel : 02-958-9042, Fax : 02-958-9043, Email: labrea46@yahoo.co.kr)
- 본 논문은 보건복지부 특정센터연구의 지원에 의하여 연구되었음(사업명 : 한방치료기술 연구개발사업, 고유번호 : B030008).

樺皮 (*Betula Platyphylla*)는 자작나무과에 속한 자작나무 및 만주자작나무의 껍질(樺木皮 내엽)로 다른 이름은 樺桃 라고 한다<sup>1)</sup>. 자작나무는 落葉喬木으로 樹高 20m에 달하고 水平的으로는 한국의 강원도, 평안북도, 함경도에 자라며 垂直的으로는 標高

200~2100m에서 자라는 寒帶樹種으로 중심分布地는 標高 800m가 되며 地理的으로는 일본, 중국에 分布한다<sup>2)</sup>. 자작나무의 樹皮에는 betulin이 약 35%, 각종 高級脂肪酸이 약 35% 이상이며, tannin이 약 7%가 함유되어 있다. 잎에는 betulafolientriol 0.25%, betulafolientetraol<sup>3)</sup> 등의 triterpenoid를 함유되어 있고 그 밖에 dammaran type triterpenoid도 있고 tannin이 5.19%가 함유되어 있으며, 만주자작나무의 樹皮에는 betulin이 약 23% 함유되어 있다고 한다<sup>2)</sup>. 樺皮의 性味는 苦寒하고, 淸熱利濕 作用으로 이질, 설사, 황달, 신장염에 쓰이며, 祛痰止咳 作用으로 폐의 熱로 인한 해수나 오래된 기침에 쓰이고, 또한 消腫解毒 作用이 있어 급성편도선염, 急性乳腺炎, 癰腫, 화상 등에 이용한다<sup>1)</sup>. 樺皮에 대한 연구로는 Yomata M. 등<sup>4)</sup>이 抗 菌 性 作 用 을, Matsuda H. 등<sup>5)</sup>이 hepatoprotective, superoxide 제거, 그리고 抗酸化 作用을, 주 등<sup>6)</sup>이 抗酸化와 抗癌 作用을 보고하였다. 이러한 연구 자료를 토대로 樺皮는 炎症性 질환 치료제로서의 개발 가능성을 확인할 수 있다.

炎症반응은 상처나 감염에 대한 생체의 방어 작용으로 血管的, 細胞的 反應의 연속으로 나타나며, 조직 변질, 순환 장애와 滲出, 조직 증식의 3가지를 병발하는 복잡한 병변이다. macrophages의 활성화는 이러한 생체 방어 작용의 초기과정으로 상처부위로 모여들어 침입한 세균을 공격한다. 이때 활성화된 macrophages는 침입한 세균에 대한 免疫 보호 작용으로 nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)와 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12, 그리고 다른 전 炎症性 사이토카인 (proinflammatory cytokines)을 방출한다<sup>7)</sup>. 이런 炎症性 매개체의 방출은 감염에 대한 생체 생존 뿐만 아니라 상해된 조직을 치료하는데 반드시 필요하다<sup>8,9)</sup>. 그러나 이러한 이로운 영향과는 달리, 炎症性 매개체가 과량 생산되면, 정상 細胞에 2차적인 피해를 주고 과도한 免疫반응을 야기시키며 각종 炎症性 질환을 유발시키고 악화시키게 된다<sup>8,10,11)</sup>. 체내 炎症 발현의 주요인자로서 NO 및 프로스타글란딘 (prostaglandins, PGs)류의 역할이 현재 대두되고 있

다. NO는 혈관 확장 및 조직 손상에 주로 관여하고, PGE<sub>2</sub>는 痛症과 發熱의 전달에 주로 관여하는 중요한 炎症性 매개체로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 炎症性 매개체의 과발현을 저해시키는 것이 약 개발의 중요한 치료 목표이다.

만성 炎症性 질환의 병태생리는 복잡하지만 각종 炎症을 매개하는 물질을 합성하도록 유도하는 전사 인자의 활성이 필수적이다. 여러 가지 전사인자 중에서 nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B)가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NF- $\kappa$ B는 炎症 반응, 免疫 반응 등에 광범위하게 작용하는 전사 인자<sup>13,14)</sup>로 특정 細胞의 유전자 발현에 관여한다. NF- $\kappa$ B는 LPS<sup>15)</sup>, cytokine<sup>16,17)</sup>, UV irradiation, growth factor, oxygen free radical, oxidative stress<sup>18)</sup>와 viral infection 등의 자극에 의해 활성화된다. 정상적으로 NF- $\kappa$ B는 내피細胞와 백혈구 등 여러 細胞의 細胞質에 있는 inhibitory kappa B (I $\kappa$ B) 단백질과 결합되어 있다. NF- $\kappa$ B가 자극을 받았을 때 NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B 복합체는 인산화되고 I $\kappa$ B 단백질은 해리되어 비활성화되며 NF- $\kappa$ B는 핵 내로 이동하여<sup>19)</sup> 유전자발현의 조절부위에 결합한 후 여러 炎症性 매개체의 유전자발현을 유도한다<sup>13)</sup>. 여러 炎症 매개체로는 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 암호화하는 유전자<sup>20)</sup>뿐만 아니라, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8과 TNF- $\alpha$  등 과 같은 炎症性 사이토카인의 전사<sup>14)</sup>가 있다.

