

龍膽草 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 pro-inflammatory mediator에 미치는 영향

김미선¹·조원준¹·황순이¹·이종록²·박숙자^{2,3}·김상찬^{2,3}·지선영^{1*}
대구한의대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실¹, 방제학교실²,
BK21 한방신약개발연구팀³

Inhibitory effect of Gentianae Radix MeOH extract on pro-inflammatory mediator production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells

Mi-Seon Kim¹ · Won-joon Cho¹ · Sun-yi Hwang¹ · Jong-rok Lee² · Sook-jahr Park^{2,3} · Sang-chan Kim^{2,3} · Seon-young Jee¹

In traditional oriental medicine, Gentianae Radix has been used clinically for clearing away 'heat', removing dampness and purging fire in the liver and gall bladder.

However, there has been a lack of studies regarding the effects of Gentianae Radix on the immunological activities. The present study was conducted to evaluate the effect of Gentianae Radix on the regulatory effects of cytokines and nitric oxide(NO) for the immunological activities in Raw 264.7 cells.

After the treatment of Gentianae Radix MeOH extract, cell viability was measured by MTT assay, and NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. The expression of COX-2 and iNOS was determined by immunoblot analysis, and the content of levels of cytokines in media was analyzed by ELISA kit.

Results provided evidence that Gentianae Radix inhibited the production of nitrite and nitrate (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6, and the activation of phosphotyrosine of inhibitor κ B α (p-I κ B α) in Raw 264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS).

These findings suggest that Gentianae Radix can make anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy.

Key words : Gentianae Radix, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6

서론

교신저자 : 지선영, 대구 수성구 상동 165
대구한의대학교 부속 대구한방병원 안이비인후피부과
(Tel : 053-770-2130, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr)
• 접수 2008/06/27 • 수정 2008/07/29 • 채택 2008/08/04

Macrophage는 다양한 숙주반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관여하며, 염증반응 시에

는 reactive oxygen species(ROS) 와 interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α 및 IL-6과 같은 cytokine을 생산하여 감염초기의 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포이다. Macrophage가 생성, 분비하는 IL-1 β , TNF- α 및 nitric oxide (NO)는 숙주에 치명적인 손상을 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다¹⁻⁴⁾. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응 등의 조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 최근에는 Polygonum tinctorium⁵⁾, Melia azedarach⁶⁾, Cyperus rotundus^{7,8)}, Cudrania tricuspidata⁹⁾, 當歸¹⁰⁾ 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있고 목단피¹¹⁾, 용담사간탕¹²⁾ 등에 대한 NO 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 생성억제를 연구된 바가 있다.

龍膽草(Gentianae Radix)는 신농본초경 상품에 수제되어 있는 약재로서 龍膽, 三花龍膽의 뿌리와 근경을 건조한 것으로, 우리나라 각지에 분포한다. 性味는 苦寒하며¹³⁾, 淸熱燥濕, 瀉肝膽火하는 效能이 있어 濕熱黃疸, 陰腫陰痒, 帶下, 強中, 濕疹瘙痒, 目赤耳聾, 脇痛, 口苦, 驚風抽搐을 치료 한다¹⁴⁾.

龍膽草의 성분은 gentiopicrin, swertiamarin, gentianine, gentianose 등이 알려져 있으며, 藥理作用은 위액 및 위산분비 촉진작용, 간장보호 및 담즙분비효과, 혈압강화 및 이뇨효과, 항위궤양 작용, 진통작용, 항염증작용, 항균작용, 항알레르기 작용 등이 알려져 있다^{15,16)}. 하지만 龍膽草에 대한 연구로는, 여러 종류의 xenobiotics에 대한 간손상에 대한 간 보호효과에 대한 연구¹⁷⁻¹⁹⁾가 대부분이며, 염증성 cytokine에 대한 연구는 부족하였다.

이에 저자는 염증성 반응과 관련된 단백질 및 cytokine에 관한 실험 연구를 통해 龍膽草의 항염증 효과를 살펴보기 위해 MeOH로 추출된 龍膽草 (GR)가 NO 생성, iNOS, cyclooxygenase-2 (COX-2)발현 및 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6,

tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 cytokine에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

龍膽草(대원약업사, 대구, 한국) 300g을 MeOH 2L에 넣고 2일간 추출한 후 추출물을 거름로 1차 여과하여 3,000 \times g에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 0.2 μ m filter(Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. GR의 수율은 22.2%였으며 실험에서 GR은 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였다.

