

## 木瓜의 抗炎 및 免疫反應에 대한 實驗的 研究

\*원광대학교 한의과대학 부인과학교실, \*\*원광대학교 한의과대학 내과학교실  
이수정\*, 김승백\*, 최창민\*, 이기상\*\*, 조한백\*

### ABSTRACT

#### Anti-inflammatory Effect of *Fructus Chaenomelis*(FC)

Su-Jeong Lee\*, Song-Baeg Kim\*, Chang-Min Choe\*,  
Key-Sang Lee\*\*, Han-Baek Cho\*

\*Department of Oriental Obstetric and Gynecology, college of Oriental  
Medicine, Wonkwang University

\*\*Department of Internal medicine, college of Oriental Medicine, Wonkwang  
University

**Purpose:** The purpose of this study is to investigate anti-inflammatory effect and immune responses of aqueous extract from *Fructus Chaenomelis*(FC).

**Methods:** We studied anti-inflammatory effect by means of examining the production of NO(nitric oxide) and expressions of pro-inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor-alpha), IL(interleukin)-6, IL-12) in the LPS-induced peritoneal macrophages of mice. Also, The western blot analysis has been done to look into the mechanism of anti-inflammatory effect.

#### Results :

1. The FC extract did not have any cytotoxicity in the peritoneal macrophages.
2. The FC extract inhibits the productions of NO, IL-6, IL-12 in the LPS-stimulated peritoneal macrophages of mice, but not of TNF- $\alpha$ .
3. The FC extract inhibits the activation of NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B) by keeping I $\kappa$ B- $\alpha$ (inhibitory kappa B-alpha) from degradating, but not of MAPKs(mitogen-activated protein kinases) such as ERK(extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38.

**Conclusion:** These results show that FC extract inhibits the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-12, NO by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in the peritoneal macrophages of mice. In conclusion, this experiment suggests that FC extract may be effective for the treatment of acute and chronic inflammation including genitourinary infection.

**Key Words:** *Fructus Chaenomelis*(FC), NO, cytokine, MAPK, NF- $\kappa$ B, inflammation.

## I. 서 론

염증(inflammation)은 조직의 변질, 순환장애와 삼출, 조직증식의 세가지 병을 유발하는 병변으로 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 방어기전의 발현이다<sup>1)</sup>. 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, prostaglandin 등의 혈관 활성물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증이 유발된다. 지속적인 염증반응은 점막 손상을 촉진하고, 염증매개물질이 과량 생성되면 과도한 면역반응을 야기하여 각종 질환을 악화시키는 등 결과적으로 숙주에 해를 끼칠 수 있다<sup>2,3)</sup>.

木瓜는 舒筋活絡·祛風濕鎮痛하여, 濕痺拘攣·腰膝關節酸重疼痛 등의 病症을 主治하므로, 대개 關節炎이나 脚氣, 破傷風, 坐骨神經痛, 多發性 神經炎, 末梢神經炎, 産後腰脚腿膝疼痛 등의 治療에 사용되어 왔으며<sup>4-8)</sup>, 藥理學的으로 抗炎症, 抗凝固, 抗菌작용이 있다고 알려져 있다<sup>14-17)</sup>.

현재까지 알려진木瓜의 항염증 작용에 대한 연구로,木瓜의 熱水 추출물이 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 NO(nitric oxide)의 생성을 억제하였다거나<sup>13)</sup>, 관절염 등의 만성 염증이나 암의 진행 상태에서 중요한 역할을 하는 MMP-9(matrix metalloproteinase-9)의 활성을 저해하였다는 보고가 있으나<sup>14)</sup>,木瓜 추출물이 염증 매개물질인 NO와 cytokine(TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL(interleukin)-6, IL-12)의 생성에 미치는 효과와 그 작용기전에 대한 연구 결과는 아직까지 접해보지 못하였다.

이에 저자는木瓜 추출물로 전처리한 복강대식세포에서 LPS로 유도된 NO와 cytokine의 생성정도를 측정하고, 염증억제 작용기전을 구명하기 위해 MAPK (mitogen-activated protein kinase) family 인 ERK(extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38 및 I $\kappa$ B- $\alpha$ (inhibitory kappa B- $\alpha$ )의 발현을 관찰하여 有意한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 동 물

C57BL/6 6주령 mouse 암컷을 오리엔트 바이오(경기도 성남)에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 약 재

본 실험에서 사용한木瓜는 옴니허브(경북 영천)에서 구입한 후 圓光大學校 本草學 教室에서 정선하여 사용하였다.

#### 3) 시 약

Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)사에서, 배양조는 Corning(Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 HEPES, sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS (Serotype: 055: B5), Tris-HCL 등은 SIGMA(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2 Ab, anti-phospho-p38 Ab, anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  Ab, anti-phospho-JNK Ab, anti-ERK Ab, anti-JNK Ab는 Cell

Signaling Technology((MA, USA)사에서 구입하였다. Anti-mouse IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 Ab, 재조합 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 시료의 제조

1L의 3차 증류수에 木瓜 100g을 넣고 2시간 30분 동안 煎湯하여 거즈로 여과한 다음, -70°C(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freezing Dryer로 동결 건조시켜서 3.5g의 분말을 얻어, 농도별로 생리 식염수로 녹여서 filter(0.2  $\mu$ m syringe filter)로 여과해서 사용하였다.