본 연구는 樺皮의 에탄올 추출물의 抗炎 메커니즘을 詳細하고자 LPS로 활성화된 마우스 macrophage 세포주인 RAW264.7을 이용하였다. 최근 대두되고 있는 炎症性 매개체인 NO의 생성량과 PGE<sub>2</sub> 분비량을 細胞 배양 상층액으로부터 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)기법으로 측정하였고, iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 western blot으로 확인하였다. 또한, 樺皮가 LPS에 의한 macrophage의 activation signaling의 최종 단계에서 transcription factor의 비활성화에 관여할 것으로 보고, electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 통하여 樺皮가 NF- $\kappa$ B의 activity를 감소시킴을 확인하였다. 樺皮는 NF- $\kappa$ B

의 활성화를 차단함으로써, iNOS, COX-2, NO, PGE<sub>2</sub> 등 炎症性 매개물의 발현 및 生成을 억제하는 抗炎 효과를 가지는 것을 처음으로 본 저자들 보고한다.

## 材料 및 方法

### 1. 樺皮 抽出物의 製作

약재는 경희대학교 한의과대학 부속한방병원에 서 구입하였다. 樺皮 100 g을 50% 에탄올에 16시간 환류추출하고 여과하였다. 잔사를 다시 50% 에탄올로 추출하고 이 조작을 4번 반복하여 모든 여액을 감압농축기로 감압농축한 후, 이를 凍結 乾燥하여 樺皮 에탄올 추출물 12.1g (수율 12.1%)을 얻어 dimethylsulfoxide (DMSO)로 200 mg/ml로 용해하여 RAW264.7 macrophages에서의 처리는 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 하였다.

### 2. RAW264.7 macrophage 細胞주 培養

마우스 대식細胞인 RAW264.7 macrophage 細胞주를 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin과 100 mg/ml streptomycin 이 첨가된 DMEM 배지에 현탁하여 24 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well의 농도로 분주하였다. 이를 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 2시간 후에 부착되지 않은 細胞를 제거한 후 serum의 영향을 없애기 위하여 serum-free DME medium을 넣은 후, 각 well에 樺皮을 농도별로 처리하고 30분 후 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하여 24시간 또는 72시간 동안 배양하였다.

### 3. 樺皮 처리후 細胞의 生存能 測定

樺皮에 의한 RAW264.7 macrophages의 生存能을 microculture system에서 조사하였다. 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에 RAW264.7 macrophages를 96 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주한 후, LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였으며, 대조군은 배지만을 첨가하였다. 樺皮는 1, 10, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리하였고, 이를 72시간동안 배양한 후, CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay kit (3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt: MTS, Promega)를 이용하여 細胞 독성을 측정하였다. 20  $\mu\text{l}$ 의 MTS/PMA 용액을 96 well plate에 첨가하고 37°C에서 2~3시간 배양한 후 490 nm 파장에서 흡광도를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 판독기 (Molecular Devices, Menlo Park, CA)로 정량적으로 측정하였다.

### 4. nitric oxide 生成量 測定

RAW264.7 macrophages를 24시간 배양한 후 배양 상층액에서 nitric oxide (NO)양을 Griess 법으로 측정하였다. 배지 100  $\mu\text{l}$  와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthylethylene diamine 2HCl + 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plate에 분주하고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. NaNO<sub>2</sub>를 표준으로 檢量선을 작성하여 樺皮를 처리한 배양액 중 NO 生成량을 구하였다.

### 5. PGE<sub>2</sub> 測定

RAW264.7 macrophages를 24시간 배양한 후 배양 상층액을 취하여 유리된 PGE<sub>2</sub> 양을 ELSIA로 측정하였다. 재조합 PGE<sub>2</sub> (R&D systems)를 배양액으로 희석하여 計測 標準 항원 (calibration standard)으로 사용하였다.

### 6. Western blot

RAW264.7 macrophages를 6 well plate에  $5 \times 10^6$  cells/well의 농도로 분주한 후 24시간 배양하였고, 이를 PBS로 세척한 후 PRO-PREPTM Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, INC.)을 사용하여 단백질을 분리하였다. 12.5% 폴리아크릴아마이드 겔 (SDS-PAGE) 상에서 lane 당 10  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 단위체별로 분리하였고, Hybond ECL nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia)에 轉移시킨 후 막을 1시간 동안 5% skimmed milk에 처리하여 비특이적 반응을 제거하였다. anti-iNOS 또는 anti-COX-1, anti-COX-2 그리고 anti-beta-actin 단일 클론 항체를

이용하여 iNOS, COX-1, COX-2와 beta-actin을 검출하였으며, 免疫반응 밴드는 ECL-plus detection system (Amersham Pharmacia)를 이용하여 확인하였다.

