

## 큰비쑥(*Artemisia fukudo*) 추출물의 murine macrophage RAW 264.7 세포에서 *in vitro* 항염효과

윤원종 · 이정아 · 김길남 · 김지영 · 박수영\*  
 (재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소

### *In vitro* Anti-inflammatory Activity of the *Artemisia fukudo* Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells

Weon-Jong Yoon, Jung-A Lee, Kil-Nam Kim, Ji-Young Kim, and Soo-Yeong Park\*  
 Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute

**Abstract** The present study describes the preliminary evaluation of the anti-inflammatory activities of *Artemisia fukudo* extracts. The 80% ethanol extract of *A. fukudo* was sequentially fractionated with *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate, and butanol. In order to effectively screen for anti-inflammatory agents, we first examined the extracts' inhibitory effects on the production of pro-inflammatory cytokines activated with lipopolysaccharide. Moreover, we examined the inhibitory effects of the *A. fukudo* extracts on pro-inflammatory factors (NO, iNOS, COX-2, and PGE<sub>2</sub>) in murine macrophage RAW 264.7 cells. The protein levels were determined by immunoblotting. Of the sequential solvent fractions, the *n*-hexane and dichloromethane fractions inhibited the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6), production of NO and PGE<sub>2</sub>, and the protein levels of iNOS and COX-2. These results suggest that *A. fukudo* may have significant effects on inflammatory factors, and may be a potential anti-inflammatory therapeutic plant.

**Key words:** *Artemisia fukudo*, pro-inflammatory cytokines, NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2

## 서 론

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며(1), 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyecosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다(2). 대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다(3). 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7과 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다(4,5). 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성으로 인해 arachidonic acid가

prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다(6). 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase (COX-2)에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다(7). 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만(8), 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(9,10). PGE<sub>2</sub>는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(11).

쑥은 국화과(Compositae) 쑥속(*Artemisia*)에 속하며, 흔히 쑥이라 불리울 수 있는 식물로는 지구 북반구에 200여 종이 있고 국내에는 38 종이 보고되고 있으나, 흔히 통칭하는 쑥은 종이 명확하지가 않고 쑥속(*Artemisia*)과 유사종인 떡쑥(*Gnaphalium*)과 쑥부쟁이(*Aster*)로 구별할 수 있다. 이들 쑥에 속하는 식물들은 독특한 향기와 맛을 가지고 있어 종래로 부터 식용 또는 약용으로 널리 사용되어 왔다. 쑥에는 사람에게 유익한 성분이 다수 포함되어 있어 예로부터 널리 이용되어 왔으며, 쑥에 포함된 유효성분을 생약학적 방법으로 연구한 결과 쑥에 포함된 다양한 유효성분들이 혈액순환촉진, 이노작용, 강장작용, 지혈, 피부질환치료, 건위, 황달치료, 항암작용 등의 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(12,13). 쑥의 구성성분은 생물학적으로나 화학적으로 다양하며 단백질, 지질, 당질, 비타민(A, B, C, D), 칼슘 등이 함유되어 있어 전통 의학에 피부병, 위장병, 알레르기, 감기, 복통 등 거의 쓰이지 않는

\*Corresponding author: Soo-Yeong Park, Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, San 12-10 Sinrye, Namwon, Seogwipo, Jeju 697-943, Korea  
 Tel: 82-64-720-2820  
 Fax: 82-64-720-2801  
 E-mail: user111@jejuhidi.or.kr  
 Received April 19, 2007; accepted July 26, 2007

곳이 없을 정도로 빈번하게 사용되고 있고 풍부한 식물이어서 관심이 증가되고 있다. 이 식물에서 보고 된 생물학적으로 활성을 띠는 다양한 화합물들은 sesquiterpenes, flavonoids, coumarins, isoprenyl coumaric acid 유도체, caffeoylquinic acids, acetylenes, sterols, phenoxychromene, anacetophenone glucoside, phenylpropene, methyl jasmonate, and  $\gamma$ -tocopherol이다(12).