2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells는 한국세포주연구재단(서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS), 100U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

3. 시약

Lipopolysaccharide(LPS)(Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, USA)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum(MTT)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, FBS와 antibiotics는 Gibco/BRL(Eggenstein, Germany)로부터 구입하였

으며, Antibody는 BD Bioscience(USA), Cayman(USA), Zymed(USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell(USA)에서 구입하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen(Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells를 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 GR을 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.01-0.3mg/ml의 농도로 GR을 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT(0.5mg/ml)를 처리하여, 4시간 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader(Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 비율로 나타내었다.

[i.e. viability(relative to control) =
absorbance of treated sample/absorbance of control].

5. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 암실에서 반응시킨 후 540nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader(Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrate를 희석하

여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

20mM Tris Cl(pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethyl-sulfonylfluoride과 1mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 \times g로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti p-I- κ B α antibody를 사용하여 p-I- κ B α protein을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2, p-I- κ B α protein의 band는 ECL western blotting detection reagents(Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

7. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells(1×10^6 /ml)을 분주하고 GR을 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 지정시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6는 ELISA Kit(Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

8. 통계적 검증

통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 이용하였고, 龍膽草의 효과를 판정하기 위하여 각 One-way ANOVA test를 시행하였고, 사후 검증으로 Turket test를 사용하여 비교하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. GR이 LPS로 활성화된 Raw cell의 NO 생성에 미치는 영향

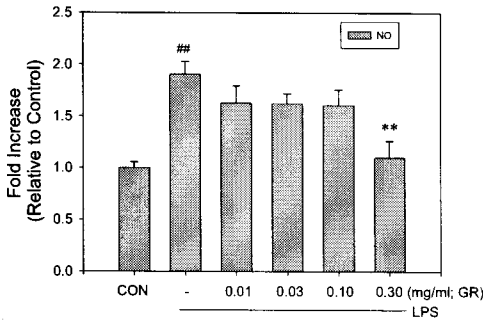


Fig. 1. Effects of GR on the production of NO in LPS stimulated Raw264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with various concentrations of AF dissolved in DMSO for 1 hr prior to the addition of LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and the cells were further incubated for 24 hr. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Materials and Methods. Data represent the mean \pm SD with eight separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Turkey test(#, significant as compared to control, ## $P < 0.01$, *, significant as compared to LPS alone, ** $P < 0.01$).

LPS를 처리한 Raw 264.7 cell에서 GR의 NO 생성 억제 정도를 관찰하기 위하여 GR을 0.01-0.3mg/ml

의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS 군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성 있게 증가하였으며, GR을 0.3mg/ml 처리한 실험군에서는 유의성 있게 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 1).

2. GR이 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

GR이 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, GR의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, GR의 농도별 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 GR은 유의한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

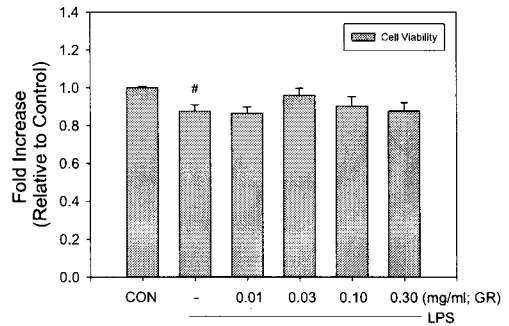


Fig. 2. Effects of GR on the cell viability in LPS stimulated Raw264.7 cells

The cell viability was measured 24 hr after treatment of cells with LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with or without GR pretreatment(i.e. 1 hr before LPS). Each bar shows the mean \pm SD with three independent experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Turkey test(#, significant as compared to control, ## $P < 0.01$).

3. GR이 LPS로 활성화된 Raw cell의 iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 영향

NO 생성 억제에 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 western blot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다.

LPS 처치 시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 GR 0.1-0.3mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었다. TPA, LPS, TNF- α 등에 의해 MEKK-1, NF κ B의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2 역시 LPS처치시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 GR을 처치한 실험군에서는 COX-2의 발현량에 변화가 없었다 (Fig. 3).

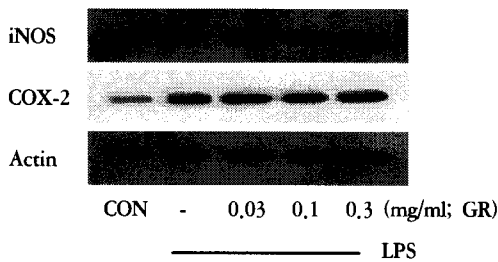


Fig. 3. Effects of GR on the induction of iNOS and COX-2 by LPS.