### 7. 핵 단백질의 추출

RAW264.7 macrophage를 60mm<sup>2</sup> dish에  $1 \times 10^7$  cells을 분주한 후 樺皮를 농도별로 30분간 처리하고 LPS를 첨가하여 30분간 배양한다. 이를 PBS으로 세척한 다음, 細胞를 분리하고, 저장성 완충액(10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), 10 mM potassium chloride (KCl), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1  $\mu$ M leupeptin와 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))을 사용하여 20분간 細胞를 부풀어 오르게 한 뒤, 핵을 손상시키지 않고 細胞막만을 파괴시켰다. 원심분리(12,000g, 1min)하여 고장성 완충액 (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM sodium chloride (NaCl), 0.2mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.5mM DTT, 1  $\mu$ M leupeptin와 0.2 mM PMSF)을 사용하여 핵 내의 단백질들을 추출해 내었다. 추출된 핵 단백을 나머지 핵과 원심분리 (10,000g, 20min)하여 분리한 후, 단백질의 농도를 측정하고 -70°C에 보관하였다.

### 8. electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NF- $\kappa$ B 결합 부위의 염기서열을 가진 oligonucleotide (ODN) 5' -AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3' (Promega Corp., WI, USA)을 T4 polynucleotide kinase (GIBCO, NY, USA)를 이용하여 동위 원소 표지자인 [<sup>32</sup>P] dATP (Amersham, Piscataway, NJ, USA)로 표지하였다. Bio-Rad사의 정제 컬럼 (Quick spin column : Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 결합되지 않은 [32P] dATP를 정제한 뒤 [<sup>32</sup>P] dATP가 표지된 프루브를 버퍼에 수집하였다. 32P-dATP가 표지된 프루브를 만들어 추출된 핵단백질 (10 $\mu$ g)을 0.02  $\mu$ g/L poly (dIdC) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA), 20 mM HEPES (pH 7.9), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM

EDTA, 1 mM DTT과 4% glycerol이 포함된 5  $\mu$ l의 용액에서 섞은 후 실온에서 20~30분간 배양하여 6% polyacrylamide gel과 0.25X Tris-borate EDTA (TBE) 버퍼에서 30 mV로 3~4시간 전기영동을 하였다. 전기영동 후에는 젤을 80°C에서 건조시켜 암실 -70°C 조건에서 72시간 동안 방사선 필름에 노출시켰다. 樺皮를 30분간 처리한 후 LPS로 30분간 활성화 시킨 RAW264.7 細胞주에서 NF- $\kappa$ B의 활성도를 측정하였다.

### 9. 統計 處理

結果는 平均과 標準偏差로 표시하였다. 집단간의 평균값 비교는 SigmaStat version 3.0 프로그램을 이용하여 ANOVA test를 실시하였고, 有意성 확인은 Dunnett's test의 통계기법을 사용하였고, 처리된 결과가  $p < 0.05$ 일 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

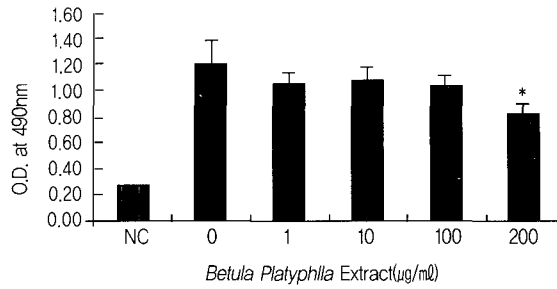
## 結 果

### 1. RAW264.7 macrophage의 生存에 미치는 영향

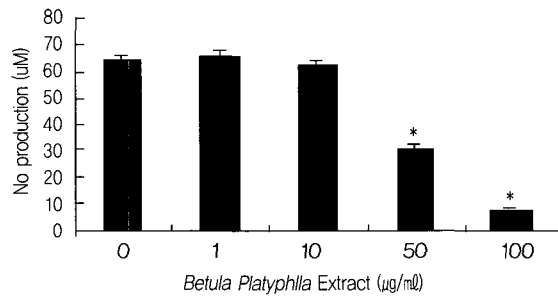
실험에 사용될 적절한 樺皮 농도를 결정하고자, 樺皮의 세포독성을 조사하였다. RAW264.7 macrophage에 대한 樺皮의 細胞 독성을 MTS kit를 이용하여 실시하였다. 樺皮 10, 100  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 LPS로 자극된 RAW264.7 macrophage의 生存은 비처리군에 비해 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 樺皮 200  $\mu$ g/ml 처리군은 비처리군에 비해 통계적으로 유의하게 나타났으며 細胞 생존율이  $70 \pm 6.3\%$  이상으로 약간의 細胞 독성을 일으키는 농도로 확인되었기에 다음의 실험들에서 樺皮의 최고 농도를 100  $\mu$ g/ml로 정하였다(Fig. 1).

### 2. RAW264.7 macrophages의 nitric oxide 生成에 미치는 영향

먼저, 樺皮가 炎症을 일으키는 mediator의 하나인 NO의 생성을 억제하는지 murine macrophage RAW264.7 cell line을 통해서 조사하였다. RAW264.7



**Fig. 1.** Effects of BPE on cell viability in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Cell viability was measured by MTS assay. RAW264.7 macrophages were adjusted to  $2 \times 10^5$  cells/well in 96 well plate. The cells were pretreated with 0, 1, 10, 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$  of BPE 30 min before LPS treatment ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours. Each value represents a mean  $\pm$  SD. (\*:  $p < 0.05$  versus cell treated with BPE  $0 \mu\text{g/ml}$ , NC : negative control).



