

## 續斷의 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증반응에 대한 효과

민지영<sup>1</sup>, 박용기<sup>1,2\*</sup>

1: 동국대학교 한의과대학 본초학교실 2: 동국대학교 한방신약개발센터

### Effect of Dipsaci Radix Water Extract on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Mouse Macrophages

Ji Young Min<sup>1</sup>, Yong-Ki Park<sup>2,\*</sup>

1: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University  
2: Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : In this study, the effect of Dipsaci Radix(DR, *Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et T. M. Ai) water extract on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells were investigated.

**Methods** : Dried roots of DR was extracted with water for 3 h(DR-W extract). RAW264.7 cells, a mouse macrophage line, were incubated with different concentrations of DR-W extract for 30 min and then stimulated with LPS at indicated times. Cell toxicity was determined by MTT assay. The concentrations of nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) were measured by Griess assay and enzyme immunoassay (EIA), respectively. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 mRNA and protein was determined by RT-PCR and Western blot, respectively.

**Results** : DR-W extract was significantly inhibited LPS-induced productions of NO and PGE<sub>2</sub> in RAW264.7 cells. DR-W extract was not suppressed the expressions of iNOS mRNA and protein in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

**Conclusions** : This study suggests that DR-W extract can attenuate inflammatory response via inhibition of the NO and PGE<sub>2</sub> production in activated macrophages.

**Key words** : Dipsaci Radix, inflammation, macrophage, nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub>

#### 서 론

염증반응은 인체 내 대부분의 기관에서 유발되는 기본적인 면역반응으로 급성과 만성으로 나누어지는데<sup>1)</sup>, 급성 염증반응은 물리적 자극이나 외부 감염 등에 의해 즉각적으로 조직손상을 유발하는 반면, 만성 염증반응은 급성보다 오래 걸리고 지속적이며 단핵구나 대식세포, 림프구, 혈장세포 등의 침윤을 동반하는 특징이 있으며, 조직 파괴와 치유과정을 통해 혈관신생이나 섬유화를 유발하

게 된다<sup>1,2)</sup>. 대식세포(macrophage)는 동물체내 모든 조직에 분포하며 인체 내 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로서 외부로부터 침입하는 이물질이나 세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 식균작용과 함께 다양한 염증물질들을 다량 분비함으로써 초기 염증반응에서 핵심적인 역할을 한다<sup>3)</sup>. 대식세포는 병원균과 같은 외부 자극원의 자극에 의해 활성화됨으로써 혈관활성아민류(norepinephrine), 아라키돈산 대사물(prostaglandins, leukotriene, lipoxin), 염증사이토카인류(tumor necrosis factor-

\* 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr  
· 접수 : 2009년 11월 23일 · 수정 : 2009년 12월 14일 · 채택 : 2009년 12월 21일

alpha; TNF- $\alpha$ , interleukin-1, IL-6, granulocyte macrophage-colony stimulating factors; GM-CSF), 혈소판활성인자, 산화질소(nitric oxide, NO), 활성산소종(reactive oxygen species) 등 다양한 염증매개물질들을 분비함으로써 면역 조절을 통해 생체 내 방어기능과 항상성 유지 기능을 조절하는 반면, 염증을 유발함으로써 각종 만성적 염증질환 발병에 기여하게 된다<sup>4-7)</sup>. 따라서 대식세포의 활성을 어떻게 조절되는가를 이해하고, 활성화된 대식세포로부터 분비되는 각종 염증물질을 억제시키는 것은 여러 원인에 의해 발생하는 염증질환의 진행을 막아줄 수 있는 유효한 치료방법이 될 수 있다<sup>7,8)</sup>. 최근에는 다양한 한약재를 이용하여 각종 염증질환에서 대식세포의 활성조절과 항염증효과에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>9-14)</sup>.

