

LPS로 자극한 RAW267.4 세포에서 黃芩, 黃連 배합 비율에 따른 TYPE-1 interferon 억제효과

국윤범
상지대학교 한의과대학 방제학교실

ABSTRACT

Inhibitory Effect of Mix proportion of Root of *Scutellaria baicalensis* and *Coptis chinensis* on LPS-induced type-I interferon Production in RAW264.7 Cells

Yoon-Bum Kook
Department of Oriental Medicine, Sangji University

Objectives : The present study was designed to investigate correlation between mix proportion of *Scutellaria baicalensis* (SB) and *Coptis chinensis* (CC) on lipopolysaccharide (LPS)-induced TYPE-1 interferon production.

Methods : I examined TYPE-1 interferon, interferon regulating factor (IRF)-1,7 and interleukin(IL)-10 production on LPS-induced RAW264.7 cells to evaluate inhibitory effect of mix proportion of SB and CC using real time PCR.

Results : Mixture of SB and CC regulated TYPE-1 interferon and IRF-1,7 mRNA expression with SB dose dependent manner, while maintained IL-10 mRNA expression on LPS-induced RAW264.7 cells.

-
- 교신저자 : 국윤범
 - 강원도 원주시 우산동 660번지 상지대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 033-730-0661 E-mail : kook@sangji.ac.kr
 - 접수 : 2008/ 12/ 01 수정 : 2008/ 12/ 10 채택 : 2008/ 12/ 15

Conclusion : In mixture of SB and CC, SB plays a key role in reducing TYPE-1 interferon through inactivation IRF-1,7. Furthermore mixture of SB and CC maintained IL-10 mRNA level. Collectively, this results suggest that SB confer beneficial effects in autoimmune diseases clinically.

Key word : *Scutellaria baicalensis*, lipopolysaccharide (LPS), inflammation, interferon, IRF-1,7, interferon regulatory factor

I. 緒論

Type I interferon (IFN- α , β)은 바이러스 감염에 의한 선천성 면역반응에서 가장 큰 부분을 차지하며 수지상 세포와 단핵구 식세포에서 주로 생산되는 세포활성물질이다^{1,2)}. 세포가 바이러스에 감염되면 세포내 toll-like-receptor (TLR)경로와 RIG-1과 같은 바이러스성 RNA 감지 시스템에 의해 IRF-3,7이 활성화되고 이는 IFN- α , β 의 핵전사를 촉진시켜 IFN- α , β 가 생성된다^{3,4)}.

생성된 IFN- α , β 는 감염되지 않은 세포의 수용체와 결합하고 세포 내 Jak-STAT를 활성화시킨 후 활성화된 STAT 단백질이 핵으로 이동하여 dsRNA-activated serine/threonine protein kinase (PKR16), RNase L18, 19와 같은 효소가 발현하고 각각 바이러스 핵전사를 억제하고, 바이러스 RNA 분해를 촉진시켜 바이러스의 복제를 억제하게 된다^{5,6)}. 한편, 감염된 세포와 결합한 IFN- α , β 도 Jak-STAT 경로를 통해 주조직적합복합체I (class I MHC)를 발현시키고 이것은 세포 독성 T 림프구의 세포살해능력을 강화시켜 감염된 세포의 파괴를 촉진한다^{7, 8)}. 그러나 IFN- α , β 생성이 지나치게 되면 수지상세포의 항원제시세포로의 성숙을 촉진하고 세포 독성 T 림프구를 활성화시켜 세포파괴를 유도하는 한편, IFN- α , β 와 결합한 세포에서 나오는 자가항원-항체반응을 강화시켜

나아가 염증성 장염이나, 류머티즘, 피부 결핵등과 같은 자가면역질환을 야기할 수 있다^{9,10,11)}. 따라서 염증 반응과 항염 반응의 항상성이 필수적이다.

IL-10은 활성화된 대식세포와 보조T림프구(T helper cell)에서 생산된다. IL-10은 염증반응에 대해 길항작용을 하고 면역 항상성을 유지시키는 세포활성물질로서 활성화된 대식세포와 수지상세포에서 생산된 IL-12를 억제하며 이를 통해 IFN- γ 의 생성을 억제한다. 또한 대식세포와 수지상세포의 주조직적합복합체II (class II MHC)의 발현을 억제한다^{12,13)}.

따라서 IL-10의 발현을 유지, 강화시킨다면 자가면역질환과 염증억제에 임상적인 효과를 기대할 수 있을 것이다.