**Fig. 2.** Effects of BPE on nitrite formation in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Nitrite formation was measured by the Griess reaction. RAW264.7 macrophages were adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/well in 24 well plate. The cells were pretreated with 0, 1, 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  of BPE 30 min before LPS treatment ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours. Each value represents a mean  $\pm$  SD. (\*:  $p < 0.05$  versus cell treated with BPE  $0 \mu\text{g/ml}$ ).

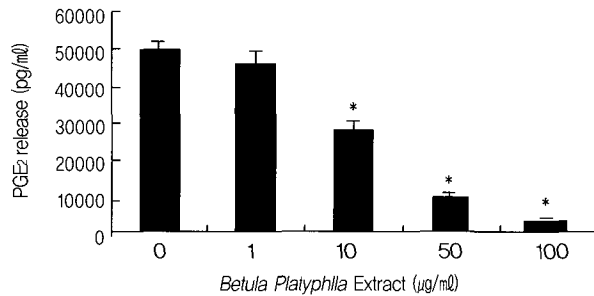
macrophage를 LPS로 24시간 동안 활성화시킨 후 배양액을 수집하여 즉시 Griess 법으로樺皮의 NO 생성억제력을測定하였다. 그 결과, Fig. 2에서 보듯이,樺皮 처리군이 비처리군에 비해 NO 생성이 농도의존적으로 감소하였고,樺皮의  $100 \mu\text{g/ml}$  농도에서 NO 생성이 最大  $88.8 \pm 0.65\%$ 로 유의성 있게 억제되었고,  $50 \mu\text{g/ml}$  농도에서도 약 50% 정도 억제되었다.

### 3. RAW264.7 macrophages의 PGE2 생성에 미치는 영향

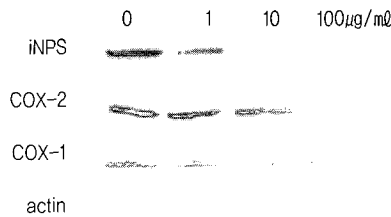
炎症 관련 mediator인 PGE2 생성에 미치는 영향도 조사되었다. NO 생성량 측정에 사용한 배양액으로

부터 PGE2 생성을 ELISA kit를 이용해測定하였다. Fig. 3에서 보듯이,樺皮 처리군이 비처리군에 비해 PGE2 생성이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히,  $10 \mu\text{g/ml}$ 樺皮 농도에서도 약 35%의 PGE2 생성 억제 효과를 보인 것은 NO 생성량이 이 농도에서는 억제되지 않았다는 점에서 대조적이다.  $100 \mu\text{g/ml}$  농도에서 PGE2 생성이 最大 93%로 유의성 있게 억제되는 것을 보아 NO 대한 억제 효과 보다는 PGE2 대한 억제 효과가 더 크다는 것을 알 수 있었다.

### 4. RAW264.7 macrophages의 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향



**Fig. 3.** Effects of BPE on PGE<sub>2</sub> release in LPS-induced RAW264.7 macrophages. PGE<sub>2</sub> concentrations in the culture supernatants were measured by ELISA. RAW264.7 macrophages were adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/well in 24 well plate. The cells were pretreated with 0, 1, 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  of BPE 30min before LPS treatment (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours. Each value represents a mean  $\pm$  SD. (\*:  $p < 0.05$  versus cell treated with BPE 0  $\mu\text{g/ml}$ ).



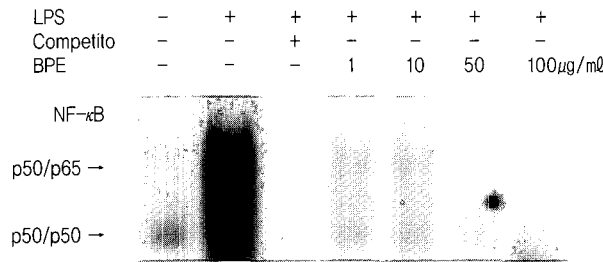
**Fig. 4.** Inhibition by BPE of iNOS and COX-2 protein levels in LPS-induced RAW264.7 macrophages. RAW264.7 macrophages were adjusted to  $5 \times 10^6$  cells/well in 6 well plate. The cells were treated with 0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  of BPE 30min before LPS treatment (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours. Equal amounts of total protein (10  $\mu\text{g/lane}$ ) were subjected to 12.5% SDS-PAGE, and expression of iNOS and COX-2 protein was determined by Western blotting specific anti iNOS and anti-COX-2 antibodies. Actin was used as an internal control.

樺皮에 의한 NO 와 PGE<sub>2</sub>의 억제 효과를 더욱 검증하기 위해서 이들을 생성하는 효소인 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제 효과를 western blot 방법으로 확인하였다. Fig. 4에서 보듯이, LPS로 활성화된 RAW264.7에 100  $\mu\text{g/ml}$ 의樺皮를 처리했을 때 대조군에 비해서 iNOS 단백질 발현이 현저하게 억제되었다. 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서도 iNOS의 단백질 50% 정도 감소하는 것을 보였다. 또한 COX-2 단백질 발현도 조사되었는데, iNOS 발현 억제만큼 현저하지는 않았지만 band density가 농도에 따라 감소하는 경향을 보였고, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 약 50% 정도 감소함을 보였

다. 참고로 일정하게 발현되는 COX-1와 beta-actin의 band는 변화 없이 일정함을 보이기 때문에 위의 iNOS와 COX-2 band는樺皮에 의한 특징적인 효과임을 알 수 있다.