본 연구에서는 쑥속 식물중 바닷가에 주로 서식하는 큰비쭉 (*Artemisia fukudo*)을 대상으로 그 유효성분이 염증성 질환의 예방 및 치료제 개발의 기초자료로 사용 될 수 있는지 탐색하고, 식품산업에서 항염증 활성을 갖는 기능성 식품으로의 가능성을 밝히고자 극성에 따라 순차적으로 용매 분획하여 추출물 및 분획물을 가지고 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6의 억제 효과를 관찰하고, NO의 생성억제 효과 및 iNOS, COX-2 그리고 PGE<sub>2</sub> 생성 및 활성 억제를 조사하여 기능성을 탐색하고자 하였다.

### 실험방법

#### 재료

제주도 해안가 일대에 자생하고 있는 큰비쭉(*A. fukudo*)을 2006년 9월경에 채집하여 제주대학교 생명과학과에 의뢰하여 동정하였으며, 채집된 시료는 증류수로 2-3회 수세한 뒤 물기를 제거한 뒤 2주간 음건한 후 마쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

#### 용매 계통 분획

큰비쭉의 에탄올 추출물 및 순차적 분획물의 제조는 80% 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다. 즉 분말 건조된 시료에 80% 에탄올로 3회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전히 건조시켰다. 건조된 에탄올 추출물에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3회 반복 실시하였다.

#### 세포 배양

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

#### Nitric oxide(NO) 생성 평가

RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10<sup>5</sup> cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 추출물 시료와 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu$ L와 Griess 시약 100  $\mu$ L를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 비교하였다.

**Table 1. Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis**

Gene	Primer sequences	Fragment size (bp)
TNF- $\alpha$ <sup>1)</sup>	F 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGITG-3'	364
	R 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	
IL-1 $\beta$ <sup>2)</sup>	F 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'	447
	R 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'	
IL-6 <sup>3)</sup>	F 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	308
	R 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
$\beta$ -actin	F 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	603
	R 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	

<sup>1)</sup>TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , <sup>2)</sup>IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$ , <sup>3)</sup>IL-6: interleukin-6.

#### RNA 분리 및 RT-PCR

세포로부터의 total RNA 추출은 TRI-reagent(MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하였으며, RNase-free한 조건하에서 이루어졌다. 1  $\mu$ g의 total RNA를 oligo(dT) 18 primer, dNTP(0.5  $\mu$ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase(2U)로 70°C 5 min, 25°C 5 min, 37°C 60 min, 그리고 70°C에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다.

Polymerase chain reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 유전자를 증폭시키기 위하여 2  $\mu$ L cDNA, 4  $\mu$ M의 5'과 3' primer, 10 $\times$  buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250  $\mu$ M dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unit *Taq* polymerase (Promega, Madison, WI, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25  $\mu$ L로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler(Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR cycle은 94°C/45초, 55-60°C/45초, 72°C/60초, 30회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다(Table 1).

#### Immunoblotting

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척 한 후 1 mL의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20-30  $\mu$ g의 lysate를 8-12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS(1 : 1000) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2(1 : 1000)(BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1-3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

### 세포독성 평가 (LDH assay)

RAW 264.7 세포( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)를 DMEM 배지에 추출물 시료와 LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH(lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지  $50 \mu\text{L}$ 와 reconstituted substrate mix를  $50 \mu\text{L}$ 를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후  $50 \mu\text{L}$ 의 stop solution을 넣은 후 microplate reader(Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

### Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 평가

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도( $1 \text{mg/mL}$ )로 조절된 추출물 시료  $50 \mu\text{L}$ 와  $450 \mu\text{L}$ 의 LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다. PGE<sub>2</sub>의 측정은 PGE<sub>2</sub> ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.