### 2) 복강 대식세포의 배양

Thioglycollate를 이용하여 염증성 대식세포를 얻기 위하여, 2.5ml의 thioglycollate를 mouse의 복강 내에 주사하고, 3일 후에 cervical dislocation으로 희생시킨 후, 복강 내로 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 7ml를 주사하여 잘 흔들어서 다시 syringe로 유출한다. 유출된 복강세포는 4°C, 1200rpm에서 5분간 원심 분리한 후, 10% FBS를 함유하고 1% penicillin이 보충된 RPMI-1640에 현탁하였다. 그 후 dish에 분주하여 대식세포가 바닥에 부착되도록 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 3시간 동안 배양하여, suspension 세포를 버리고 dish에 부착한 세포를 실험에 사용하였다.

### 3) MTT 분석

대식 세포의 생존율은 살아 있는 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소작용(dehydrogenases)에 의하여, 노란색의 수

용성 기질인 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 자주색을 띄는 비수용성의 MTT-formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 MTT 분석법<sup>15)</sup>으로 측정하였다. 본 검사법으로 신속하고 정확하게 많은 양의 세포 증식 거동을 측정할 수 있다. 자주색 결정은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해되고 흡광도(Optical Density)는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있는 세포의 수와 직선적인 상관관계를 나타내게 된다.

간단히 말해서, 지수 성장을 하는 세포들은 RPMI-1640 배지에서  $1 \times 10^6$  cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도의 AETD(4-acetyl-12, 13-epoxy-9-trichothecene-3, 15-diol)로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 후, 1mg/ml의 농도로 배양하기 위하여 MTT 용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% N, N-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가하여 용해한 다음, 24시간 동안 배양하였다. Formazan의 양은 540nm에 흡수되는 양을 측정하였다. 약물을 처리하지 않은 대조군 세포의 formazan의 양을 생존율 100%로 하였다.

### 4) NO의 측정<sup>16)</sup>

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrullin과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변환한다. 그리스 시약(Griess reagent: 0.5%의 sulfanilamide, 2.5%의 인산 및 0.5%의 naphthylethylamine)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고

이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 sample 1, 2, 3에 각각 100 $\mu$ l씩을 첨가하고 그 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. Sample의 흡광도는 spectrophotometer (MD, USA)로 540nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

5) Cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12)의 측정

LPS(500ng/ml)로 대식세포를 자극하기 전, 木瓜 추출물을 30분 동안 전처리하였다. 염증매개물질인 cytokine의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS(500ng/ml)로 자극한 후, 24시간 뒤 이들 염증 매개물질을 세포 상층액에서 제조사의 protocol에 따라 ELISA kit(R&D System, Minneapolis, MN)를 사용하여 정량하였다.

6) ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)<sup>17)</sup>

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12에 특이하게 반응하는 mouse의 monoclonal 항체로 코팅된 96-well plate를 0.05% Tween 20이 포함된 PBS로 세척하고 재조합된 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12를 희석하여 standard로 사용하였다. 희석액은 10ng/ml로 시작하여 표준커브를 그리게 하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양한 후 well을 다시 세척하고 각각에 biotinylated anti rat TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 0.2g/ml를 넣는다. Well을 세척한 후 avidin-peroxidase를 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양하였다. 다시 well을 세척하고 ABTS substrate를 넣은 후, 자동 microplate ELISA reader를 사용하여

450nm로 분석하였다.

7) RT-PCR(reverse transcription-PCR)

배양된 세포의 total RNA를 TRIzol reagent를 사용하여 뽑아낸다. cDNA를 제조사의 protocol에 따라 MML-V reverse transcriptase를 써서 합성하였다. Reverse transcriptase(RT) 반응을 위해 total RNA (1 $\mu$ g)에 0.5 $\mu$ g의 oligo-dT을 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시켜 Single strand buffer (1x), 0.5mM DTT, 각각 500 $\mu$ M의 dNDTs, 200U의 MML-V reverse transcriptase를 가하고 RT 반응은 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 시행하였다. Polymerase chain reaction (PCR)을 cDNA 1 $\mu$ l, buffer(1x), 1mM MgCl<sub>2</sub>, 각각 200 $\mu$ M dNTPs, 각각 0.2 $\mu$ M의 specific primer로 시행하였고 최적 PCR 조건은 92 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 1 cycle로 하여 30회 반복하는 것으로 하였다. 증폭된 DNA 반응 혼합물을 1.5% agarose gel로 전기영동한 후, 증폭된 생성물이 UV 형광으로 가시화되면, relative DNA 농도를 Quantity One program(Bio-Rad, USA)로 분석하였다.