#### 5. RAW264.7 macrophages의 NF- $\kappa$ B 활성도에 미치는 영향

炎症 반응을 일으키는데 관여하는 여러 가지 mediators의 유전자발현에 NF- $\kappa$ B가 주로 관여한다. 그 중의 하나인 iNOS 와 COX-2도 NF- $\kappa$ B가 관여함이 알려져 있다. 따라서 LPS에 의해서 활성화된



**Fig. 5.** Inhibition by BPE of NF- $\kappa$ B activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages. RAW264.7 macrophages were adjusted to  $1 \times 10^7$  cells/well in 60 mm<sup>2</sup> dish. The cells were pretreated with 0, 1, 10, 50 and 100  $\mu$ g/ml of BPE 30min before LPS treatment (1  $\mu$ g/ml) for 30min. EMSA experiments showing the activation of NF- $\kappa$ B were performed as described in experimental procedure.

iNOS와 COX-2가樺皮에 의해서 억제되는 기작을 확인하고자 EMSA에 의해서 NF- $\kappa$ B binding activity를 조사하였다. Fig. 5에서 보듯이,樺皮 농도가 증가할수록 NF- $\kappa$ B의 binding activity가 억제함을 보여준다. 특히,樺皮 1  $\mu$ g/ml 농도에서 NF- $\kappa$ B의 binding activity가 감소하였지만, iNOS와 COX-2 발현이 억제되지 않는 것으로 보아 iNOS와 COX-2 발현에 필요한 최소한의 NF- $\kappa$ B가 있어야 함을 간접적으로 보인다. 100  $\mu$ g/ml樺皮 농도에서는 NF- $\kappa$ B의 heterodimer p65/p50 과 homodimer p50/p50의 두 band가 모두 억제되고, iNOS와 COX-2도 발현이 억제되는 것으로 보아 이 두 유전자의 발현에 두 NF- $\kappa$ B complex 모두 중요하게 관여함을 보인다.

### 考 察

炎症의 사전적 의미를 살펴보면, 열이 오르고 아프며, 몸의 어느 부위가 빨갱게 붓는 症狀으로, 상처가 나거나, 열이나放射線에 의한 傷害, 毒物에 의한 傷害, 細菌의 寄生에 의한 傷害 따위가 생겼을 때, 이를 回復하려고 充血이 되고 白血球가 浸透되고 毛細管이 擴張되어 생기는 것을 말한다. 炎症이 일어나는 순서와 증상을 살펴보면, 發熱, 發赤, 疼痛, 浮腫과 機能 障礙로 이어 진다<sup>2)</sup>. 炎症의 초기 증상으

로 조직의 감염부에서 發熱이 일어나게 되고, 發熱이 일어난 후 동시에 조직이 붉게 변하게 된다. 發熱과 發赤이 일어난 후에는 감염부위에 痛症이 일으키게 되는데 炎症 유발로부터 수분 또는 수일 내에 발생하게 된다. 痛症이 일어나게 되면서부터 조직의 감염부위에 浮腫이 생기게 되며 痛症이 더 심해지는 경우가 있다. 또한 炎症을 오랜 시간 방치하거나 치료를 하지 않을 경우 감염부위의 기능에 손상을 입게 되고 機能 障礙까지 가져오게 된다. 한의학에서도 痛症을 風寒濕 등의 外邪가 침입하거나, 감정이 억압되거나, 조직 기관이 손상되거나, 外傷 등으로 인하여 발생하는 것으로 본다. 炎症의 유발 물질로는 細胞내 저장 물질인 히스타민(histamine), 혈장 내 물질인 브레디키닌(bradykinin), 炎症반응에 의한 생성물인 프로스타글란딘, NO 등이 존재 한다<sup>23)</sup>. 자극이나 알러지 (allergy) 등에 의해 히스타민이 비만細胞로부터 방출되어 혈관이 확장되고 炎症이 발생하게 되고, Kinin류는 모세혈관 투과성 항진과 동통, 炎症을 유발하게 된다. 프로스타글라딘의 경우, 炎症性 자극에 의해 細胞내에서 생합성되어 그 자체가 浮腫·동통을 일으키며, 다른 炎症 유발물질을 강화하여 炎症이나 疼痛이 확대된다.