### 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% ( $p < 0.05$ )에서 통계적 유의차를 평가하였다.

## 결과 및 고찰

### 에탄올 추출물 및 순차분획물의 수율

큰비썬 시료( $1.2 \text{kg}$ )를 80% 에탄올로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 조추출물  $219 \text{g}$ 을 얻었다. 그리고 여기서 얻어진 에탄올 추출물( $100 \text{g}$ )을 10배량의 증류수로 현탁시킨 후에 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH) 등을 순차적으로 분획하여 헥산 층에서  $9.01 \text{g}$ , 디클로로메탄 층에서  $12.46 \text{g}$ , 에틸아세테이트 층에서  $13.39 \text{g}$ , 부탄올 층에서  $22.91 \text{g}$  및 잔사인 물 층에서  $33.05 \text{g}$ 의 분획물을 얻었다. 각 순차적 분획물의 수율은 Table 2에 나타내었으며, 추출에 사용한 큰비썬 에탄올 추출물의 수율은 약 18.25%이었다. 에탄올 추출물에 대한 각 순차분획물 중 헥산 분획물 수율이 9.01%로 가장 낮았고, 수용성 분획물이 33.05%로 가장 높은 수율을 보였다.

### Nitric oxide(NO) 생성억제 효과

NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(7,16). NO를 생산하는 NOS는 세포내에 존재하여 calcium이나 calmodulin에 의존적인 형태인 constitutive NOS(cNOS)와 calcium에 비의존적으로 대식세포나 혈관내피세포가 활성화되거나 LPS와 같은 세균의 내독소나 여러 가지 cytokine에

Table 2. Yield of each fraction extracted from *A. fukudo*

Solvent	Yield (% w/w) <sup>1)</sup>
80% EtOH <sup>2)</sup> extract	18.25
<i>n</i> -hexane fraction	9.01
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ <sup>3)</sup> fraction	12.46
EtOAc <sup>4)</sup> fraction	13.39
BuOH <sup>5)</sup> fraction	22.91
H <sub>2</sub> O fraction	33.05

<sup>1)</sup>Yield (%) = solid extract or fraction (g)/raw material (dry weight) or ethanol extract  $\times 100$ , <sup>2)</sup>EtOH: ethanol, <sup>3)</sup> $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : dichloromethane, <sup>4)</sup>EtOAc: ethylacetate, <sup>5)</sup>BuOH: butanol.

Table 3. Inhibitory effects of 80% ethanol extract and solvent fractions of *A. fukudo* on the production of nitric oxide in RAW 264.7 cells

Treatment	Inhibition (%)	
	25 ( $\mu\text{g/mL}$ )	50 ( $\mu\text{g/mL}$ )
80% EtOH extract	48.80*	64.41*
<i>n</i> -hexane fraction	75.71**	87.87** <sup>1)</sup>
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ fraction	85.45**	98.70**
EtOAc fraction	61.30*	73.76**
BuOH fraction	-	2.59
H <sub>2</sub> O fraction	-	-

The production of nitric oxide was assayed from culture medium of RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) in the presence of 80% ethanol extract and solvent fractions of *A. fukudo*. Significantly different from negative control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). <sup>1)</sup>cytotoxicity

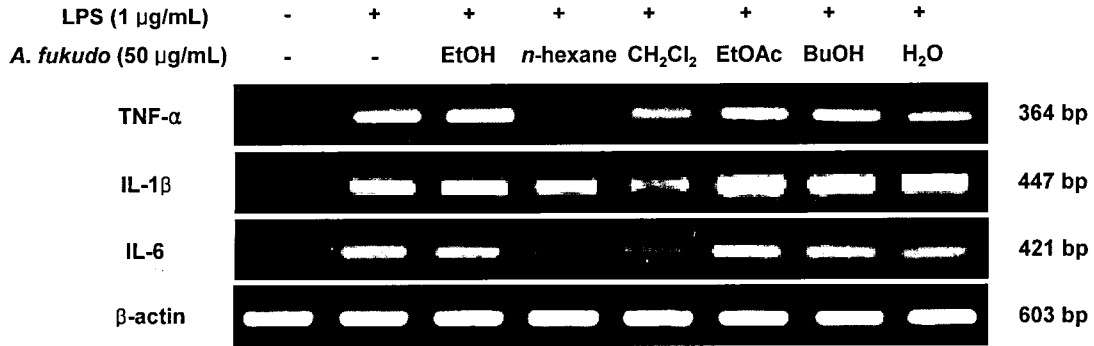
의해 유도되는 형태인 iNOS의 형태가 있다(17-22). LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며 이에 의한 세포독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가되어 있음이 보고되어 있다(8).