續斷(Dipsaci Radix)은 산토끼과(Dipsacaceae)에 속하는 多年生 草本인 川續斷(*Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et T. M. Ai) 또는 산토끼꽃(*D. japonicus* Miq.)의 뿌리로서 가을에 채취하여 根頭와 尾稍 및 細根을 제거하고 微火로 烘乾하여 사용하는데, 주로 骨筋을 이으며 質박, 質상을 다스리고 固精하는 데 사용한다. 한의학에서 續斷은 補肝腎, 續筋骨, 調血脈, 治腰背酸痛, 足膝無力, 胎漏, 崩漏, 帶下, 遺精, 跌打損傷, 金瘡, 痔漏, 癰疽瘡腫 등으로 肝腎의 기능이 부족하여 나타나는 腰膝酸痛과 崩漏胎動 및 外傷으로 인한 筋骨의 손상 또는 關節不利 등의 병증에 대하여 좋은 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>. 續斷에 대한 실험연구로는 續斷 물추출물의 중풍 모델 흰쥐에서 중추신경계 손상에 따른 근섬유위축의 억제효과<sup>16)</sup> 및 골밀도 증가효과<sup>17)</sup>, 생리활성성분인 SD62-122의 치은염유아세포에 대한 치주재생효과<sup>18)</sup> 및 흰쥐 두개골세포의 분화유도효과<sup>19)</sup>, dichloromethane 분획물의 태아골모세포에 대한 골조직 재생과 골결절 형성 효과<sup>20)</sup> 등이 보고되었으며, 사포닌 성분의 항암효과<sup>21)</sup>에 대한 보고가 있다. 그러나 續斷의 대식세포에서의 염증반응 억제 효과에 대한 보고는 찾아 볼 수 없었다.

따라서 본 연구에서는 續斷 물추출물의 대식세포에서의 염증반응 억제효과를 조사하였으며, 이에 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 續斷(Dipsaci Radix; DR, *Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et T. M. Ai)은 가을에 채취하여 根頭와 尾稍 및 細根을 제거하고 微火로 烘乾한 것을 (주) 광명당 제약(울산, 한국)으로부터 구입하였으며 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 검정하고 정선한 것을 사용하였다.

### 2) 시약

실험에 사용된 시약은 lipopolysaccharide(LPS; *E. coli* B0111:B4; Sigma, St Louis, MO, USA), 3-(4,5-dimethyl thazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide(Sigma), QIAzol reagent (Quigen, Maryland, USA), Improm-II<sup>TM</sup> reverse transcriptase (Promega Co Ltd, WI, USA.), Protein assay solution (BioRad Laboratories Inc, Hercules, CA), 30% Acrylamide solution (BioRad Laboratories Inc), M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo, Rockford, USA), UltraPure<sup>TM</sup> DEPC-treated water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), N-trityl-1,3-propanediamine acetate (Sigma), Sulfanilamide (Sigma), anti-iNOS antibody (BD Pharmingen<sup>TM</sup>, Franklin Lakes, NJ USA), anti-COX-2 antibody (Cell Signaling Technology INC, Danvers, MA, USA.), anti- $\beta$ -Actin (Sigma), PGE<sub>2</sub> EIA kit (R&D System, Inc, Minneapolis, MN, USA) 등이다.

## 2. 방법

### 1) 續斷 추출물 제조

건조된 續斷의 뿌리(100 g)를 grinder를 이용하여 분쇄한 후 증류수 1L를 가하고 추출기에서 3시간 동안 전탕하였으며, 2겹 거어즈와 와트만여과지(Whatman paper No. 1)로 흡입여과한 후 감압농축하여 21.2 g의 수율로 續斷 물추출물(DR-W extract)을 얻었다.

### 2) 세포배양

쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC<sup>®</sup>, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며, 10% inactivated fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 3) 세포독성 조사

RAW264.7 세포( $5 \times 10^4$  cells/well)를 96-well culture plate에 100  $\mu$ l의 DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 후 다양한 농도의 續斷 물추출물을 30분간 전처리 한 다음 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 5  $\mu$ l씩 넣은 후 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 100  $\mu$ l의 DMSO 용액을 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색정도를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성(cell toxicity)은 세포만 배양한 무처리구의 생존도 100%를 기준으로 약물처리구의 상대적인 세포생존도(cell viability, %)를 계산하였다.