*Betula platyphylla*는 한국어 이름으로는 자작나무(ja-jag-na-moo)로 樹皮가 흰색의 기름기가 있는 밀납

가루 같은 것으로 덮여 있으며 종이처럼 얇게 잘 벗겨지는 특징이 있기에, 이 나무를 白樺라고 부른다. 이 나무의 껍질이 약재로도 중요하게 쓰이는데, 간경에 작용하며 열을 내리고 습을 제거하며 기침을 멈추고 담을 삭이는 작용 있다. 또한 解毒 작용도 탁월하고 炎症을 없애는 효과가 상당히 강하며, 利尿 작용이 있어서 腎臟炎이나 浮腫에도 쓰인다. 한의학과 민간에서는 白樺皮 또는 樺皮로 부르며 황달, 설사, 腎臟炎, 肺結核, 胃炎, 여러 가지 癰腫 등의 치료에 이용해 왔다<sup>1)</sup>. 樺皮에 대한 기존의 연구를 살펴보면, 임 등<sup>23)</sup>이 樺皮의 flavonoid가 주로 있는 BuOH 분획을 얻어 5주간 흰쥐에 경구투여하고 혈장 지질 성분을 검토하였을 때, 樺皮 투여군이 비투여군에 비해 phospholipid와 cholesterol 함량이 유의적으로 감소하는 경향을 보였다고 보고한 바 있고, Matsuda 등<sup>24)</sup>이 樺皮의 50% 메탄올 추출물을 이용하여 항산화 작용에 의해 liver injury를 유의적으로 저해시켰다는 보고도 있다. 최근 2004년도에는 Ju 등<sup>25)</sup>이 樺皮의 메탄올 추출물을 이용하여 Chiese hamster lung fibroblast (V79-4)에서 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 대한 보호 작용과 human promyelocytic leukemia (HL-60), 癌 세포주를 이용하여 樺皮가 癌細胞의 細胞사멸을 유도한다고 보고하면서 樺皮의 항산화작용과 항암작용에 대해 밝혀냈다. 그러나 樺皮의 抗炎 작용에 대한 분자적 메커니즘을 규명한 논문은 아직 존재하지 않기에 본 저자들은 RAW264.7 macrophage를 이용하여 樺皮의 抗炎 작용의 기작을 살펴보았다.

생체 속에는 항상 소량의 일정한 농도로 생성되어 생리적 기능을 유지하도록 하는 NO와 같은 유리기 (free-radical)들이 있다. 감염질환, 스트레스 및 종양 형성 초기에는 숙주방어를 위한 다양한 免疫細胞들이 활성화되며 이 때 과다한 NO 유리기가 생성된다. 이렇게 형성된 NO는 바이러스, 박테리아 및 기생충 등과 같은 감염균을 공격하거나 또는 癌細胞형성의 초기단계에 종양細胞를 파괴하여 생체를 보호한다. 그러나 과다한 양의 유리기가 오랜 시간 동안 생성 되면 정상細胞들의 기능까지 파괴되어 만성 질환

유발의 원인으로 작용한다. 이들 유리기는 몸의 기능을 정상적으로 유지하기 위한 필수 단백질, 지질, 핵산 그리고 아미노산 등과 같은 細胞 내 물질들을 불활성화시켜 결국에는 다양한 질환 유발의 근본적 원인이 된다. 이렇게 과다 생성된 NO는 활성산소 (O<sub>2</sub>)와 결합하여 과산화질소 (ONOO<sup>-</sup>)와 같은 또 다른 독성물질을 생성하므로 복합적인 유리기 독성이 나타나게 되어 心血管계, 免疫계, 중추 및 말초신경계, 소화계, 내분비계, 생식계 등 거의 모든 기관계에서 다양한 질환을 유발시킨다. 따라서 이들 질환치료를 위한 가장 효과적인 방법은 유리기의 과다한 생성을 조절하는 데 있다. 한편, 소량의 NO 유리기는 정상적인 생리적 기능을 위한 필수적인 물질이므로 해로운 독성효과를 유발하는 NO 유리기의 과다 생성만이 선택적으로 억제 또는 조절되어야만 생리적 기능을 유지할 수 있다. NO는 NO 합성효소 (NO synthetase, NOS)의 작용으로 L-arginine으로부터 생성된다. 이 때, 생리적 농도의 NO는 vascular endothelium 및 뇌에 존재하는 효소들, constitutive NOS (cNOS, NOS1)에 의해서 항상 일정한 농도로 생성되지만, 과다한 NO의 생성은 활성화된 macrophage 및 여러 細胞에서 발견되는 免疫계의 iNOS (NOS2)에 의해서만 매개 된다<sup>24-26)</sup>. 그러므로 NO 유리기의 독성 및 질환을 가장 효과적으로 예방 및 치료하기 위해서는 iNOS의 작용만을 선택적으로 억제할 수 있는 분자적 기전을 규명하여 NO의 과다생성을 조기에 차단할 수 있는 물질을 개발하는 것이다. 본 실험에서 NO 생성은 樺皮 추출물을 농도 별로 1, 10, 50, 100 μg/ml 처리한 군이 비처리군에 비해 NO 생성이 농도 의존적으로 유의하게 감소됨을 확인할 수 있다. 그리고 iNOS 발현 억제가 NO 생성을 감소시켰는지 western blot으로 확인한 결과 樺皮 처리군이 비처리군에 비해 iNOS 발현이 감소하였고 이 또한 농도 의존적으로 현저하게 감소하는 것으로 분석할 수 있다.