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 큰비썬 추출물과 분획물의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 측정하였다. 그 결과 헥산과 디클로로메탄 분획물에서 대조군인 LPS 단독처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 관찰할 수 있었다(Table 3). 특히 디클로로메탄 분획물인 경우  $50 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 세포독성 효과도 보이지 않으면서 아주 우수한 NO 생성 억제효과를 보여주었다.

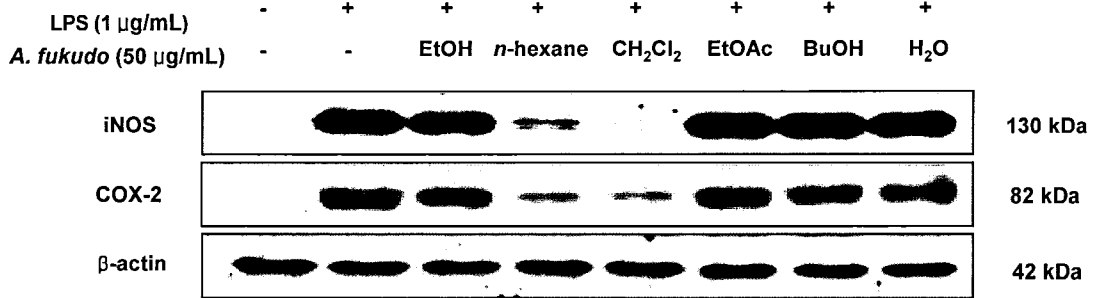
### Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

TNF- $\alpha$ 와 같은 다 기능성 cytokine은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며(23), 암축진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다. TNF- $\alpha$ 가 인간의 염증성 피부질환과 관련이 있음은 이미 많이 보고되어 왔다(24,25). 또한 여러 염증질환과 알려진 현상에 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체를 처리하였을 때 증상이 완화되었다(26). 염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6의 발현을 저해시키거나 COX-2 활성저해에 기인하는 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제를 통해 pro-inflammatory factor의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다.

대식세포인 RAW 264.7 세포로부터 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 발현 정도를 RT-PCR를 통해 알아 본 결



**Fig. 1.** Inhibitory effects of 80% ethanol extract and solvent fractions of *A. fukudo* on the mRNA expression of tumor necrosis factor-β, interleukin-1β and interleukin-6 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and the tumor necrosis factor-α, interleukin-1β and interleukin-6 mRNA expressions were determined from 24 hr cultures of cells stimulated by lipopolysaccharide (1 µg/mL) in the presence of 80% ethanol extract and solvent fractions of *A. fukudo* (50 µg/mL).



**Fig. 2.** Inhibitory effects of 80% ethanol extract and solvent fractions of *A. fukudo* on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with lipopolysaccharide (1 µg/mL) in the presence of 80% ethanol extract and solvent fractions of *A. fukudo* samples (50 µg/mL) for 24 hr. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method.

과, LPS 자극과 함께 처리하여 TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6 생성 억제에 대한 큰비쭉 추출물 및 용매분획물을 50 µg/mL 농도로 처리하였을 때, TNF-α 생성 억제는 헥산과 디클로로메탄 분획물에서 억제 효과를 나타냈으며, IL-1β 생성 억제에는 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 분획물에서는 IL-1β의 생성을 오히려 증가시켰지만 디클로로메탄 분획물에서 억제 효과를 보였으며, IL-6 생성 억제에는 헥산과 디클로로메탄 분획물에서 강한 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1).

**iNOS 및 COX-2 생성 억제 효과**

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(27,28).

