

# Nuclear Factor kappa B 억제를 통한 인진추출물의 inducible Nitric Oxide synthase 및 Cytokine 억제효과

김대성<sup>1</sup>, 박숙자<sup>1,2</sup>, 조미정<sup>1,2</sup>, 박상미<sup>1,2</sup>, 김상찬<sup>1,2</sup>, 변성희<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>대구한의대학교 한의과대학, <sup>2</sup>한방신약개발팀 (BK21 Team)

## ABSTRACT

### Anti-inflammatory effects of Herba Artemisiae Capillaris as a consequence of the inhibition of NF-kappa B-dependent iNOS and pro-inflammatory cytokines production.

Dae Sung Kim<sup>1</sup>, Sook Jahr Park<sup>1,2</sup>, Mi Jeong Jo<sup>1,2</sup>, Sang Mi Park<sup>1,2</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2</sup>, Sung Hui Byun<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>College of Oriental Medicine and <sup>2</sup>BK21 Team, Daegu Haany University

Herba Artemisiae Capillaris is the dried bud of *Artemisia capillaris* Thunb, which has been used for expelling heat to loosen the bowels and normalizing gallbladder function to cure jaundice in traditional oriental medicines. In the present study, we evaluated the anti-inflammatory effects of the aqueous extracts of Herba Artemisiae Capillaris (HAC) in LPS-activated Raw 264.7 cells. Cells were treated with 1  $\mu$ g/ml of LPS 1 h before adding HAC extract. Cell viability was determined by MTT assay, and the relative level of NO was measured with Griess reagent. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 cytokines were detected by ELISA. During the entire experimental period, all three doses of HAC extract (0.03, 0.10 and 0.30 mg/ml) had no significant

- 
- 교신저자 : 변성희
  - 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학
  - Tel : 053-770-2244 Fax : 053-768-6340 E-mail : shbyun@dhu.ac.kr
  - 접수 : 2009/ 09/ 26 수정 : 2009/ 12/ 03 채택 : 2009/ 12/ 21

cytotoxicity. LPS-activated cells showed increased NO levels and iNOS expressions compared to control. However, these increases were dramatically attenuated by treatment with HAC extract. Moreover, the inhibitory effects of HAC extract occurred in a dose-dependent manner. In addition, HAC extract reduced the translocation of NF $\kappa$ B into nuclear. HAC reduced production of IL-1 $\beta$  and IL-6 by LPS, although it had no effects on TNF- $\alpha$ . These results demonstrate that liquiritigenin exerts anti-inflammatory effects, which results from the inhibition of NF $\kappa$ B activation in macrophages, thereby decreasing production of iNOS and proinflammatory cytokines.

Taken together, these results indicate that the aqueous extracts of *Herba Artemisiae Capillaris* warrant further development as an anti-inflammatory agent for the treatment of gram-negative bacterial infections.

**Key word** : *Herba Artemisiae Capillaris*, Cytokine, iNOS, NF $\kappa$ B

## 1. 서론

茵陳은 국화과에 속한 다년생초본인 사철쭉 및 비쭉의 幼嫩莖葉으로, 苦微寒하며, 脾胃肝膽經에 入하여 清利濕熱, 退黃하는 효능이 있어 濕熱黃疸, 風痺癢疥, 小便不利를 치료한다<sup>1)</sup>. 약리작용으로는 利膽작용, 解熱작용, 強압작용, 止喘작용, 이뇨작용, 항균작용 등이 알려져 있다<sup>2)</sup>.

인진에 대한 연구로는 섬유화억제, 항균, 항고지혈, apoptosis조절, 간보호, 항암 등의 다양한 연구결과가 보고되어 있다.

김 등<sup>3)</sup>은 인진이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향을 보고하였으며, 신 등<sup>4)</sup>은 인진이 간세포에서 TGF- $\beta$ 1의 mRNA 및 단백질의 발현을 억제하며, 또한 TGF- $\beta$ 1에 의해 활성화되는 PAI-1의 발현을 억제하며, TGF- $\beta$ 1에 의하여 촉진되는 fibroblast의 세포증식을 억제함을 밝혀 인진이 간 섬유화의 억제에 유효함을 밝혔다. 최 등<sup>5)</sup>은 *Candida*

*albicans*에 대한 인진의 항진균효과를 보고하였으며, 함 등<sup>6)</sup>은 인진이 Triton WR-1339로 유도된 흰쥐의 고지혈증에 유효함을 보고하였다.

