

황촉규 추출물의 Nitric Oxide 생성 저해활성

박은영 · 양기숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received March 27, 2008; Revised July 21, 2008)

Inhibition of Nitric Oxide Production by the Extracts of *Hibiscus manihot*

Eun Young Park and Ki Sook Yang[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Anti-inflammatory activity of the extracts of *Hibiscus manihot* was investigated through the evaluation of its inhibitory effect on the production of inflammatory biomarkers (i-NOS, COX-2) in RAW264.7 murine macrophage cells. Among the sequential solvent fractions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol and water), the fractions of dichloromethane (1 µg/ml) and ethyl acetate (5 µg/ml) showed potential inhibitory activities on i-NOS and COX-2 activity in RAW264.7 cells. These results suggest that *Hibiscus manihot* might have an anti-inflammatory activity through the suppression of inflammatory markers.

Keywords □ *Hibiscus manihot*, i-NOS, COX-2, RAW264.7 cells

황촉규(*Hibiscus manihot* Linne)는 아욱과(Malvaceae)에 속하는 중국 원산의 식물로서 민간에서 뿌리는 점활제 또는 위염, 위궤양, 인후염치료, 종자는 이뇨 및 유즙분비 촉진 등에 이용된다. 뿌리에 D-galactose, L-alvinose, L-rhamnose, xylose, glucose, D-galacturonic acid, aldovionic acid, rhamnogalacturonic acid 등의 당류와 점액질이 풍부하고^{1,2)} 꽃은 flavonoid를 함유하는 것으로 알려져 있다.³⁾ Nitric oxide(NO)는 무기저분자 라디칼로서 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할을 하고 있다.^{4,5)} Inducible nitric oxide synthase (i-NOS)는 외부상처에 대한 반응 및 염증 같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokines인 interleukin 1 α 이나 tumor necrosis factor, 염증원인 내독소(lipopolysaccharide: LPS) 등에 의해 유도되고 glucocorticoids에 의해 그 효소의 유도가 저해되며^{6,7)} 특히 i-NOS에 의해 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다.⁸⁾ 염증상태에서 i-NOS에 의해 생성된 NO가 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐 아니라,⁹⁾ cyclooxygenase를 활성화하여¹⁰⁾ prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여

염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 따라서 iNOS에 의한 NO의 생성을 저해하는 새로운 염증치료제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.^{12,13)}

황촉규의 뿌리는 점액이 많아 점활제로 이용되고 있으며 지상부는 자원이 풍부함에도 불구하고 연구된 바 없다. 이에 지상부를 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol 및 물분획물로 나누어 RAW264.7 cell을 이용한 항염활성을 평가하였다.

재료 및 방법

시료

본고 약초원에서 황촉규의 지상부(220 g)를 채취하여 건조한 다음 분쇄기로 갈아 세말로 하였다. 세말화한 재료를 100% MeOH로 70°C에서 4회 환류냉각 추출 후 여과하고 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다(18.9 g). 이 MeOH 추출물을 계통적 추출방법에 의하여 hexane 분획물(1.7 g), dichloromethane 분획물(1.8 g), ethylacetate 분획물(1.0 g), butanol 분획물(1.6 g) 및 물분획물(2.0 g)로 한 것을 시료로 하였다.

세포 및 시약

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양받아 배양하였고, 100 units/

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9578 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) ksyang@sookmyung.ac.kr

mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3~4일에 한번씩 계대 배양을 시행하였다. Lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* serotype 0111:B4)를 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

세포독성평가

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/mL)를 18시간 전 배양하고 시험 액물과 LPS(1 μg/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma) 100 μg을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma) 150 μL를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 micro-plate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 조사하였다.

Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포에 대하여 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 48 well plate에 접종하고, 시료와 LPS(1 μg/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 μL를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁴⁾ 표준농도 곡선은 sodium nitrite(NaNO₂)를 단계적으로 희석하여 얻었다.

또한, 현재 알려진 NO 생성을 억제하는 물질로 L-arginine의 구조 유사체인 N-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)와 비교하여 i-NOS 유도후 단계에 미치는 영향을 비교조사하였다.