4) Nitric oxide 측정

RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO의 양을 세포배양액 중 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용하여 측정하였다. 즉 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 續斷 물추출물을 30분간 전처리한 다음, LPS (1 µg/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 100 µl에 동일한 양의 Griess 시약(0.1% NED/1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 넣은 후 15분간 암반응 하였다. 발색정도를 microplate reader의 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, 세포배양액 내 NO의 농도(µM)는 NaNO<sub>2</sub> 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) Prostaglandin E<sub>2</sub> 측정

활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증물질인 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 양을 세포배양액으로부터 효소면역반응법(Enzyme Immuno-Assay; EIA)을 이용하여 측정하였다. 즉 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 續斷 물추출물을 처리하여 30분간 배양한 다음 LPS (1 µg/ml)를 처리하여 16시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 내에 존재하는 PGE<sub>2</sub>의 양을 측정하였으며, 세포배양액 내 존재하는 PGE<sub>2</sub>의 농도는 PGE<sub>2</sub> 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

6) Reverse transcriptase (RT)-PCR

RAW264.7 세포에서 발현되는 염증효소인 iNOS와 COX-2의 유전자 발현에 대한 續斷 추출물의 효과를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 즉 RAW264.7 세포에 100µg/ml 농도의 續斷 물추출물을 처리하여 30분 동안 배양한 다음, LPS (1 µg/ml)를 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 QIAzol reagent를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA (5 µg)와 oligo-(dT) primer, Improm-II™ reverse transcriptase를 이용하여 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA 1 µg에 target-specific primers (Table 1) 1µ 및 10×buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 1 U Tag polymerase를 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 55~60°C에서 50초 및 extension을 위해 70°C에서 60초 조건에서 27 cycles을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDHs를 사용하였다.

Table 1. The Primers for PCR

	Primer	Sequences
iNOS	Sense	5'-GAC CAG ATA AGG CAA GCA C-3'
	Antisense	5'-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC-3'
COX-2	Sense	5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'
	Antisense	5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'
GAPDH	Sense	5'-CTC GTG GAG TCT ACT GGT GT-3'
	Antisense	5'-GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT-3'

7) Western blot

RAW264.7 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 대한 續斷 물추출물의 효과를 조사하기 위해 Western blot을 수행하였다. 즉 RAW264.7 세포에 100 µg/ml 농도의 續斷 물추출물을 처리하여 30분 동안 배양한 다음, LPS (1 µg/ml)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 세포를 수거한 다음 lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) 0.1 ml로 lysis시킨 후 12,000 rpm에서 20분 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 protein assay solution으로 정량한 다음, 20 µg 단백질과 2×sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithithreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)를 섞어 100°C에서 3분 끓인 후 10~15% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 분리된 gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer시킨 후 5% skim milk로 실온에서 1시간 blocking하였다. 이를 0.05% Tween이 함유된 TBS-T로 희석된 iNOS, COX-2 및 β-actin에 대한 일차항체와 함께 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 TBS-T로 3회 세척하고, 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체와 함께 1시간 실온에서 반응시켰다. 이를 TBS-T로 세척한 후 ECL 용액을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

8) 통계학적 검증

모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 Graph Pad Prism program의 Student t-test를 수행하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성 검증

續斷의 물추출물(DR-W)의 RAW264.7 세포에 대한 독성정도를 평가하기 위해서 MTT assay 수행한 결과(Fig. 1), 세포만 배양한 경우의 세포생존율 100%를 기준으로 續斷 물추출물의 농도 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1,000 µg/ml를 각각 처리하였을 때 세포생존율이 99.94±0.78%, 99.56±1.76%, 98.96±0.95% 및 7.40±1.33%로 측정되었다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 續斷 물추출물은 100 µg/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았으며, 이후 실험은 세포독성이 없는 농도범위에서 수행하였다.