黃芩은 꿀풀과에 속한 다년생 초본인 黃芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 껍질을 벗긴 뿌리로, 가을에 채취하여 잔뿌리와 곁껍질을 제거하여 건조한 것이다. 黃芩은 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血, 安胎의 효능으로 濕溫, 暑溫胸悶嘔惡, 濕熱痞滿, 瀉利, 黃疸, 肺熱咳嗽, 高熱煩渴, 血熱吐衄, 癰腫瘡毒, 胎動不安, 崩漏, 熱麻등을 主治한다^{14,15)}.

최근들어 黃芩의 항염증 효과가 보고되고 있다¹⁶⁾. 특히 黃芩의 주성분인 baicalin은 nitric oxide, 염증성세포활성물질염증, prostaglandin을 억제함으로써 염증반응을 억제하고 진통효과를 갖는다¹⁷⁾.

黃連(*Coptis chinensis*)은 미나리아재비과에 속하는 여러해살이 식물로서 苦, 寒, 無毒하고 心, 肝, 胃, 大腸 등에 작용하며, 淸熱燥濕, 淸心除煩, 火解瀉毒 등의 효능이 있어 濕熱下痢, 滿, 嘔吐吞酸, 心火亢盛, 心煩不寐, 血熱吐衄, 目赤, 消渴, 牙痛, 癰腫疔瘡, 濕疹, 濕瘡, 耳道流膿, 高熱 神昏 등을 치료한다¹⁸⁾. 특히 주성분인 berberin은 폐렴쌍구균, 콜레라균, 탄저병균, 과상풍균 및 결핵균에 항균작용이 있으며, 항염증, 지혈, 혈압강화작용 등이 보고되어 있다¹⁹⁾.

위에서 본 바와 같이 黃芩, 黃連은 각각의 약리학적인 측면에서 빈번히 보고되고 있으나, 두 약제를 배합하였을 때 배합비율에 따른 약리학적 효능은 밝혀진 바가 없다. 더욱이 黃連解毒湯, 葛根芩連湯, 半夏瀉心湯, 瀉心湯 등은 黃芩, 黃連이 배합된 처방들이다^{15,18)}.

따라서 본 연구에서는 黃芩과 黃連의 배합비율을 달리하여 그에 따른 type-I interferon IFN- α , β 의 전사인자인 IRF-1,7과 IL-10의 mRNA 발현 정도를 조사하여 黃芩, 黃連의 자가면역질환 치료에의 적용 가능성을 검토하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 재 료

1) 약 재

실험에 사용한 黃芩, 黃連은 음니허브(서울, 한국)에서 구입하여 물 1L에 100 g을 넣고 2시간 동안 전탕(버전01-DS-22MS, 중부동이사 제조)한 액을 동결 건조하여 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다.

2) 시 약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다.

LPS는 SIGMA (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방 법

1) Total RNA 추출

Total RNA는 Tri-zol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 黃芩, 黃連 추출물을 전처리한 뒤 LPS로 자극한 후 6시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml 씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol (invitrogen, USA) 용액을 1ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 두세번 잘 섞어준 뒤 12,000RPM에서 15분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 12,000RPM에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

2) Real-time PCR

Real-Time PCR은 앞에 기술한 RNA추출 방법으로 얻어서 합성한 cDNA를 사용하여 TaqMan 방법으로 확인하였고, 사용한 primer 와 probe는 아래와 같다.

Primer

TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA(mHPRT-f),
TGAGAGATCATCTCCACCAATAACTT (mHPRT-r);
CCGAAGACCTTATGAAGCTCTTTG (mIRF-1-f),
GCAAGTATCCCTTGCCATCG(mIRF-1-r);
CTGGAGCCATGGGTATGCA (mIRF-7-f),
AAGCACAAGCCGAGACTGCT (mIRF-7-r);
CCTGTGTGATGCAGGAACC (mIFN- α 4-f),
TCACCTCCCAGGCACTGA (mIFN- α 4-r);
ATGAGTGGTGGTTGCAGGC (mIFN- β -f),

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' *t*-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 結 果

1. 黃芩, 黃連 혼합물이 IFN- α , β mRNA 발현에 미치는 영향

黃芩, 黃連의 배합비율에 따른 IFN- α , β mRNA 발현을 조사하기위해 黃芩:黃連을 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:2, 1:4, 1:8과 같이 비율을 달리하여 1시간 동안 전처리한 후 LPS로 자극하고 real time PCR을 이용하여 확인한 결과 4:1, 8:1에서 IFN- α , β 의 발현을 억제하였다(Fig. 1).