Immunoblotting

RAW 264.7 세포(1×10^6 cells/mL)를 18시간 전 배양하고, LPS(1 μg/mL)로 자극을 주고 시료 10 μg/mL를 동시에 처리하여 전 배양과 동일조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 2~3회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 300 μL의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 세포막 성분등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 15 μg의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane(Millipore)에 20 V로 overnight transfer하였다. Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBS 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다.

단백질의 발현 정도를 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-mouse i-NOS(BD Transduction), anti-mouse COX-2(BD), beta-actin antibody(cell signaling)를 TBS용액에서 희석(1 : 2000)하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로서 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(cell signaling)를 1 : 2000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후, TBS로 4회 세정하여 ECL(Amersham Co.)과 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

통계학적 분석

모든 실험결과는 mean ± SD로 나타내었으며 자료분석은 student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

세포 독성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/mL)에 시료와 LPS(1 μg/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양한 후, MTT assay 방법을 이용하여 세포생존율을 확인한 결과, 모든 분획물에서 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

분획물의 LPS에 의해 유도된 NO 생성 저해활성

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide(NO) 생성에 대한 시료의 효과를 측정하였다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 분석하였다. 동속식물로 알려진 히비스커스(*Hibiscus sabdariffa*)는 염증 점막조직에 보호막을 형성하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ LPS의 단독투여와 LPS와 시료의 혼합투여에 의하여 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 존재하는 nitrite(NO₂)의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정하였다.

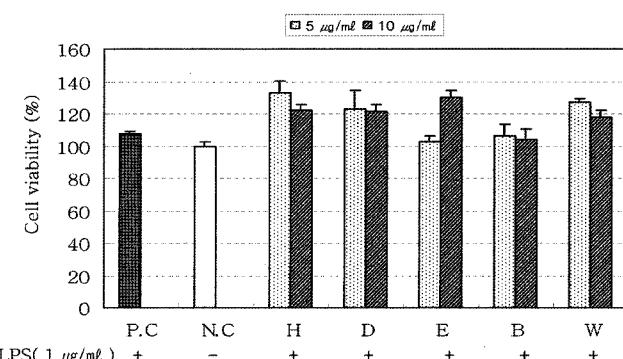


Fig. 1 – Effect of sequential solvent fractions of *Hibiscus manihot* (5, 10 μg/mL) on the viability of RAW 264.7 cells with LPS (1 μg/mL). Results were expressed as % of N.C. (P.C: (+) LPS group, N.C: (-) LPS group, H: hexane, D: dichloromethane, E: ethylacetate, B: butanol, W: H₂O).

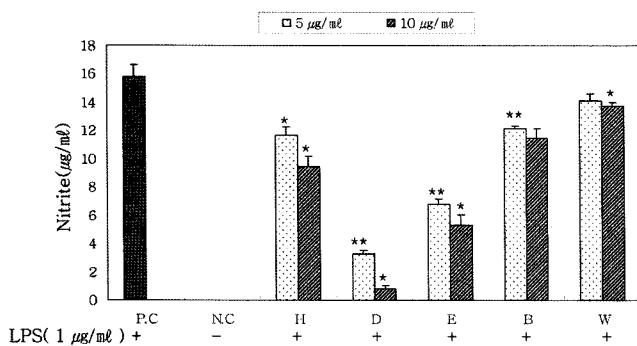


Fig. 2 – Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by the sequential solvent fractions of *Hibiscus manihot*. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/ml) were incubated for 24 hrs in DMEM containing 10% FBS and were treated for 18 hrs with fractions and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each value represents the mean \pm S.D (n=3). Significantly different from LPS control, * p < 0.01, ** p < 0.001 (P.C: (+) LPS group, N.C: (-) LPS group, H: hexane, D: dichloromethane, E: ethylacetate, B: butanol, W: H_2O).