8) Western blot analysis<sup>18)</sup>

복강에서 추출한 mouse 대식세포를 60mm culture dish에 1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml로 세포를 배양하고, serum free media(RPMI-1640)로 12시간 starvation시켰다. 木瓜추출물 (500mg/ml)로 30분 동안 전처리한 뒤에 LPS(500ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후, 시간별로(0, 15, 30, 60mins) 배양하여 cell을 얻었다. 얻은 cell을 원심 분리(5000rpm, 5mins)하여 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. Lysis buffer(lysis buffer 1ml + phosphatase inhibitor 10 $\mu$ l + protease

inhibitor 10  $\mu$ l)를 넣어 단백질을 용해시켜서 원심분리(15000rpm, 20mins)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질과 sampling buffer(4x)를 같이 넣어 섞은 다음, 그 sample을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후, membrane에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 동안 blocking하였다. I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 활성 정도를 ECL detection 용액(Amersham)으로 확인하였다.

### 3. 통계처리

실험 결과에 대한 통계 처리는 Student's t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## III. 결 과

### 1.木瓜 추출물이 대식세포의 독성에 미치는 영향

木瓜 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여 mouse의 복강 대식세포에木瓜 추출물을 농도별(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0 mg/ml)로 전처리하고, 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과,木瓜의 추출물은 대조군에 비해 세포 생존율을 저하시키지 않아木瓜 추출물이 대식세포에 대한 독성 작용이 없음을 알 수 있었다(Fig. 1).

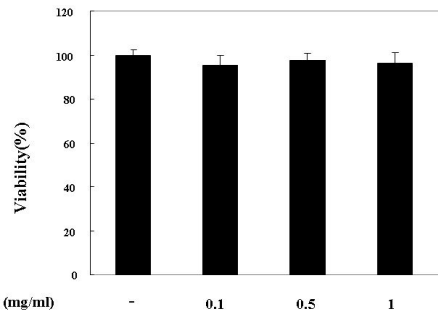


Fig. 1. FC extract does not have any cytotoxicity in mouse peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages were incubated for 24hrs in the presence or absence of FC extract at indicated dose. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments.

### 2.木瓜 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

木瓜 추출물을 다양한 농도(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml)로 30분 전처리한 후 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액으로 NO를 측정된 결과 아무것도 처리하지 않은 정상군에서 NO의 생성은  $1.728 \pm 0.074 \mu\text{M}$ , LPS만 처리한 대조군에서는 NO의 생성이  $46.811 \pm 0.091 \mu\text{M}$  이었으나,木瓜 추출물을 0.1 mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml로 전처리한 실험군에서 NO의 생성은 농도별로 각각  $48.848 \pm 2.766 \mu\text{M}$ ,  $13.517 \pm 1.429 \mu\text{M}$ ,  $7.754 \pm 5.464 \mu\text{M}$ 의 결과를 나타내었다. 따라서木瓜 추출물은 LPS에 의한 NO 생성을 0.1mg/ml을 제외하고 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2).

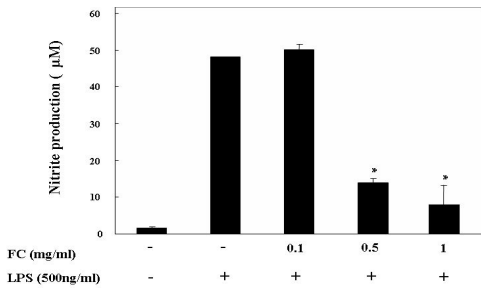


Fig. 2. *FC* extract inhibits LPS-induced NO production in mouse peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with various concentrations of *FC* extract for 30mins, and then incubated in medium with LPS(500ng/ml) for 24hrs. NO production was measured by Griess method(to detect nitrite). Data are means of three independent experiments(\*p<0.05).

### 3. 木瓜 추출물이 TNF-α 생성에 미치는 영향

木瓜 추출물을 다양한 농도(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml)로 30분 전처리한 후 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액을 ELISA 방법으로 측정된 결과, 정상군에서는 TNF-α의 생성이 0.039±0.004ng/ml, 대조군에서는 5.809±0.471ng/ml였으나, 실험군에서는 농도별로 각각 5.21±0.066ng/ml, 5.715±0.362ng/ml, 5.629±0.255ng/ml의 결과를 나타내었다. 따라서木瓜 추출물은 LPS에 의한 TNF-α의 생성을 고농도에서도 거의 억제하지 못하였다(Fig. 3).

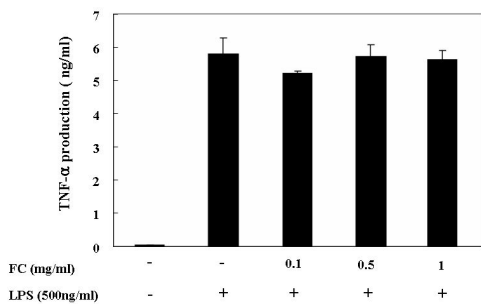


Fig. 3. *FC* extract does not inhibit LPS-induced TNF-α production in mouse peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with or without *FC* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated in medium with LPS (500ng/ml) for 24hrs. TNF-α production was measured by ELISA. Detail experimental methods were described in materials and methods.