2. 黃芩, 黃連 혼합물이 IRF-1,7 mRNA 발현에

미치는 영향

黃芩, 黃連의 배합비율에 따른 IFN- α , β mRNA 발현을 조사하기위해 黃芩:黃連을 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:2, 1:4, 1:8과 같이 비율을 달리하여 1시간 동안 전처리한 후 LPS로 자극하고 real time PCR을 이용하여 확인한 결과 黃芩농도 의존적으로 IRF-1,7의 발현을 억제하였다(Fig. 2).

3. 黃芩, 黃連 혼합물이 IL-10 mRNA 발현에 미치는 영향

黃芩, 黃連의 배합비율에 따른 IFN- α , β mRNA 발현을 조사하기위해 黃芩:黃連을 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:2, 1:4, 1:8과 같이 비율을 달리하여 1시간 동안 전처리한 후 LPS로 자극하고 real time PCR을 이용하여 확인한 결과 모든 배합비율에서 IL-10 발현이 유지되었다(Fig. 3).

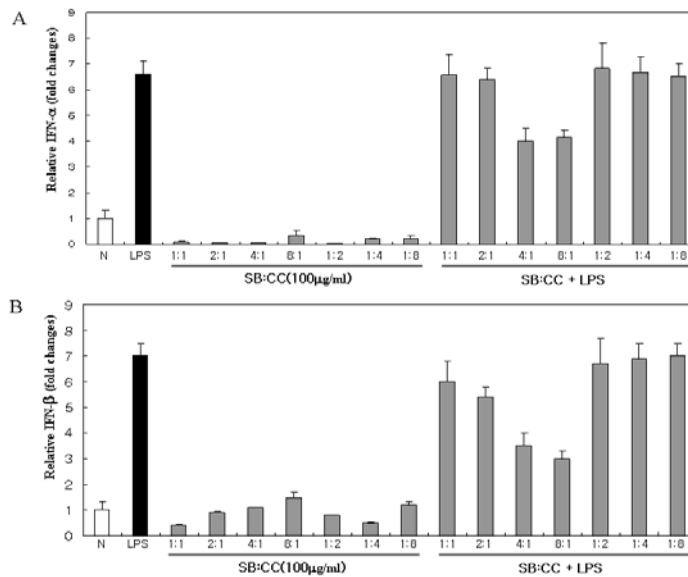


Fig. 1. Effect of mixture of SB and CC in IFN- α , β mRNA expression on LPS-induced RAW264.7 cells.

The cells were treated with 100 μ g/ml mixture of SB and CC at indicated mix proportion for 1hr, and then stimulated with 500 ng/ml LPS and incubated for 6 hrs. Detail methods were described materials and methods.

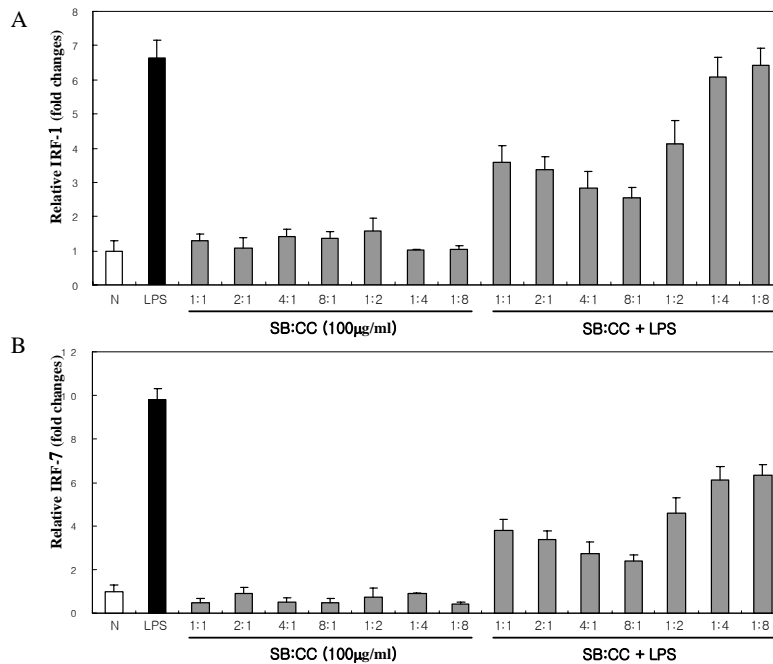


Fig. 2. Effect of mixture of SB and CC in IRF-1,7 mRNA expression on LPS-induced RAW264.7 cells

The cells were treated with 100µg/ml mixture of SB and CC at indicated mix proportion for 1 hr, and then stimulated with 500 ng/ml LPS and incubated for 6 hrs. Detail methods were described materials and methods.