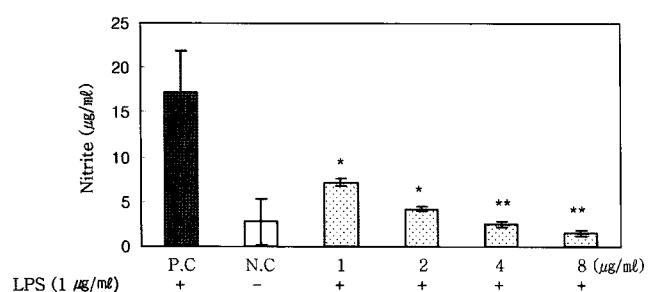


Fig. 3 – Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by dichloromethane fraction in *Hibiscus manihot*. RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/ml) were incubated for 24 hrs in DMEM containing 10% FBS and were treated for 18 hrs with dichloromethane fractions (1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each value represents the mean \pm S.D (n=3). Significantly different from LPS control, * p < 0.01, ** p < 0.001 (P.C: (+) LPS group, N.C: (-) LPS group, H: hexane, D: dichloromethane, E: ethylacetate, B: butanol, W: H_2O).

NO 생성에 미치는 영향을 측정한 결과 대부분의 분획에서 억제 작용을 나타내었으며 특히 dichloromethane은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 ethylacetate 분획은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군인 LPS 단독처리군에 비해 50% 이상의 현저한 NO 생성 억제효과를 나타내었다¹⁶ (Fig. 2, 3). 또한, L-NMMA와 비교한 기질적 저해효과도 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 dichloromethane과 ethylacetate 분획이 현저한 NO 생성 억제효과를 나타냈다(Fig. 4).

i-NOS 발현에 미치는 영향

i-NOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면

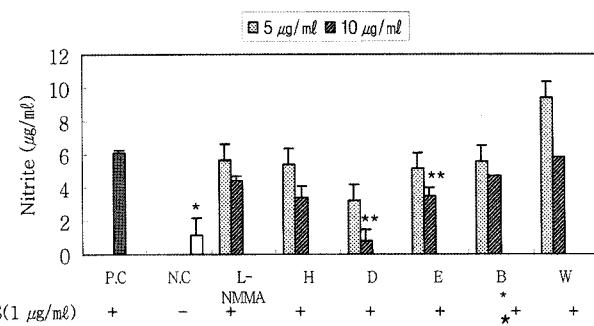


Fig. 4 – Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by solvent fractions of *Hibiscus manihot*. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/ml) were incubated with effector for 20 hrs after LPS-activation for 20 hrs by LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). NO released into the cell culture medium was measured by Griess reagent in the nitrite form. Each value represents the mean \pm S.D (n=3). Significantly different from LPS control, * p < 0.01, ** p < 0.001 (P.C: (+) LPS group, N.C: (-) LPS group, H: hexane, D: dichloromethane, E: ethylacetate, B: butanol, W: H_2O).

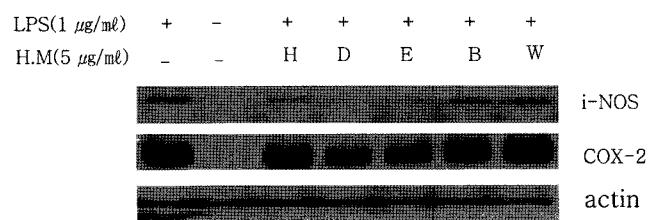


Fig. 5 – The protein level of i-NOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in presence of *Hibiscus manihot* (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (H.M: *Hibiscus manihot*, H: hexane, D: dichloromethane, E: ethylacetate, B: butanol, W: H_2O).

장시간 동안 다양한 nitric oxide(NO)를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고, 염증상태에서 i-NOS에 의해 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁹

RAW 264.7 세포에 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하여 i-NOS의 생성을 유도한 후 시료의 단백질 발현에 대한 억제정도를 immunoblotting을 이용하여 측정하였다. 그 결과 단백질 수준에서도 dichloromethane 분획물 및 ethylacetate 분획물이 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 LPS 단독처리군에 비해 강한 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 NO의 생성억제가 i-NOS 발현억제를 통한 것으로 사료된다(Fig. 5).