The levels of iNOS and COX-2 protein were monitored 18 hr after treatment of cells with LPS(1 μ g/ml) with or without GR pretreatment(i.e. 1 hr before LPS). Actin was used as a loading control.

4. GR이 LPS로 활성화된 Raw cell의 p-I κ B 발현에 미치는 영향

일반적으로 안정된 cell에서 NF κ B는 cytoplasm에서 inhibitory molecule인 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NF κ B signaling cascade가 활성화되면 I κ B, p105, p100이 degradation되면서 NF κ B가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-xL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. 본 실험에서는 I κ B α 의 phosphorylated form을 측정하였다. LPS 처치 시에는 p-I κ B α 단백질이 유도되었으나, GR 0.03-0.3mg/ml를 처치한 실험군에서는 p-I κ B α 의 양이 현저히 감소하였다(Fig. 4).

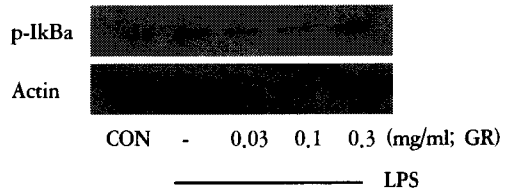


Fig. 4. Effect of GR on the induction of p-I κ B α by LPS.

AF inhibited the expression of p-I κ B α protein stimulated by LPS. The level of p-I κ B α protein was monitored 15 min after treatment of cells with LPS(1 μ g/ml) with or without GR pretreatment(i.e. 1 hr before LPS). Actin was used as a loading control.

5. GR이 LPS로 활성화된 Raw cell의 TNF- α 에 미치는 영향

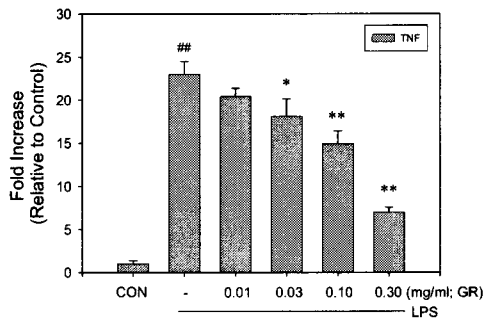


Fig. 5. The effect of GR on LPS-stimulated TNF- α production.

Production of TNF- α was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS(1 μ g/ml) in the presence or absence of GR for 24 hr. The amount of TNF- α was measured by immunoassay as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm SD with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Turkey test(#, significant as compared to control, ##P < 0.01, *, significant as compared to LPS alone, * P < 0.05, ** P < 0.01).

본 실험에서 LPS는 TNF- α 의 분비를 20배 이상 촉진시켰으며, GR 0.03-0.3 mg/ml는 LPS 단독 처치군에 비

교하여 유의한 TNF- α 의 감소를 유도하였다. 특히 0.10과 0.30 mg/ml는 p<0.01의 유의성 있는 결과를 나타내었다(Fig. 5).

6. GR이 LPS로 활성화된 Raw cell의 IL-1 β 에 미치는 영향

본 실험에서 LPS는 IL-1 β 의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, GR 0.01-0.03 mg/ml는 LPS로 활성화된 IL-1 β 를 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 6)

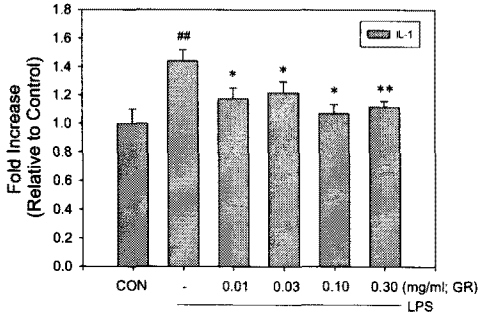


Fig. 6. The effect of GR on LPS-stimulated IL-1 β production.

Production of IL-1 β was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS(1 μ g/ml) in the presence or absence of GR for 24 hr. The amount of IL-1 β was measured by immunoassay as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm SD with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Turkey test(#, significant as compared to control, ##P<0.01, *, significant as compared to LPS alone, ** P<0.01).

7. GR이 LPS로 활성화된 Raw cell의 IL-6에 미치는 영향

본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, GR 0.03-0.30 mg/ml는 LPS로 활성화된 IL-6를 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 7).