RAW 264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 큰비쭉 추출물과 분획물을 50 µg/mL 농도로 처리하여 iNOS 생성에 대한 억제 정도를 immunoblotting를 통해 알아보았다. 그 결과 immunoblotting에 의한 iNOS의 단백질 생성은 헥산, 디클로로메탄 분획물에서 대조군인 LPS 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2). 본 연구 결과, NO 생성 억제 효과와 초기-염증성 인자 (pro-inflammatory factor) 생성 억제 효과가 가장 두드러지게 나타났던 디클로로메탄 분획물이 iNOS

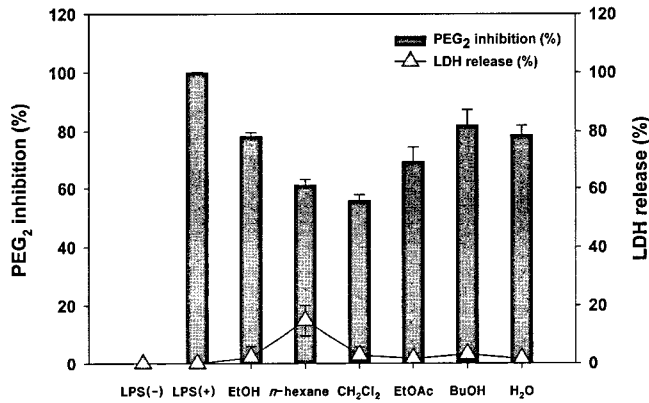
의 발현 또한 강하게 억제시키는 걸로 보아 NO의 생성 억제 기전은 iNOS 발현 억제를 통해 이루어진 것으로 여겨진다.

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins(PGs)로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용한다(29). 다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성화에 의한 것이다. 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다.

RAW 264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 큰비쭉 추출물과 분획물을 50 µg/mL 농도로 처리하여 COX-2 생성에 대한 억제 정도를 immunoblotting을 통해 확인 하였다. 그 결과, iNOS의 단백질 발현 양상과 마찬가지로 헥산, 디클로로메탄 분획물에서 대조군인 LPS 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2).

**세포 독성에 미치는 영향**

LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. RAW 264.7 세포( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 시험 약물과 LPS(1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, LDH assay 방법을 이용하여 세포 독성을 확인한 결과, 헥산 분획물인 경우 50 µg/mL 이상의 농도에서 다소 세포독성이 나타났으나 다른 분획물에서는 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 3).



**Fig. 3. Inhibitory effects of 80% ethanol extract and solvent fractions of *A. fukudo* extracts on cell cytotoxicity and the prostaglandin E<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/mL) were stimulated by lipopolysaccharide (1  $\mu$ g/mL) with 80% ethanol extract and solvent fractions (50  $\mu$ g/mL) from *A. fukudo* for 24 hr. Supernatants were then collected after 24 hr and prostaglandin E<sub>2</sub> concentration from supernatants was determined by ELISA method. Cell viability was determined using lactate dehydrogenase method. The data represent the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate experiments.

### Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 효과

RAW 264.7 세포에서 염증성 PGE<sub>2</sub> 억제 효과를 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. RAW 264.7 세포에 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 사용하여 PGE<sub>2</sub>의 생성을 유도한 후 큰비쭉 추출물과 분획물을 50  $\mu$ g/mL 농도로 처리하여 확인한 결과, PGE<sub>2</sub> 생성억제는 디클로로메탄 분획물에서 다른 분획물에 비해 높은 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). 이는 큰비쭉의 디클로로메탄 분획물에 의해 LPS에 의해 발현되는 PGE<sub>2</sub> 억제에 영향을 준다는 것을 의미하며, 이러한 결과는 COX-2의 생성 억제가 PGE<sub>2</sub> 생성 억제를 통한 것으로 여겨진다.