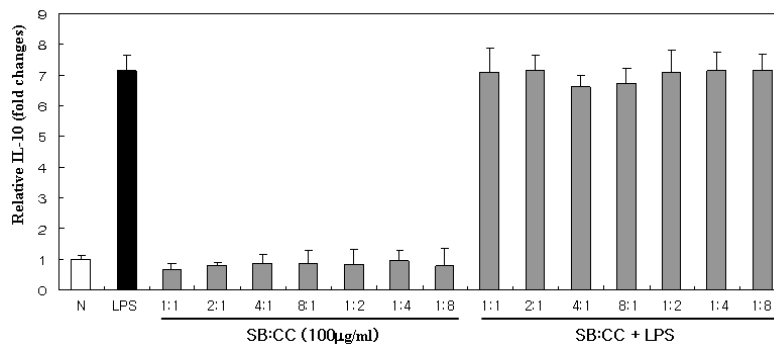


Fig. 3. Effect of mixture of SB and CC in IL-10 mRNA expression on LPS-induced RAW264.7 cells

The cells were treated with 100µg/ml mixture of SB and CC at indicated mix proportion for 1 hr, and then stimulated with 500 ng/ml LPS and incubated for 6 hrs. Detail methods were described materials and methods.

IV. 考 察

黃芩은 꿀풀과 (脣形科)에 속한 多年生草本인

黃芩의 뿌리로, 苦, 寒, 無毒 하고 肺, 膽, 胃, 大腸에 작용한다. 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血安胎 등의 효능이 있어 濕熱黃疸, 瀉痢, 熱淋, 氣分實熱, 肺熱

咳嗽, 癰腫瘡毒, 血熱의 出血, 胎熱不安 등의 병증을 치료한다^{14,15)}.

黃連은 미나리아재비과 (毛茛科)에 속한 多年生草本인 黃連 및 동속 근연식물의 근경이다. 苦, 寒, 無毒하고 心, 肝, 胃, 大腸에 작용하여 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒 등의 효능이 있어 濕熱下痢, 口吐 泄瀉, 心火亢盛, 煩燥不眠, 心煩, 胃火牙痛, 消渴, 肝火脇痛, 吐衄下穴血, 癰腫瘡毒, 耳目腫痛 등의 병증을 치료한다¹⁸⁾.

본 연구에서 사용한 그람 음성균의 외막성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 국소 염증, 항체 생산, 폐혈증과 같은 다양한 반응을 일으킨다²⁰⁾.

LPS로 유도한 IFN- α , β 의 생성을 黃芩과 黃連을 4:1, 8:1로 배합했을 때 유의성 있게 억제하였고, IRF-1,7의 mRNA 발현은 黃芩농도 의존적으로 억제하였다.

세포가 바이러스에 감염되면 TLR을 경유하여 IFN- α , β 전사인자인 IRF-1,7가 활성화되어 IFN- α , β 가 생성된다. 黃芩은 IRF-1,7의 활성화를 억제하여 IFN- α , β 의 생성을 억제하는 것으로 판단된다.

바이러스에 감염되면 항 바이러스성 세포활성물질인 IFN- α , β 가 생성되고 바이러스의 복제가 억제되는데 생성된 IFN- α , β 는 수지상세포를 항원 제시세포로 성숙시키게 되고 항원제시세포는 T림프구를 분화, 활성화시키게 된다. 만약 IFN- α , β 의 생성이 지나치거나 줄어들지 않는다면, 위의 기전이 강화되어 자가면역질환을 야기할 수도 있다.

IFN- α , β 는 류머티즘, 피부결핵등과 같은 자가면역질환에 밀접한 관련이 있는 세포활성물질로 알려져 있다^{9,10,11)}. 따라서 黃芩의 본 연구에서의 효과는 자가면역질환치료에 가능성이 있을 것으로 사료된다.