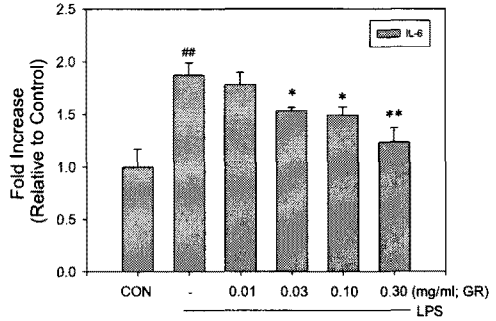


Fig. 7. The effect of GR on LPS-stimulated IL-6 production.

Production of IL-6 was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of GR for 24 hr. The amount of IL-6 was measured by immunoassay as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm SD with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Turkey test(#, significant as compared to control, ##P<0.01, *, significant as compared to LPS alone, ** P<0.01).

고 찰

龍膽草는 苦寒하고 入肝하며 濕熱黃疸, 陰腫陰痒, 帶下, 強中, 濕疹癢痒, 目赤耳聾, 脇痛, 口苦, 驚風抽搐을 치료한다¹⁴⁾. 龍膽草의 藥理作用은 위액 및 위산 분비촉진, 간장보호, 담즙분비촉진, 혈압강하, 이뇨, 항위궤양, 진통, 항염증, 항균, 항알레르기 작용 등이 알려져 있다^{15,16)}.

현재까지 龍膽草의 효능에 대한 연구로는, 한¹⁷⁾이 龍膽草 수침액을 양측 肝俞에 0.2 ml를 처치함으로써 사염화탄소로 유발된 백서의 간손상을 회복시킴을 보고하였으며, 문 등²⁰⁾은 龍膽草 수침액을 양측 陽陵泉(GB34)에 0.1ml를 처치함으로써 0.5% cholesterol과 0.25% sodium cholate를 첨가한 사료로 유발된 백서의 담석증에 유효함을 보고하였다. 또한 Kumazawa 등¹⁹⁾은 龍膽草가 alpha-naphthylisothiocyanate(ANIT)로 유도된 rat의 간

손상에 대한 補肝작용을 가진다고 보고하였고, Tang 등¹⁸⁾은 龍膽草가 Hepatic virus C(HVC)-RNA의 복제를 유의하게 억제한다고 하였다. 또한 김 등²¹⁾은 龍膽草 추출물의 활성성분인 n-BuOH 가용부를 대상으로 column chromatography를 실시하여 5-(hydroxymethyl)-2-furfural을 동정하여 이 물질이 IFN- γ 와 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 NO의 생성을 억제함을 밝힌 바가 있다. 그러나 龍膽草가 염증반응에 개재되는 단백질 및 cytokine에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 MeOH로 추출된 龍膽草 (GR)가 LPS로 활성화 된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하였다.

산화적 스트레스는 활성산소종/활성질소종(ROS/RNS)의 발생과 항산화 방어체계에 심각한 불균형이 초래되는 상황이다. Free radical gas인 산화질소(NO)는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다^{22,23)}. iNOS는 염증성 중성구, 대식세포에서 생성되고, constitutively expressed NOS(cNOS)는 중성구에서 생성되며, 저농도에서 생리적으로 작용한다²⁴⁾. NOSs는 cNOS와 iNOS로 나눌 수 있는데, cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS(ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS(ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체 내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 iNOS는 LPS, IFN- γ , IL-1 및 TNF- α 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발

에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다^{5,6,9,25,26)}.

Raw 264.7 cell에서 GR의 NO 생성 억제 정도를 관찰하기 위하여 GR을 0.01-0.30mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성 있게 증가하였으며, GR 0.30mg/ml 처치한 실험군에서는 유의성 있게 NO의 생성을 억제하였다.

GR이 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, GR의 세포독성으로 인한 세포수의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, GR을 농도별로 처치하고, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 GR 0.01-0.30mg/ml의 농도는 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

GR의 NO 생성 억제에 관한 iNOS단백질의 발현 변화를 조사하기 위하여 western blot을 이용하여 세포질 내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS 처치 시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 GR 0.10mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었으며, GR 0.03 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소되는 것을 관찰하였다(Fig. 3).

일반적으로, COX-2는 TPA, LPS, TNF- α , ROI 등의 pro-inflammatory 자극이나 prooxidant에 의해 NF- κ B의 활성화를 경유하여 생성되고, prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{27,28)}. 또 monocyte에서 COX-2의 발현은 pro-inflammatory agent인 IL-1 β , TNF- α 와 LPS, fibroblast growth factor 등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현 억제가 유도된다²⁹⁾. 그러므로 COX-2에 선택적인 저해제의 개발은 염증 치료의 target molecule이 되고 있다³⁰⁾.