### 4. 木瓜 추출물이 mRNA 수준에서 TNF-α의 발현에 미치는 영향

木瓜 추출물이 mRNA 수준에서 TNF-α의 발현을 조절하는가를 조사하기 위해, 먼저木瓜 추출물을 농도별(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml)로 30분 전처리한 후 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후 세포 상층액을 RT-PCR 방법으로 측정하였다. 그 결과木瓜 추출물은 mRNA 수준에서 TNF-α 발현을 억제하지 못하였다(Fig. 4).

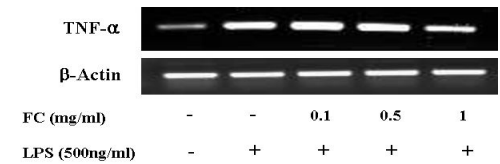


Fig. 4. *FC* extract does not inhibit LPS-induced TNF-α mRNA expression in mouse peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with or without *FC* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated in medium with LPS(500ng/ml) for 24hrs. The level of TNF-α mRNA was measured by RT-PCR. Detail experimental methods were described in materials and methods.

### 5. 木瓜 추출물이 IL-6 생성에 미치는 영향

木瓜 추출물이 대식세포에서 LPS로 유도되는 IL-6의 생성에 미치는 효과를 조사하였다.木瓜 추출물을 다양한 농도

(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml)로 30분 전 처리한 후 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액을 ELISA 방법으로 측정된 결과, 정상군에서 IL-6의 생성은  $0.108 \pm 0.018 \text{ ng/ml}$ , 대조군에서는  $17.616 \pm 0.583 \text{ ng/ml}$  이었으나, 실험군에서의 IL-6의 생성은 각각  $15.628 \pm 1.021 \text{ ng/ml}$ ,  $16.429 \pm 0.979 \text{ ng/ml}$ ,  $5.319 \pm 0.291 \text{ ng/ml}$ 의 결과를 나타내었다. 따라서木瓜 추출물은 LPS에 의한 IL-6 생성을 고농도에서만만 억제하였다(Fig. 5).

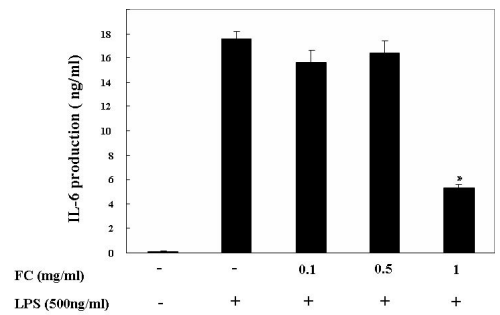


Fig. 5. *FC* extract inhibits LPS-induced IL-6 production in mouse peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with or without *FC* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated in medium with LPS (500ng/ml) for 24hrs. IL-6 production was measured by ELISA. Detail experimental methods were described in materials and methods(\* $p < 0.05$ ).

### 6.木瓜 추출물이 mRNA 수준에서 IL-6 발현에 미치는 영향

木瓜 추출물이 mRNA 수준에서 IL-6의 발현을 조절하는가를 조사하기 위해, 먼저木瓜 추출물을 농도별(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml)로 30분 전처리한 후 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후 세포 상층액을 RT-PCR 방법으로 측정하였다. 그 결과木瓜 추출물이 mRNA

수준에서 IL-6의 발현을 고농도에서 억제하였다(Fig. 6).

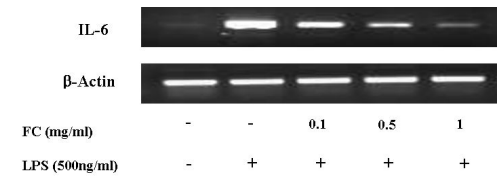


Fig. 6. *FC* extract inhibits LPS-induced IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with or without *FC* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated in medium with LPS (500ng/ml) for 24hrs. The level of IL-6 mRNA was measured by RT-PCR. Detail experimental methods were described in materials and methods.

### 7.木瓜 추출물이 IL-12 생성에 미치는 영향

木瓜 추출물이 대식세포에서 LPS로 유도되는 IL-12의 생성에 미치는 효과를 조사하였다.木瓜 추출물을 다양한 농도(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml)로 30분 전처리한 후 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액을 ELISA 방법으로 측정된 결과, 정상군에서 IL-12의 생성은  $0.029 \pm 0.001 \text{ ng/ml}$ , 대조군에서는  $3.232 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$  이었으나, 실험군에서 IL-12의 생성은 각각  $3.809 \pm 0.157 \text{ ng/ml}$ ,  $0.512 \pm 0.009 \text{ ng/ml}$ ,  $0.096 \pm 0.008 \text{ ng/ml}$ 의 결과를 나타내었다. 따라서木瓜 추출물이 LPS에 의한 IL-12의 생성을 0.1mg/ml을 제외하고는 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 7).