2. NO 생성에 대한 효과

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포로부터 생성되는 염증물질인 NO에 대한 續斷 물추출물의 억제효과를 조사하기 위해서 세포배양액으로부터 Griess assay 방법

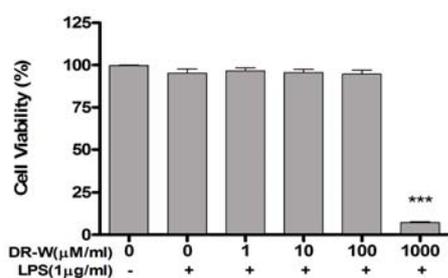


Fig. 1. Effects of Dipsaci Radix water extract on cell viability of RAW264.7 cells

Cells were treated with different concentrations of Dipsaci Radix water extract (DR-W) for 24h with LPS (1 μg/ml), and then cell viability was determined by MTT assay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars). \*\*\* $p < 0.001$  vs. cells alone.

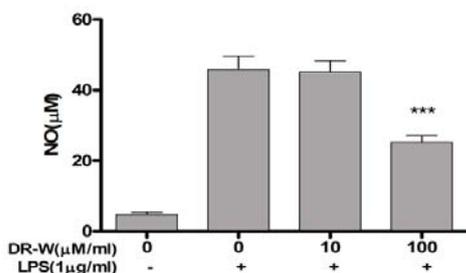


Fig. 2. Effects of Dipsaci Radix water extract on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells

Cells were treated with 100 μg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 μg/ml) for 24h. The NO concentrations were determined in culture medium by Griess reagent. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars). \*\*\* $p < 0.001$  vs. LPS alone.

을 수행한 결과(Fig. 2), 세포만 배양하였을 때 NO의 농도는  $4.26 \pm 1.76$  μM로 매우 낮았으며, LPS 처리 후  $39.98 \pm 1.45$  μM 농도로 증가되었다. 또한 續斷 물 추출물(DR-W)을 100 μg/ml 처리하였을 때에는  $22.69 \pm 2.44$  μM로 측정되어 유의적으로 NO 생성이 억제되었다.

### 3. PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 효과

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포로부터 생성되는 염증물질인 PGE<sub>2</sub>에 대한 續斷 물 추출물의 억제효과를 조사하기 위해서 세포배양액으로부터 효소면역반응법으로 측정된 결과(Fig. 3), 세포만 배양하였을 때 PGE<sub>2</sub>의 농도는  $28.4 \pm 1.35$  pg/ml로 매우 낮았으며, LPS 처리 후  $813.2 \pm 13.9$  pg/ml 농도로 증가되었다. 또한 續斷 물 추출물(DR-W)을 100 μg/ml 처리하였을 때에는  $66.6 \pm 29.2$  pg/ml로 측정되어 유의적으로 PGE<sub>2</sub> 생성이 억제되었다.

### 4. iNOS와 COX-2 발현에 대한 효과

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포로부터 발현되는 NO 합성효소인 iNOS와 PGE<sub>2</sub> 합성효소인 COX-2의

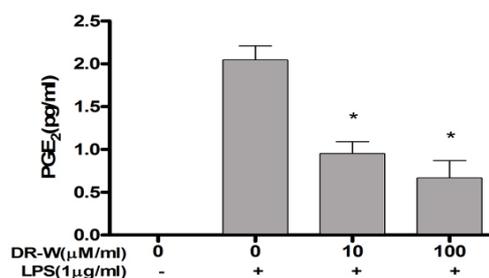


Fig. 3. Effects of Dipsaci Radix water extract on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production in RAW264.7 cells

Cells were treated with 100 μg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 μg/ml) for 16h. The PGE<sub>2</sub> concentrations were determined in culture medium by EIA. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars). \* $p < 0.05$  vs. LPS alone.

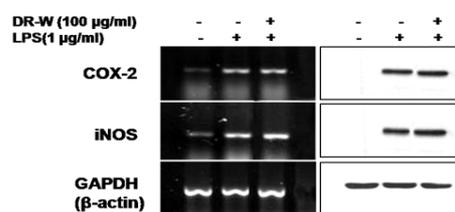


Fig. 4. Effects of Dipsaci Radix water extract on LPS-induced expression of iNOS and COX-2 mRNA and protein in RAW264.7 cells

Cells were treated with 100 μg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 μg/ml) for 6h (for RT-PCR) and 24h (for Western blot). The expression of iNOS and COX-2 mRNA and protein was determined by RT-PCR (left) and Western blot(right), respectively.