본 실험에서 LPS 처치 시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 GR 0.03-0.3 mg/ml을

처치한 실험군에서는 COX-2의 발현 변화를 유도하지 못하였다. 이러한 결과는 Chun 등³¹⁾의 연구에 의하면, mouse 피부조직에서 NF- κ B의 활성화에 의해 NO는 COX-2의 발현을 증가시킨다는 결과와는 부분적으로 상치되는 결과이다. 이러한 이유는 龍膽草가 다성분의 복합체이므로, 龍膽草의 특정성분 또는 분획이 NO로부터 COX-2의 발현이 증가되는 어떠한 경로를 차단하고 있을 가능성도 있으므로, 차후 이 분야에서는 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

iNOS나 COX-2의 발현에 관여하는 전사조절인자로는 NF- κ B, AP-1, C/EBP등이 있으며³⁰⁾, 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NF- κ B이다³²⁾. NF- κ B는 세포자멸사의 억제, 세포주기조절, oncogenesis 등과도 관련되어 있으며³³⁾, virus나 bacteria 감염 시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF- α 유전자의 발현에 관여한다³⁰⁾. 일반적으로 resting cell에서 NF- κ B는 세포질에서 inhibitory molecule인 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NF- κ B signaling cascade가 활성화되면 I κ B, p105, p100이 인산화되면서 NF- κ B가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-xL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. I κ B protein의 종류는 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ 등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NF- κ B의 inhibitory protein은 I κ B α 이다³⁴⁾. 본 실험에서는 I κ B α 의 phosphorylated form을 측정하였다.

LPS 처치 시에는 p-I κ B α 단백질이 유도되었으나, GR 0.03-0.30mg/ml를 처치한 실험군에서는 p-I κ B α 의 양이 줄어들었다. 이는 iNOS의 감소기전에, NF- κ B의 핵으로의 translocation이 GR에 의해 억제됨을 간접적으로 시사하는 것이라 할 수 있다.

TNF- α 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다³⁰⁾. 주로 mononuclear phagocyte에서 분비된 TNF- α 는

중성구와 단핵구를 감염 장소로 이동시켜서 이들 세포들이 microbes를 제거하도록 하는 역할을 한다. 또한 TNF- α 는 내피세포에 부착분자(adhesion molecules)의 발현을 자극하고, macrophage와 내피세포가 chemokine을 분비하도록 자극한다. TNF- α 는 심각한 감염 시 다량으로 생산되어 발열 등을 포함한 전신적 반응을 유도하기도 하지만, 극단적으로 다량 생산될 경우 혈관 내 혈전 또는 septic shock을 유도하기도 한다³⁵⁾.

본 실험에서 LPS는 media 중의 TNF- α 의 함량을 20배 이상 증가시켰다. GR의 0.01mg/ml에서는 유의한 감소가 없었으나, GR의 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml의 농도에서는 유의한 TNF- α 의 감소를 유도하였다.

한편, IL-1 β 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF- α , IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 β 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화 한다³⁵⁾. 또한 IL-1은 septic shock³⁶⁾, burn³⁷⁾, 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury³⁸⁾의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide 등의 매개물 질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다³⁹⁾.

본 실험에서 LPS는 IL-1 β 의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, GR은 실험에 사용된 전 농도에서 유의성 있는 감소를 유도하였다. 특히 0.30mg/ml의 농도에서는 p < 0.01의 유의성 있는 감소를 유도하였다.

활성화된 mononuclear phagocyte, 내피세포, fibroblast 등에 의해 분비되는 IL-6는 내재면역과 획득면역에 관련한다. IL-6는 B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 보고 되고 있다³⁵⁾.

본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, GR의 0.01mg/ml에서는 유의한 감소가 없었으나, GR의 0.03, 0.10, 0.30mg/ml의 농도에서는 유의

하게 IL-6의 농도를 감소시켰다.

이러한 연구결과는 GR이 NF- κ B의 억제단백질중의 하나인 I κ B α 의 인산화를 억제하여 NF- κ B가 핵안으로 translocation되는 기전을 억제하며, 그러한 결과로 NO, iNOS, THF- α , IL-1 β , IL-6이 감소된다는 것을 의미한다.