프로스타글란딘은 생체에서 합성되는 생리 활성 물질이고, 각종 생물 활성을 나타내는 강력한 정보 전달 물질로, 1930년대에 정의 속에 자궁 수축 물질



로 처음 발견되어 이를 프로스타글란딘이라 명명하였다. 프로스타글란딘 중에 한 성분인 PGE<sub>2</sub>에 의해서 홍반이나 發熱, 痛症, 浮腫을 유발하게 되는데 이러한 프로스타글란딘 생합성의 출발 물질인 arachidonic acid는 細胞에 미생물의 침입 또는 물리 화학적 자극이 가해지면 phospholipidase에 의해 인해질 (phospholipid)로부터 유리된다. 다시 말해 arachidonic acid가 유리되면 COX 효소가 합성이 되고 이 효소에 의해서 痛症 유발 인자인 프로스타글란딘이 생성 된다<sup>27)</sup>. COX는 COX-1 (constitutive COX)과 COX-2 (inducible COX)의 두 가지 이성체 효소 (isozyme)로 분류되는데, 炎症과 痛症 발현에는 COX-2에 의해 생성되는 프로스타글란딘이 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고<sup>28,29,30)</sup>, COX-1은 대부분의 생체조직에서 일정수준으로 발현되어 정상적인 생리 활성을 유지하는데 필요한 프로스타글란딘 생성에 관여하는 반면<sup>31)</sup>, COX-2는 일반 정상조직에서는 그 발현의 정도가 매우 낮으나 炎症性 인자나 細胞 성장인자, 발암원, 종양촉진인자 등의 작용에 의하여 일시적으로 빠르게 발현되는 효소이며 炎症반응에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>32,33)</sup>. 본 실험에서 PGE<sub>2</sub> 생성은 樺皮 추출물을 농도별로 1, 10, 50, 100 $\mu$ g/ml 처리한 군이 비처리군에 비해 PGE<sub>2</sub> 생성이 농도 의존적으로 유의하게 감소됨을 확인할 수 있다. 그리고 COX-2 발현 억제가 PGE<sub>2</sub> 생성을 감소시켰는지 western blot으로 분석한 결과 樺皮 100 $\mu$ g/ml 처리군이 비처리군에 비해 COX-2 발현이 현저하게 감소하는 것으로 확인할 수 있다. 樺皮의 抗炎 효과가 분자적으로 확인되었기에 본 저자들은 과연 樺皮의 LPS signaling 저해 메카니즘은 무엇인가에 의문점을 두고 다음 실험을 행하였다.

NF- $\kappa$ B는 1986년 Sen and Baltimore에 의해 B cell의 kappa light chain 에서 발견된 transcriptional factor로 細胞의 성장, 분화, 발생 등에 관계된 많은 유전자의 transcriptional activator이다<sup>34)</sup>. Rel family인 NF- $\kappa$ B는 두개의 subunit으로 구성된 homo-, heterodimeric complex로 작용한다. 자극이 없을 때는 細胞質 내에

서 I $\kappa$ B라는 단백질과 결합을 하고 있다. NF- $\kappa$ B의 nuclear localization signal (NLS)는 I $\kappa$ B에 의해 막혀 있기 때문에 I $\kappa$ B와 결합하고 있는 NF- $\kappa$ B는 핵 안으로 들어갈 수 없다. upstream에서 자극이 오면 IKK가 활성화 되고, 활성화된 IKK는 I $\kappa$ B를 인산화시킨다. 인산화된 I $\kappa$ B는 ubiquitination이 되어 I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 복합체는 proteasome 으로 가서 I $\kappa$ B만이 분해된다<sup>35)</sup>. 이렇게 하여 만들어진 NF- $\kappa$ B는 비로소 NLS가 노출되어 핵 안으로 들어갈 수 있고, 따라서 전사 인자로서의 기능을 할 수 있게 된다. NF- $\kappa$ B는 핵 내로 이동하여 DNA와 결합한 후 여러 炎症性 매개체의 발현을 유도하는데<sup>13)</sup> 여러 炎症 매개체 중 COX-2와 iNOS 유전자<sup>20)</sup>도 포함되어 있다. 위와 같이 기본 연구를 뒷받침으로 본 저자들은 樺皮의 LPS signaling 저해 메카니즘으로, LPS에 의하여 활성화된 NF- $\kappa$ B를 화피가 억제하는지를 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)로 확인하였다.

臨床에서는 痛症을 수반하는 자가면역질환의 하나인 류마티스 관절염을 다루기 위해서 강력하고 효과적인 진통제의 하나인 Celecoxib를 널리 사용하고 있다. 그러나 장기간 사용했을 때 부작용이 따르는 문제점도 가지고 있기에 천연물질에서 유래하고 부작용이 적은 약품 개발이 절실하다. 본 연구에서는 樺皮가 항염효과와 진통효과의 지표라고 할 수 있는 iNOS 와 PGE<sub>2</sub>를 각각 효과적으로 억제하므로 새롭고 안전한 의약품개발을 위한 후보 물질이 될 수 있다는 것을 실험을 통하여 보였다. 또한 樺皮를 의약품으로 개발하기 위해서는 향후 화피의 구성성분을 분석하고 정제하여 동물실험을 통하여 더 검증하는 일이 남아있지만, in vitro 실험을 통하여 樺皮의 效能을 생화학·분자생물학적 방법으로 확인하였다는 점에 본 연구의 의미가 있다.

## 結 論

樺皮는 한의학적으로 淸熱利濕, 祛痰止咳, 消腫解毒 작용을 가지고 있어 解毒 작용과 炎症을 없애는 효과, 利尿 작용 등으로 쓰이는 약재인데, 이러한 樺

皮의 抗炎 效果를 검토하고자 마우스 macrophage 細胞주인 RAW264.7 macrophage에 LPS를 처리하여 炎症性 매개체의 분비량 및 발현을 측정하고, 그 억제 작용기작을 밝히기 위해 NF- $\kappa$ B 活性도를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

첫째, 炎症性 매개체인 NO와 PGE<sub>2</sub>의 분비량은 樺皮 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 억제 되었고, 각각 樺皮 추출물 처리군 100 $\mu$ g/ml에서 최대 88.8  $\pm$  0.65%, 93  $\pm$  0.78%의 억제율을 보였다.