### 요 약

본 연구는 썩 추출물의 항염 활성이 prostaglandins 합성의 저해 및 pro-inflammatory cytokine의 억제기전과 관련이 있을 것으로 예상되어짐에 따라, 큰비쭉(*A. fukudo*)을 대상으로 80% EtOH로 추출하고 추출물을 극성에 따라 용매분획을 실시하여, 큰비쭉 에탄올 추출물 및 용매분획물들이 염증반응의 주체가 되는 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine과 NO의 생성억제 효과, 그리고 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제효과 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제효과 등을 통해 알아보았다. 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 큰비쭉 추출물을 처리하여 확인해본 결과, 추출물 및 분획물들이 다소 차이는 있었지만 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6에서 생성억제 효과를 나타냈다. 또한 핵산, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트 분획물에서 NO의 생성억제 효과가 강하게 나타났으며, 핵산과 디클로로메탄 분획물에서는 iNOS, COX-2 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과가 다른 분획물에 비해 강하게 나타났다. 이러한 결과는 큰비쭉에서 유효성분 추출을 통한 항염증 물질의 연구 또는 예방하거나 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다. 또한 큰비쭉 추출물로부터 염증억제 성분을 도출하

고자 활성분획인 핵산과 디클로로메탄 분획물에 대하여 활성성분의 분리가 진행 중이다.

### 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-02-07) 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사 드립니다.

### 문 헌

1. Tizard IR. Immunology: An introduction inflammation. 2<sup>nd</sup> ed., Saunders College Publishing, New York, NY, USA pp. 423-441 (1986)
2. Willoughby DA. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. Ann. Rheum. Dis. 34: 471-478 (1975)
3. Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J. Immunol. 144: 1425-1431 (1990)
4. Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. J. Inflamm. 46: 1-12 (1995-1996)
5. Funk CD, Frunk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. FASEB J. 5: 2304-2312 (1991)
6. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. P. Soc. Exp. Biol. Med. 211: 24-32 (1996)
7. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43: 109-142 (1991)
8. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide, and N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. Biochem. J. 316: 209-215 (1996)
9. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. Phytother. Res. 17: 485-489 (2003)
10. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. J. Endotoxin. Res. 7: 431-438 (2001)
11. Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. FEBS Lett. 569: 321-326 (2004)
12. Tan RX, Zheng WF, Tang HQ. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. Planta Med. 64: 295-302 (1998)
13. Yoon WJ, Lee JA, Kim JY, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, Park SY. Anti-oxidant activities and anti-inflammatory effects on *Artemisia scoparia*. Korean J. Pharmacogn. 37: 235-240 (2006)
14. Lee TB. Illustrated Flora of Korea. Hyangmoon Publishing Co., Seoul, Korea p.757 (1979)
15. Wakefield PE, James WD, Samlaska CP, Metzger MS. Tumor necrosis factor. J. Am. Acad. Dermatol. 24: 675-685 (1991)
16. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell 78: 915-918 (1994)
17. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide. Mutat. Res. 339: 73-89 (1995)
18. Rockey DC, Chung JJ, McKee CM, Noble PW. Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments. Hepatology 27: 86-92. (1998)
19. Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. Biochem. Bioph. Res. Co. 191: 89-94 (1993)
20. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and

- functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267: 6370-6374 (1992)
21. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Disilvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3491-3495 (1993)
  22. Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.* 160: 1025-1032 (2003)
  23. Dinarello CA. Pro-inflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508 (2000)
  24. Piguet PF, Grau GE, Houser C, Vassalli P. Tumor necrosis factor is a critical mediators in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reaction. *J. Exp. Med.* 173: 673-679 (1991)
  25. Burrell R. Human responses to bacterial endotoxin. *Circ. Shock* 43: 137-153 (1994)
  26. Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10945-10949 (1992)
  27. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. *J. Ethnopharmacol.* 77: 209-217 (2001)
  28. Kim RG, Shin KM, Chun SK, Ji SY, Seo SH, Park HJ, Choi JW, Lee KT. *In vitro* antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* 46: 343-347 (2002)
  29. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12013-12017 (1994)