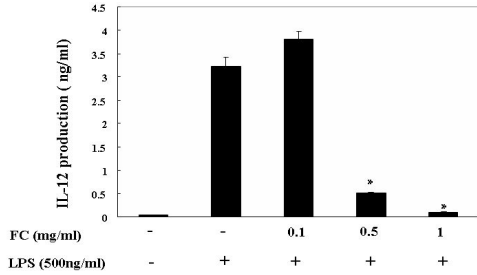


Fig. 7. *FC* extract inhibits LPS-induced IL-12 production in mouse peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with or without *FC* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated in medium with LPS(500ng/ml) for 24hrs. IL-12 production was measured by ELISA. Detail experimental methods were described in materials and methods(\* $p < 0.05$ ).

### 8. 木瓜 추출물이 mRNA 수준에서 IL-12 발현에 미치는 영향

木瓜 추출물이 mRNA 수준에서 IL-12의 발현을 조절하는가를 조사하기 위해, 먼저木瓜 추출물을 농도별(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml)로 30분 전처리한 후 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후 세포 상층액을 RT-PCR 방법으로 측정하였다. Fig. 8에 나타난 바와 같이木瓜 추출물은 IL-12 mRNA의 발현을 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 8).

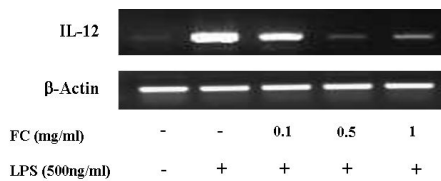


Fig. 8. *FC* extract inhibits LPS-induced IL-12 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with or without *FC* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated in medium with LPS(500ng/ml) for 24hrs. The level of IL-12 mRNA was measured by RT-PCR. Detail experimental methods were described in materials and methods.

### 9. 木瓜 추출물이 IκB-α의 분해와 MAPK의 활성화에 미치는 영향

Fig. 2~Fig. 8에서 확인한 바와 같이木瓜 추출물이 NO, IL-6, IL-12의 생성을 억제하였다. 따라서木瓜 추출물이 대식세포에서 LPS로 유도된 cytokine의 생성을 억제하는 기전을 알아보기 위해 MAPK family인 ERK, JNK, p38의 인산화 정도를 알아보고, NF-κB의 활성이 IκB-α의 분해에 의존하게 되는데 근거하여, IκB-α의 분해정도를 관찰하였다.木瓜 추출물로 전처리하고 LPS로 자극한 대식세포에서 ERK, JNK, p38의 인산화 정도와 IκB-α의 분해정도를 시간별(0, 15, 30, 60mins)로 조사하였다.木瓜 추출물이 LPS에 의한 MAPK의 활성화는 억제하지 못하였지만 IκB-α의 분해를 억제하는 것으로 나타난 바,木瓜 추출물이 NF-κB의 활성을 억제하고 있다고 생각된다(Fig. 9).

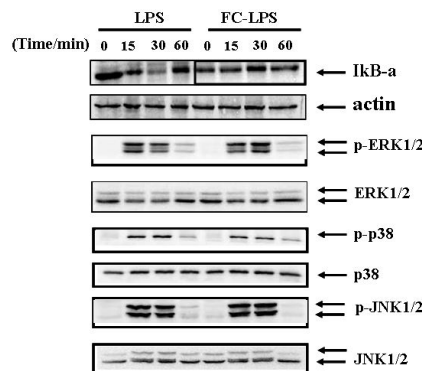


Fig. 9. *FC* extract inhibits the degradation of IκB-α in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages, but not phosphorylation of ERK, JNK, p38.

Cells were pretreated with or without *FC* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated in medium with LPS(500ng/ml) for indicated time. Detail experimental methods were described in materials and methods.



## IV. 고찰

木瓜는 薔薇科에 속한 落葉灌木인 木瓜나무(*Chaenomeles Sinensis Koehne*) 및 명자꽃의 성숙한 果實<sup>4)</sup>로, 《雷公炮炙論》<sup>19)</sup>에 최초로 “調營衛 助穀氣”의 효능이 있다고 기재된 이후 《湯液本草》 등<sup>20-23)</sup> 에는 “治脚氣濕痺邪氣 癰亂大吐下 轉筋不止 益肺祛濕 和胃而滋脾”의 효능과 주치를 제시하고 있다. 《中藥大辭典》<sup>5)</sup> 을 비롯한 본초 서적을 종합하여 보면木瓜는 性溫·味酸·無毒하며 肝·脾經으로 들어가 舒筋活絡·化濕和胃·祛風濕鎮痛·祛痰·消水腫하는 효능이 있어 濕痺脚氣·風濕筋骨痺痛·腰膝關節酸重疼痛·脚氣水腫·癰亂大吐下·轉筋不止·心腹痛 등의 病症을 치료한다<sup>4,5,24,25)</sup>. 실험적 연구보고에 의하면木瓜는 임파세포성 백혈병·종횡생쥐 腹水癌에 대한 억제작용이나, 補肝 작용, 骨形成 작용, 肝細胞 壞死 억제 작용, 抗炎작용, 抗利尿 작용이 있으므로 최근에는 關節炎·破傷風·濕脚氣·乾脚氣·坐骨神經痛·多發性 神經炎·末梢神經炎·細菌性痢疾·肺炎·氣管支炎·咳嗽·肺結核 등에 사용되고 있다<sup>9,26-30)</sup>. 또한木瓜는 임신 初期의 惡心嘔吐·임신 中後期 子腫·產後腿痛·產後關節痛 등의 부인과 질환에도 응용되고 있다<sup>6-8)</sup>.