유전자와 단백질 발현에 대한 續斷 물 추출물의 억제효과를 RT-PCR 방법(Fig. 4A)과 Western blot 방법으로 조사하였다(Fig. 4).

먼저 iNOS와 COX-2 유전자와 단백질의 발현은 RAW264.7 세포만 배양하였을 때는 거의 관찰되지 않았으며, LPS 처리 후 발현이 증가되었다. 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 유전자와 단백질의 발현은 續斷 물 추출물(DR-W, 100 μg/ml)에 의해서 억제되지 않는 것으로 나타났다.

## 고찰

염증반응은 어떤 자극에 대한 생체 조직의 비특이적 면역반응으로써 조직의 변성, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 유발하는 복잡한 병변이다<sup>1,2)</sup>. 대식세포는 초기 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로서 동물 체내 모든 조직에 존재하며 외부 이물질을 탐지하고 포식하여 죽은 세포를 제거하는 포식작용과 더불어 외부 자극을 통해 염증사이토카인, eicosanoids, ROS, NO, PGE<sub>2</sub> 등의 다양한 염증물질 분비를 통해 초기 염증반응을 유도하게 된다<sup>4-7)</sup>. 즉 활성화된 대식세포로부터 다량 분비

되는 염증물질들은 초기 염증반응 유발을 통해 기관지염, 관절염, 다발성경화, 동맥경화, 뇌졸중, 퇴행성뇌질환 및 바이러스 감염으로 인한 염증질환 등의 발병을 유도하게 되며 질환을 악화시키는 데 기여하게 된다<sup>22,23</sup>). 따라서 각종 염증질환에서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가되는 다양한 염증물질을 효과적으로 감소시킬 수 있는 항염증제 및 치료보조제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 최근 한약재로부터 유래되는 생리활성물질이나 단일화합물이 치료제 개발의 표적물질로 주목받고 있다<sup>9-14</sup>).

續斷은 川續斷의 뿌리로서 補肝腎, 強筋骨, 續筋接骨, 調血脈의 한의학적 효능으로 肝腎의 기능이 부족하여 나타나는 腰膝酸痛과 崩漏胎動 및 外傷으로 인한 筋骨의 손상 또는 關節不利 등의 병증에 대해 효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>15</sup>). 續斷의 성분으로는 sweroside, loganin 등의 iridoid 계열의 화합물과 triterpenoid saponins 등이 알려져 있다<sup>15</sup>). 續斷에 대한 실험적 효능연구로는 골밀도 개선, 골다공증 방지, 장골길이 성장, 골모세포의 분화와 증식 촉진, 골절통이나 근육통증의 억제 효과가 보고되었으며<sup>16-20</sup>), 성분 분배에 대한 연구로는 사포닌(saponin)의 항암, 항산화, 신경보호, 인지기능장애 억제 및 뇌혈 손상에 대한 보호 효과 등이 보고되었다<sup>21</sup>). 그러나 續斷의 항염증 효능에 대한 실험연구는 되어 있지 않으며, 본 연구에서는 續斷 물추출물의 활성화된 대식세포에서의 염증반응 억제효과를 조사하였다.

NO는 자유기(free radical)로서 심혈관계, 신경계 및 면역계의 전달물질이며, 세포 내 항상성의 유지, 신경전달물질의 운반, 항암 작용 및 세포독성 등 매우 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다<sup>23</sup>). NO는 NADPH의 존적 효소인 세 가지 형태의 NO 합성경로(NO synthase pathway; NOS)를 통해 L-arginine이 산화되어 citrullin으로 변환되는 과정에서 형성되는 중간 생성물이며, NOS 중 endothelial NOS(eNOS)와 neuronal NOS(nNOS)는 칼슘농도에 의존적이고 자극에 대한 반응이 아닌 구성성분으로서 일시적으로 소량 발현된다. 반면 inducible NOS(iNOS)는 칼슘의 농도에 상관없이 염증자극에 의해 지속적으로 다량 생성이 유도됨으로써 염증반응에 기여하게 된다<sup>23</sup>). 또한 iNOS는 일반적으로 대식세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ 와 같은 염증자극에 의해 유도되며, 특히 LPS 또는 세균의 lipopeptide를 처리하였을 때 급격히 합성이 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>24</sup>). NO는 원래 염증성 또는 항염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 통해 세포를 파괴하고 쇼크로 인한 혈관 확장 및 염증반응을 가속화하여 조직손상을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>5,23</sup>). 따라서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO를 효과적으로 억제하는 것은 염증질환 치료에서 유용한 방법으로 여겨지고 있다. 본 연구결과에서 續斷 물추출물은 독성이 없는 농도에서 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 NO의 양을 유의적으로 억제시