결 론

龍膽草 MeOH 추출물(GR)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 NO의 생성, iNOS 및 COX-2의 발현, cytokine의 level에 미치는 영향을 검토한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GR 0.30mg/ml은 Raw cell에 대한 세포독성을 유발하지 않았으며, LPS로 유도된 NO의 증가를 유의하게 감소시켰다.
2. GR 0.10과 0.30mg/ml은 LPS로 활성화된 Raw cell의 iNOS 발현을 감소시켰다.
3. GR은 LPS로 활성화된 Raw cell의 I κ B α 의 인산화를 감소시켰다.
4. GR은 LPS로 활성화된 염증관련 매개물질인, TNF- α , interleukin을 유의하게 억제하였다.

이러한 결과는 龍膽草가 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 NO 및 과량의 pro-inflammatory cytokine 생성과 관련된 면역질환의 조절에 활용될 수 있다고 생각된다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 한국보건산업진흥원 한방바이오퓨전연구지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.(B050035)

參考文獻

1. Mc daniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 1996;211:24-32.
2. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 1990;144:1425-31.
3. Corbett JA, and Mac Daniel ML. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. J Exp Med. 1995;181:559-68.
4. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 1994;6:399-406.
5. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 2000;28:217-26.
6. 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- carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol. 2000;406:301-9.
7. Seo WG, Pae HO, Oh GS, KY Chai, Kwon TO, YG Yun, NY Kim, HT Chung.

- Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:59-64.
8. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2003;17(3):771-6.
 9. 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 and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 2000;35:21-8.
 10. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정헌택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀 에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의약방제학회지.* 2002;10(2):189-97.
 11. Chun SC, Jee SY, Lee SG, Park SJ, Lee JR, Kim SC. Anti-Inflammatory Activity of the ethanol Extract of Moutan Cortex in LPS-Activated Raw 264.7 Cells. *eCAM.* 2007;4(3):327-33.
 12. Lim JH, Lee JR, Kim SC, Jee SY. Inhibitory effect of Yongdamsagantang water extract on IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *OPEM.* 2007;7(3):321-9.
 13. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. *중약대사전.* 서울:정담. 1998:2836.
 14. 전국한의학대본초학교수. *본초학.* 서울:영림사. 1992:184.
 15. 木村正康. *漢方藥理學.* 南山堂:東京. 1997:364-5.
 16. *한방약리학 교재편찬위원회.* *한방약리학.* 서울:신일상사. 2006:594-5.
 17. 한상원. 龍膽草(龍膽草) 및 시호수침(柴胡水鍼)이 CCl₄ 로 유발된 흰쥐의 손상 간에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 1993;10(1):297-313.
 18. Tang ZM, Peng M, Zhan CJ. Screening 20 Chinese herbs often used for clearing heat and dissipating toxin with nude mice model of hepatitis C viral infection. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2003;23(6):447-8.
 19. Kumazawa N, Ohta S, Tu SH, Kamogawa A, Shinoda M. Protective effects of various methanol extracts of crude drugs on experimental hepatic injury induced by alpha-naphthylisothiocyanate in rats. *Yakugaku Zasshi.* 1991;111(3):199-204.
 20. 문성호, 박동석, 안병철. 농도별 초용담(草龍膽) 수침이 담석 유발 생쥐에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 1991;8(1):141-56.
 21. 김나영, 강태현, 김도훈, 김윤철. 용담의 RAW 264.7 세포주에서의 Nitric Oxide 생성 저해 물질. *생약학회지.* 1999;30(2):173-6.
 22. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
 23. 임동건. 산화 스트레스; 활성산소종과 산화질소. *대한중환자의학회지.* 2004;19(2):81-5.
 24. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase; a little bit og good in all of us. *Gut.* 2000; 47:6-9.
 25. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001; 69:625-35.

26. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:119-23.
27. Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(8):1091-7.
28. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* 2001;480-481:243-68.
29. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(2):116-23.
30. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology.* 2003;139:11-20.
31. Chun K, Cha H, Shin J, Na H, Park K, Chung W, Surh Y. Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF- κ B. *Carcinogenesis.* 2004;25(3):445-54.
32. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 오미소독음이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2002;16(2):921-7.
33. Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Curr Pharm Des.* 2005;11(24):3141-58.
34. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 2001;159(2):387-97.
35. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 2003;37(6):355-61.
36. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 1993;119:771-8.
37. Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1b in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:311-9.
38. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation.* 1997;63:143-8.
39. Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery.* 2004;135(5):544-54.