IL-10의 경우 모든 배합비율에서 IL-10의 발현 정도를 유지시켰다. IL-10은 염증성 세포활성물질에 길항작용을 가지므로서 IFN- γ 와 IL-12를 생

성을 억제시켜 대식세포를 비활성화 시킨다. 다발성 경화증 동물모델에서 개선효과를 보여주는 Glatiramer acetate이라는 화학물질은 IL-10의 발현을 유지, 증가시키는 것으로 보고 되었다^{21,22,23,24,25)}.

위의 결과로 보아 黃芩, 黃連의 배합물이 잠재적인 자가면역질환 개선효과가 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

RAW264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 黃芩, 黃連 혼합물의 IFN- α , β 억제효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃芩, 黃連을 4:1, 8:1로 배합했을 때 IFN- α , β 의 mRNA 발현을 억제하였다,
2. IRF-1,7의 발현을 黃芩 농도 의존적으로 억제하였다.
3. IL-10의 발현은 모든 비율에서 유지시켰다.

이와 같은 결과로 보아 黃芩은 IRF-1,7의 활성화를 억제하여 IFN- α , β 의 생성을 감소시키는 한편, IL-10 생성을 유지시켜 자가면역질환에 효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2006년도 상지대학교 교비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

參考文獻

1. Isaacs A, Lindenmann J. 1957. Virus interference. 1. The interferon. Proc Roy Soc B 147:258-273.
2. Journal of Cellular Biochemistry 102:1087-1094

- (2007) Non-Conventional Signal Transduction by Type I Interferons: The NF- κ B Pathway
Ziyun Du, Lai Wei, Aruna Murti, Susan R. Pfeffer, Meiyun Fan, Chuan He Yang, and Lawrence M. Pfeffer*
3. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6(9):644-58.
 4. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 2006;25(3):349-60.
 5. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005;175:5260-8.
 6. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
 7. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-189.
 8. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-995.
 9. M. Cabuk, T. Pirildar, C. Ceylan, L. Koral, C. Kirmaz, B. Kiliccioglu, E. Ozdemir, Arthritis induced by interferon- α therapy in a patient with essential thrombocythemia, *Leuk. Lymphoma* 44 (2003) 377e378.
 10. T.B. Niewold, A. Gibofsky, Concomitant interferon- α therapy and tumor necrosis factor alpha inhibition for rheumatoid arthritis and hepatitis C, *Arthritis Rheum.* 54 (2006) 2335e2337.
 11. J. Banchereau, V. Pascual, Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases, *Immunity* 25 (2006) 383e392.
 12. Boulay, J.L., O'Shea, J.J., Paul, W.E., 2003. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity* 19, 159-163.
 13. Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A., 2001. Interleukin20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 104, 9-19.
 14. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. *本草學*. 서울: 永林社. 2004:218-220.
 15. 신민교. *임상본초학*. 서울: 永林社 2002:400-401.
 16. Huang K. *The pharmacology of Chinese herbs*. 2nd edn. New York: CRC Press LLC. 1999 ;385-6, 400-1.
 17. Jung-Sook C and Hyeong-Kyu L. Wogonin inhibits excitotoxic and oxidative neuronal damage in primary cultured rat cortical cells. *European Journal of Pharmacology*. 2004; 485(1-3):105-110.
 18. 신민교. *임상본초학*. 서울: 永林社 2002:402-404.
 19. 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.
 20. Kiyoshi Takeda, Tsuneyasu Kaisho, and Shizuo Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol*, 21, 335-376.
 21. D. Teitelbaum, R. Arnon, M. Sela, Immunomodulation of experimental autoimmune

- encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 3842e3847.
22. C. Caon, M. Din, W. Ching, A. Tselis, R. Lisak, O. Khan, Clinical course after change of immunomodulating therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis, *Eur J. Neurol.* 13 (2006) 471e474.
23. H.L. Zwibel, Glatiramer acetate in treatment-naive and prior interferonbeta-1b-treated multiple sclerosis patients, *Acta Neurol. Scand.* 113 (2006) 378e386.
24. Y. Hussien, A. Sanna, M. Soderstrom, H. Link, Y.M. Huang, Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 121 (2001) 102e110.
25. P.L. Vieira, H.C. Heystek, J. Wormmeester, E.A. Wierenga, M.L. Kapsenberg, Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells, *J. Immunol.* 170 (2003) 4483e4488.