藥理學的인 측면에서도木瓜는 면역계통에 작용하고 抗菌작용이 있을 뿐만 아니라 關節炎에 대해 抗炎症작용이 있으며, 혈액응고인자에 대해 강력한 억제활성을 가지고 있고, 肝보호작용이 있다고 보고된 바 있다<sup>10-12,27)</sup>.

따라서 임상에서 다양한 질환에 활용

되는木瓜의 항염증 작용의 기전을 알아보고자 하였다.

먼저木瓜 추출물이 대식세포에 대해 독성을 나타내는지 알아보기 위하여 MTT 방식으로 세포 생존율을 측정할 결과 대조군에 비해 세포 생존율을 저하시키지 않아, 대식세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1).

대식세포(macrophage)는 세포성 면역 반응의 중요한 작동세포로서의 기능과, 체액성 면역반응에서 외래 항원을 제거하는 역할을 하기도 하지만, cytokine을 분비하여 호중구 등의 염증세포를 자극하고, 發赤·發熱·疼痛·腫脹·機能障礙 등과 같은 염증효과를 유발시키는 중요 원인이 된다<sup>2)</sup>. LPS는 gram negative bacteria의 외부 세포막을 구성하는 성분으로, 박테리아가 죽으면서 세포 외막으로부터 떨어져 나오는데, 자연면역에 있어 낮은 농도에서는 직접적으로 대식세포를 활성화하여 NO와, TNF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15 등의 pro-inflammatory cytokine을 포함한 많은 새로운 단백질을 합성하도록 하지만 고농도의 LPS는 組織傷害, 散在性 血管內凝集, 그리고 종종 사망의 원인이 되는 septic shock을 유발하기도 한다<sup>2,31,32)</sup>.

NO는 염증반응에서 강력한 혈관확장제로 작용하고, 혈소판 응집과 부착을 감소시키는 염증 매개물로서, 내피 세포에서 NO가 비정상적으로 생성되면 동맥경화와 당뇨, 고혈압을 일으키며, 대식세포가 IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS로 자극될 때 inducible NOS(iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 되는데, 과도하게 생성된 경우에 혈관을 이완시켜 패혈증을 유발할 수 있다<sup>3,33,34)</sup>.

木瓜 추출물이 NO의 생성을 억제할 수 있는지 알아보기 위하여木瓜 추출물을 농도별로 전처리한 후 LPS에 의해 유도된 NO의 생성 정도를 측정하였다.木瓜 추출물은 NO의 생성을 억제하였다 (Fig. 2).

TNF- $\alpha$ 는 염증을 매개하는 중요한 cytokine으로 내독소(endotoxin), 면역 복합체, 독소, 물리적 자극 및 여러 염증 과정에서 분비되며, 종양 세포만을 죽이는데 관여하는 물질이다. 소량 및 생리적 농도에서는 백혈구와 상피세포의 조절기능을 통해 효율적인 염증반응을 유발시켜 숙주를 보호하지만, 다량 생성될 경우 저혈압, 혈관저항 증가, 심박 증가 등이 유발되어 septic shock이 발생함으로써 숙주에 치명적인 해가 될 수 있다<sup>2)</sup>. IL-6는 활성화된 T cell, macrophage, monocyte, endothelial cell, fibroblast들이 분비하는 cytokine으로, TNF- $\alpha$ , IL-1과 함께 급성기 단백질반응의 유도체로서 작용하며, 면역반응, 조혈, 염증을 조절한다<sup>2,35-38)</sup>. IL-6가 세균을 제거하고 봉쇄하게 하는 체계적인 반응을 갖는다면, 가장 최근에 공인된 IL-12는 항바이러스 반응에 있어 첫 번째 방어선인 natural killer(NK) cell를 보충시키고 활성화시킨다. 현재 NK 세포뿐만 아니라 T 림프구로 하여금 IFN- $\gamma$ 를 생성하도록 하는 강력한 유도자로서 인식되고 있지만, 원래는 대식세포에서 유래되어 NK cell의 세포 용해성 기능을 활성화시키는 활성화자로 알려졌다. 미생물에 대한 대식세포의 활성화를 NK cell 작용 기능의 발달로 연결하기 때문에 자연면역의 매개자로 분류하기도 한다. IL-12는 내재적인 면역 촉진제로서 작용하며 IL-2와 상승

작용을 일으키기 때문에, 함께 사용하면 cytotoxic lymphocyte에 대한 반응을 증가시킨다고 한다<sup>2,31,36)</sup>.