켰다. 현재까지 한약물에 의한 NO 생성억제에 대한 기전은 정확하게 밝혀져 있지 않지만, NO 생성을 억제하는 약물의 경우 약물의 전처리에 의해 iNOS의 promoter activity가 억제되거나, iNOS 유전자의 전사가 억제되거나 기타 세포 밖으로 분비된 NO를 직접 소거(scavenging)하는 활성화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>9-14,23</sup>). 본 연구에서 續斷 추출물은 NO는 유의적으로 억제하였으나 iNOS의 유전자와 단백질 발현은 억제하지 않아서 세포 밖으로 분비된 NO를 소거하는 활성이 있는 것으로 보인다.

한편 prostaglandins은 국소적으로 활성화되는 물질로서 아라키돈산 경로로부터 COX 효소의 작용으로 합성되는데, COX-1과 COX-2의 두 가지 isoform이 있는데 COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준히 만들어져 housekeeping 효소의 역할을 하는 반면, COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, mitogens, growth factors 등을 대식세포, 단핵구, 혈관내피세포, 연골세포, 조골세포, 활막세포 등에서 발현된다<sup>22</sup>). 따라서 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물들은 COX-2 유도에 의한 염증을 줄이고, COX-1을 억제하기 때문에 발생하는 위, 신장, 혈소판에 대한 부작용을 예방할 수 있다는 측면에서 많이 개발되고 있다<sup>6,23</sup>). 조직이 손상되면 물리적인 손상뿐 아니라 염증을 매개하는 물질들이 다량 분비되기 때문에 통증이 유발되게 되는데, PGE<sub>2</sub>는 조직손상이 일어나는 부위에서 많이 분비되어 말초신경 말단부위에 작용하여 통증에 대한 역치를 감소시키게 된다<sup>25</sup>). 본 연구결과에서 續斷 물추출물은 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증물질인 PGE<sub>2</sub>의 양을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 續斷 물추출물은 LPS에 의해 활성화되는 대식세포로부터 생성되는 염증물질인 NO와 PGE<sub>2</sub>를 유의적으로 감소시킴으로써 항염증효능을 나타내었으며 이들의 합성효소인 iNOS와 COX-2의 발현은 감소시키지 않아 이에 대한 기전 연구 및 *in vivo*에 대한 실험연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

續斷의 염증반응 억제 효과를 평가하기 위하여 RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증물질인 NO와 PGE<sub>2</sub>에 대한 억제효과를 조사하였다.

1. 續斷 물추출물은 100  $\mu$ g/ml 농도까지 RAW264.7 세포에 대한 독성이 나타나지 않았다.
2. 續斷 물추출물은 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 분비되는 NO와 PGE<sub>2</sub>를 유의적으로 감소시켰다.
3. 續斷 물추출물은 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 발현되는 iNOS와 COX-2의 발현은 감소시키지 않았다.

따라서 續斷은 활성화된 대식세포에서 분비되는 NO와 PGE<sub>2</sub>를 유의적으로 감소시킴으로써 염증반응 억제효과를 나타내었다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 동국대학교 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드린다.