COX-2 발현에 미치는 영향

다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억

제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것이다. COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘어 지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin의 합성에 작용하며, 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다.^{20,21)} 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다. RAW 264.7 세포에 LPS(1 µg/ml)로 자극을 주고 시료를 처리하여 확인한 결과 5 µg/ml 농도에서 dichloromethane 분획물이 가장 강한 억제 효과를 나타내어 우수한 항염활성이 있음을 확인하였다.

결 론

황축규 지상부 메탄올 엑스의 hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol, 물 분획물을 시료로 하여, 세포독성 및 NO 생성저해활성을 이용한 항염활성을 측정한 결과 세포생존율에는 영향을 미치지 않았고 dichloromethane, ethylacetate 분획물에서 유의성 있는 억제 작용을 나타내었으며 특히 dichloromethane 분획물은 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 NO 생성 저해활성을 나타내었다. 또한 dichloromethane, ethylacetate 분획물들은 i-NOS 유도가 완료된 후 기질에 작용하여 NO를 생성하는 단계에서도 NO 생성 저해효과를 나타내었다. 또한, 단백질 발현에 대한 억제 정도를 측정한 결과, 5 µg/ml 농도에서 i-NOS와 COX-2에서 강한 억제효과를 나타내어 항염증제로서의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 SRC 여성질환연구센터 특별연구비 지원(2008)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 배기환 : 한국의 약용식물, (주)교학사, 서울 p. 333 (2003).
- 2) 한국 약용식물학 연구회 : 종합 약용식물학, 학창사, 서울 p. 231 (2004).
- 3) Qiu, Y. : Extraction and determination of total flavones content in *Hibiscus manihot* flower. *J. Herbal Nornal University Natural Science* **30**, 713 (2006).
- 4) Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. : Endotherium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9265 (1987).
- 5) Angus, J. A. and Cocks, T. M. : Endotherium derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* **41**, 303 (1989).

- 6) Knowles, R. G., Salter, M., Brooks, S. L. and Moncada, S. : Anti-inflammatory glucocorticoids induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung. Liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1042 (1990).
- 7) Rees, D. D., Cellek, S., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. : Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone : an insight into endotoxic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 541 (1990).
- 8) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
- 9) Aeberhard, E. E., Henderson, S. A., Arabolos, N. S., Griscavage, J. M., Castro, F. E., Barrett, C. T. and Ignarro, L. J. : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 1053 (1995).
- 10) Salvemini, D., Milko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. : Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7240 (1993).
- 11) McCartney-Francis, N., Allen, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wal, S. M. : Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749 (1993).
- 12) Pellat-Deceunynck, C., Wietzerbin, J. and Drapier, J. C. : Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophage. *Biochem. J.* **297**, 53 (1994).
- 13) Yu, S. M. : Thaloporphine selectively inhibits expression of the inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase. *Biochem. J.* **303**, 289 (1994).
- 14) Ffeilisch, M. and Stamler, J. : Methods in nitric oxide research. John Wiley and Sons, p. 492 (1955).
- 15) Ben-Erik, W. and Michael, W. : Medicinal plants of the world. Briza Publication, p. 170 (2007).
- 16) Jang, M. J., Rhee, S. J., Cho, S. H., Woo, M. H. and Choi, J. H. : A Study on the anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of *Zanthoxylum piperitum* DC. *Extract* **35**, 21 (2006).
- 17) Dorman, H. J., Bachmayer, O., Kosar, M. and Hiltunen, R. : Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 762 (2004).
- 18) Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes-Ferreira, M. : Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.* **160**, 1025 (2003).
- 19) Tesuka, Y., Irikawa, S., Kaneko, T., Bankota, A. H., Nagaoka, T., Xiong, Q., Hase, K. and 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 (2001).
- 20) Masferrer, J., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K. : Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3228 (1994).
- 21) Hyun, E. A., Lee, H. J., Yoon, W. J., Park, S. Y., Kang, H. K., Kim, S. J. and Yoo, E. S. : Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage RAW264.7. *Yakhak Hoeji* **48**, 159 (2004).