이와 같이 체내 염증 과정에서는 다량의 inflammatory cytokine이 생성되는데,木瓜 추출물이 염증성 매개물질인 cytokine의 생성을 어느 정도 억제하는지 알아보기 위해 대식세포에 농도별로 전처리한 후 LPS에 의해 유도된 cytokine의 생성 정도를 측정하였다. 그 결과 TNF- $\alpha$ 의 생성은 고농도에서도 억제하지 못하였으나 IL-6, IL-12의 생성은 억제하였다(Fig. 3~Fig. 8). 이상의 결과에서木瓜가 NO와 cytokine의 생성을 억제함으로써 염증 반응을 억제할 수 있는 것으로 생각된다.

대식세포를 LPS로 자극하면 cytokine 및 MIP(macrophage infiltrating protein)와 같은 chemokine, 염증반응을 일으키는 NO의 생성을 증가시키는데 그 기전을 보면, LPS가 혈액에 있을 경우 즉각적으로 LBP(lipopolysaccharide binding protein)과 접합하고, 다시 CD14와 복합체를 형성한다. 이렇게 형성된 LPS/LBP/CD14 복합체가 세포 표면에 작용하여 MAPK의 활성화 및 NF- $\kappa$ B의 활성화를 일으킨다<sup>39,40)</sup>.

NF- $\kappa$ B는 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 결합하여 비활성형으로 존재하나, 세포가 생리적 또는 비생리적 자극에 노출되면 활성화된다. 세포가 활성화되기 위해서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 serine 잔기가 인산화되어 분리됨으로서 NF- $\kappa$ B가 떨어져 나가고, 자유로워진 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 target DNA의 특정 부위와 결합하여 전사인자로 작용함으로써, cytokine과 세포 접합 분자 등을 비롯한 활성화 유전자의 발현

을 유도한다<sup>39,41,42)</sup>.

MAPK는 세포 증식, 분화, 사망 및 증양 생성 등의 다양한 생물학적 과정에서, 세포 외부의 자극에 대한 신호를 세포 내로 전달하는 중심 매개체로 알려져 있다. 포유류에서는 세 가지 소그룹 ERK, JNK, p38 등이 있으며, 각 MAPK는 각기 다른 세포의 자극에 의해 활성화되고, 또한 각기 다른 기질 특이성을 보이며, 상이한 경로를 통해서 활성화됨으로서 염증 매개물질 생성을 유도하게 된다<sup>43,44)</sup>.

이러한 기전을 바탕으로木瓜 추출물이 NO, IL-6, IL-12의 생성을 억제하는 기전을 알아보기 위하여, 본 실험에서는 ERK, JNK, p38 등의 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 활성을 조사하였다. 실험 결과木瓜 추출물은 MAPK의 활성화에 대해서는 모두 억제하지 못하였지만, I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해는 억제하였다(Fig. 9).

이상의 실험결과로 볼 때木瓜 추출물이 NF- $\kappa$ B의 활성 억제를 통해 NO와 cytokine인 IL-6, IL-12의 생성을 억제함으로써 항염증 작용을 갖는다고 사료된다.

## V. 결 론

木瓜 추출물의 항염증 효과를 검증하기 위하여 mouse의 복강 대식세포를 LPS로 자극한 후, NO의 생성, inflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 생성을 관찰하고 작용기전을 究明하고자 ERK, JNK, p38 및 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1.木瓜 추출물의 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행한 결과,木瓜의 농도별 처리는 대식세포에 대한 세포 독성을 나타내지 않았다.
- 2.木瓜 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 NO 생성을 억제하였다.
- 3.木瓜 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성을 억제하지 못하였고, mRNA 수준에서의 발현을 억제하지 못하였다.
- 4.木瓜 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 IL-6의 생성을 고농도에서만 억제하였고, mRNA 수준에서의 발현을 억제하였다.
- 5.木瓜 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 IL-12의 생성을 억제하였으며, mRNA 수준에서의 발현 또한 억제하였다.
- 6.木瓜 추출물은 MAPKs의 활성을 억제하지는 못하였으나, I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하였다.