## 참고문헌

- Morson BC. Pathology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Jpn.* 1980 ; 15 : 184-7.
- Cline MJ. Leukocyte function in inflammation: the ingestion, killing, and digestion of microorganisms. *Ser Haematol.* 1970 ; 3 : 3-16.
- Guo LY, Hung TM, Bae KH, Shin EM, Zhou HY, Hong YN, Kang SS, Kim HP, Kim YS. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Eur J Pharmacol.* 2008 ; 591 : 293-9.
- Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells : a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* 2005 ; 208 : 249-58
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 ; 6 : 3051-64.
- Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med.* 2002 ; 53 : 35-57.
- Wei W, Li XY, Zhang HQ, Wu SG. Anti-inflammatory and immuno pharmacology. 1st ed. Beijing : Renminweishengchubanshe. 2004 : 10-7.
- Andreaskos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation. *Immunol Rev.* 2004 ; 202 : 250-65.
- Cao H, Urban JF Jr, Anderson RA. Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti- and pro inflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. *J Nutr.* 2008 ; 138 : 833-40.
- Tao JY, Zhao L, Huang ZJ, Zhang XY, Zhang SL, Zhang QG, Fei-Xiao, Zhang BH, Feng QL, Zheng GH. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl on lps-stimulated RAW 264.7 cell. *Inflammation.* 2008 ; 31 : 154-66.
- Zhao L, Zhang SL, Tao JY, Jin F, Pang R, Guo YJ, Ye P, Dong JH, Zheng GH. Anti-inflammatory mechanism of a folk herbal medicine, *Duchesnea indica* (Andr) Focke at RAW264.7 cell line. *Immunol Invest.* 2008 ; 37 : 339-57.
- Jung HW, Yoon CH, Kim YH, Boo YC, Park KM, Park YK. Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 114 : 439-45.
- Rhule A, Navarro S, Smith JR, Shepherd DM. *Panax notoginseng* attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2006 ; 106 : 121-8.
- Jin HZ, Lee JH, Lee D, Hong YS, Kim YH, Lee JJ. Inhibitors of the LPS-induced NF-kappaB activation from *Artemisia sylvatica*. *Phytochemistry.* 2004 ; 65 : 2247-53.
- 전국한의과대학 공동교재편찬위원회 편저. 본초학. 서울 : 영림사. 2007 : 604-6.
- 한상우, 류사현, 심은섭, 이동은, 박민희, 김범희, 최현, 정혁상, 손낙원, 손영주. 續斷이 중풍모델 흰쥐 비복근의 근섬유위축 및 MyoD 발현에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2008 ; 23 : 159-68.
- Wong RW, Rabie AB, Hagg EU. The effect of crude extract from *Radix Dipsaci* on bone in mice. *Phytotherapy Res.* 2007 ; 21 : 596-8.
- 유석주, 장길용, 윤호상, 최호철, 선기종, 김연아, 피성희, 신형식, 유형근. 續斷의 생리활성성분이 치은섬유아세포의 세포주기조절에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2005 ; 35 : 87-98.
- 김동진, 윤정호, 정의원, 유윤정, 김윤철, 유형근, 김종관, 최성호. 續斷의 dichloromethane 분획물이 마우스 두개골 세포의 분화에 미치는 영향. *대한치주과학회지.* 2004 ; 34 : 791-805.
- 이영준, 최희인, 김윤철, 신형식, 유형근. 續斷의 dichloromethane 분획물이 태아골모세포의 골형성 유도에 미치는 효과. *대한치주과학회지.* 2003 ; 33 : 259-69.
- Jeong SI, Zhou B, Bae JB, Kim NS, Kim SG, Kwon J, Kim DK, Shin TY, Jeon H, Lim JP, Kim H, Kim HK, Oh CH. Apoptosis-inducing effect of akebia saponin D from the roots of *Dipsacus asper* Wall in U937 cells. *Arch Pharm Res.* 2008 ; 31 : 1399-404.
- Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* 2002 ; 2 : 603-30.
- Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel

- biologic messenger. *Cell*. 1992 ; 70 : 705-7.
24. Sunyer T, Rothe L, Jiang X, Anderson F, Osdoby P, Collin-Osdoby P.  $Ca^{2+}$  or phorbol ester but not inflammatory stimuli elevate inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid and nitric oxide (NO) release in avian osteoclasts: autocrine NO mediates  $Ca^{2+}$ -inhibited bone resorption. *Endocrinology*. 1997 ; 138 : 2148-62.
25. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin  $E_2$  synthesis and secretion: the role of  $PGE_2$  synthases. *Clin Immunol*. 2006 ; 119 : 229-40.