둘째, 炎症性 매개체인 iNOS와 COX-2의 발현이 樺皮 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다.

셋째, LPS로 유도된 RAW264.7 macrophage의 NF- $\kappa$ B의 활성화는 樺皮추출물에 의하여 樺皮 추출물 50, 100  $\mu$ g/ml에서 NF- $\kappa$ B의 활성화가 억제됨을 확인할 수 있었다.

### 參考文獻

1. 신민교. 臨床本草學. 永林社. 1997:317
2. Medical plants in the republic of Korea. Manila: World Health Organization. 1998:51
3. Chi HY, Han BH. A new triterpene, betunafolienpentaol, from *Betula platyphylla*. J. Pharm. Soc. Korea. 1975;19:159
4. Yokota M, Zenda H, Kosuge T, Yamamoto T, Torigoe Y. Studies on isolation of naturally occurring biologically active principes. V. Antifungal constituents in *Betulae cortex*. Yakugaku Zasshi. 1978;98(12):1607-12
5. Matsuda H, Ishikado A, Nishida N, Ninomiya K, Fujiwara H, Kobayashi Y, Yoshikawa M. Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. japonica. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1998;8: 2939-2944
6. Ju EM, Lee SE, Hwang HJ, Kim JH. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. japonica. Life sciences. 2004;74:1013-1026
7. Wu MJ, Wang L, Ding, HY, Weng CY, Yen JH. *Glossogyne tenuifolia* acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPS-induced NF- $\kappa$  B. J Biomed Sci. 2004;11:186-199
8. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int Rev Immunol. 1998;16:457-499
9. Nathan C. Natural resistance and nitric oxide. Cell. 1995; 82:873-876.
10. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. J Leukoc Biol. 1998;64:25-32
11. Glauser MP. The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. Drugs. 1996;52(suppl 2):9-17.
12. Park HJ, Lee JS, Lee JD, Kim NJ, Pyo JH, Kang JM, Choe IH, Kim SY, Shim BS, Lee JH, Lim S. The anti-inflammatory effect of *Cinnamomi Ramulus*. J Korean Oriental Med. 2005;26(2): 140-151
13. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. J Clin Invest. 2001;107:135-42
14. Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. Nat Rev Immunol. 2002;2:725-734
15. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor  $\kappa$  B activation in intact cells. J Exp Med. 1992;175:1181-94
16. Bowie AG, Moynagh PN, O'Neil LA. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- $\kappa$  B by tumor necrosis factor but interleukin-1 in the

- human endothelial cell line ECV304. *J Biol Chem.* 1997;272:25941-50
17. Manna SK, Zhang HJ, Yant T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B and activated protein-1. *J Bio Chem.* 1998;273:13245-54
  18. Bonizzi G, Piette J, Schoonbroodt S, Greimers R, Havard MP, Merville MP. Reactive oxygen intermediate-dependent NF- $\kappa$ B activation by interleukin-1 $\beta$  requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1950-60
  19. Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:3308-12.
  20. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene.* 1999;18:6853-66.
  21. Haefner B. NF- $\kappa$ B: arresting a major culprit in cancer. *Drug Discov Today.* 2002;7:653-63.
  22. Zhou H, Wong TF, Cai X, Liu ZQ, Jiang ZH, Bian ZX, Xu HX, Liu L. Suppressive effects of JCICM-6, the extract of an anti-arthritis herbal formula, on the experimental inflammatory and nociceptive models in rodents. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(2):253-260.
  23. 박동기, 임병우, 신흥목. 황금, 정향, 화피 및 마가목으로부터 분리된 BuOH 분획이 항체 생산능, 지질 대사 및 지질 과산화에 미치는 영향. *동의병리학회지.* 2000;14(1):171-182.
  24. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: whichm where, how, and why? *J Clin Invest.* 1997;100:2146-52.
  25. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:477-81.
  26. Nathan C. nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-64.
  27. Vane, JR, Bakhle, YS and Botting, RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97.
  28. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophage: Up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.* 1998;58:1208-16.
  29. Sheug H, Shao J, Morrow JD, Beachamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58:362-6.
  30. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93:705-16.
  31. Ames, NB, Shigenaga, MK and Hagen, TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:7915-22.
  32. Dean AK, Bradley SF, Brian CV, Robert WL, Harvey RH. TIS 10, a phorbol ester tumor promoter inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 1991;266:12866-72.
  33. Akarasereenont P, Bakhle YS, Thiemernam C, Vane JR. Cytokine-mediated induction of cyclooxygenase 2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol.* 1994;115:401-8.

34. Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*. 2002;16(6):1053-68
35. Chiang YM, Lo CP, Chen YP, Wang SY, Yang NS, Kuo YH, Shyur LF. Ethyl caffeate suppress

NF- $\kappa$  B activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2 and PGE<sub>2</sub> in vitro or in mouse skin. *British J Pharm*. 2005;146:352-363