이상의 결과에서木瓜 추출물은 대식세포에서 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제함으로써, 염증관련 cytokine들의 생성을 억제하는 것으로 나타나, 임상에서 급·만성 염증질환이나 근골격계 질환 및 부인 과적으로 염증과 관련된 제반 질환의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 10월 22일
- 심 사 일 : 2008년 10월 28일
- 심사완료일 : 2008년 11월 7일

## 참고문헌

1. 유태무 등. 천연물의 항염증작용에 관한 연구. 응용약물학회지 1998;6:269-275.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia:W.B.Saunders company. 1997;11, 25-26, 250-264, 397.
3. 김창중, 서병세. 최신 일반병리학(4th). 서울:신일상사. 2004;145-168.
4. 전국한의과대학 공동교재 편찬위원회. 本草學. 서울:영림사. 2007;315-316.
5. 김창민 등. 中藥大辭典 3권. 서울:정담. 1998;1688-1694.
6. 沈金鰲. 中醫婦科名著集成. 華夏出版社. 1997;832.
7. 何松庵, 浦天球. 中醫婦科名著集成. 華夏出版社. 1997;647.
8. 임은미. 女性本草學. 서울:전국의학사. 2005;131-132.
9. 한방약리학 교재편찬위원회. 韓方藥理學. 서울:신일상사. 2005;142-145.
10. Dai M et al. Glucosides of chaenomeles speciosa remit rat adjuvant arthritis by inhibiting synoviocyte activities. Acta Pharmacologica Sinica. 2003;24 :1161-1166.
11. Chen Q, Wei W. Effects and mechanisms of glucosides of chaenomeles speciosa on collagen-induced arthritis in rats. Int Immunopharmacol. 2003;3:573-608.
12. Lee MH, Son YK, Han YN. Tissue factor inhibitory flavonoids from the fruits of chaenomeles sinensis. Arch Pharm Res. 2002;25(6):842-850.
13. 이태진 등. 木瓜, 호장근 및 유향 추출물이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 nitric oxide 생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(3) :603-608.
14. 이태진 등. 木瓜, 호장근 및 유향 추출물이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 MMP-9의 활성화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(1) :37-42.
15. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986;89:271-277.
16. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of relative nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol. 1988;141:2407-2412.
17. Bergsdorf N, Nilsson T, Wallen P. An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease. Thromb Haemost. 1983;50(3):740-744.
18. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981;112(2):195-203.
19. 雷教 撰. 雷公炮炙論(輯佚本). 上海: 上海中醫學院出版社. 1986;87.
20. 王好古. 湯液本草. 欽定 四庫全書 醫家類 13. 서울:대성문화사. 1995;994.
21. 唐慎微. 證類本草. 欽定 四庫全書 醫

- 家類 8. 서울:대성문화사. 1995:953-954.
22. 陳士澤 著. 本草新編. 北京:中國中醫藥出版社. 2000:246.
23. 李時珍. 本草綱目. 欽定 四庫全書 醫家類 41. 서울:대성문화사. 1995:622-624.
24. 李尙仁. 本草學. 서울:의약사. 1975:179-180.
25. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:1888-1889.
26. 徐樹楠. 中藥臨床應用大全. 하북과학기술출판사. 1999:201-202.
27. 梅全喜, 畢煥新. 現代中藥藥理手冊. 북경:중국중의약출판사. 1998:107-108.
28. 김병철. 木瓜의 水煎劑가 estrogen 분비장애로 인한 골다공증에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 1995.
29. 육창수 등. 韓藥의 약리성분과 임상응용. 서울:계축문화사. 1981:501-502.
30. 김호철. 韓藥藥理學. 서울:집문당. 2001:201.
31. Julius MC, Robert EL. ATLAS OF IMMUNOLOGY. CRC press. 1999:39-40, 57-58, 192-199, 385, 397.
32. Lehninger, Nelson, Cox. 생화학. 서울외국서적. 1996:337.
33. 이화진. Saussurea lappa의 NOS 유도 억제활성성분. 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문. 1997.
34. Vander, Sherman, Luciano. Human physiology:the mechanisms of body function(7th). International edition. 1998:203.
35. 김세중. 면역학. 서울:고려의학. 1994:148-161.
36. 정태호 등. 최신면역학 강의. 경북대학교 출판부. 1996:211-230.
37. Akira S et al. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF- $\alpha$ ). FASEB J. 1990:4(11):2860-2867.
38. Pravinkumar B Sehgal. Interleukin-6:molecular pathophysiology. Journal of Investigative Dermatology. 1990:94:2-6.
39. 이원하. Innate immunity에서 Toll like receptor(TLR)의 기능. 생화학 분자생물학뉴스. 2003:23(3):195-201.
40. 박준용, 한동수. 세균과 우리 몸과의 교신:Toll like receptors. 대한소화기학회지. 2002;40(5):287-293.
41. Bottex-Gauthier C et al. The Rel/NF-kappa-B transcription factors: complex role in cell regulation. Pathol Biol. 2002;50(3):204-211.
42. Gilmore TD et al. Rel/NF-kappa B/I kappa B protein and cancer. Oncogene. 1996;13:1367-1378.
43. 김종훈 등. 백서 해마에서 카이닌산 유도 경련에 의한 JNK 경유 신호전달경로 활성화의 발달단계에 따른 변화. 대한신경정신의학회. 2001:40(5):971-980.
44. 송현. 세포 이동성에 있어서 MAPK 신호 전달경로의 조절기관 규명. 덕성여자대학교 대학원 박사학위논문. 2006.