또한 박 등<sup>7)</sup>은 인진 butanol분획 중 scopoletin이 FasL-Fas 매개 세포자멸사에서 Bcl-2를 억제함으로써 세포보호효과를 나타냄을 보고하였으며, 이 등<sup>8)</sup>은 인진 butanol분획이 TGF- $\beta$ 1으로 유도되는 Hep G2의 apoptosis에 있어서 Bcl-2의 발현을 증가시킴으로 세포독성을 유의하게 억제함을 보고하였으며, 김 등<sup>9)</sup>은 인진약침액이 에탄올에 의해서 유발되는 SK-N-MC 신경아세포주의 apoptosis를 억제함을 밝혔으며, 강 등<sup>10)</sup>은 인진이 세포주기를 활성화시키며, 또한 apoptosis를 억제함으로써 간손상을 억제함을 밝혀, 인진에는 다양한 세포에서 세포보호효과를 나타냄을 보고하였다.

또한, in vivo연구로서 이 등<sup>11)</sup>과 우 등<sup>12)</sup>은 인진추출물이 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상에 대하여 항진된 ALP 및 AST 활성을 억제하고, D-galactosamine

으로 유발된 간손상에 대하여서도, GOT의 활성이 유의하게 억제됨을 보고하였으며, 이 등<sup>13)</sup>은 인진이 Dimethylnitrosoamine으로 유발된 흰쥐의 간손상에 대하여, GOT, GPT, LDH,  $\gamma$ -GTP를 유의하게 감소시킴을 보고하여 인진이 간장해 보호활성을 가짐을 보고하였다.

또한 항암작용에 대한 연구로, 손 등<sup>14)</sup>은 인진이 Hep G2 인체 간암세포주에 대해 유의성있는 세포독성효과를 나타내었으며, mitomycin-C 또는 Adriamycin과의 병용투여시 상승작용이 있음을 보고하였다.

특히 박 등<sup>15)</sup>은 인진의 3종 분획이 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 cell에서 LPS와 IFN- $\gamma$ 로 유도되는 iNOS의 발현을 억제하고, PMA로 유발되는 superoxide를 농도의존적으로 감소시킴을 보고하였으나, iNOS의 억제 기전 및 염증매개물질에 대한 연구는 부족한 실정이다.

대식세포는 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 interleukin-6 (IL-6)와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다<sup>16-17)</sup>. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 분비하는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 nitric oxide (NO)는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>18-20)</sup>. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 靑黛<sup>21)</sup>, 苦楝皮<sup>22)</sup>, 구지뽕나무<sup>23)</sup>, 관동화<sup>24)</sup>, 當歸<sup>25)</sup>, 香附子<sup>26,27)</sup>, 木단피<sup>28)</sup> 등의 한약에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

이에 저자는 인진추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell의 NO의 생성량, iNOS의 발현 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 cytokine에 미치는 영향을 살펴보고 이러한 염증매개물질의 발현에 핵심적

역할을 하는 NF $\kappa$ B의 변화를 살펴보고자 본 연구를 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 추출물의 제조

인진 (HAC; Herba Artemisiae Capillaris, 대원약업사, 대구) 300g을 물 5L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000 $\times$ g에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 0.2 $\mu$ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 인진의 수율은 각 14.93 %였으며 실험에서는 DMEM에 녹여 사용하였다.

### 2. 시 약

LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Cayman (Ann Arbor, MI, USA), Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

### 3. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배

지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

#### 4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 다음 HAC를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도로 HAC를 처리한 후에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml)를 50  $\mu$  넣고 4시간 배양 한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) =  $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$ ].

#### 5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 50  $\mu$ 와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 50  $\mu$ 를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 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 phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 $\times$ 로 10분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. iNOS의 발현은 antimouse iNOS antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti I- $\kappa$ Ba antibody를 사용하여 I- $\kappa$ Ba protein을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit을 사용하였다. iNOS와 I- $\kappa$ Ba protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다. 발색 후 각 band의 발현량을 평가하기 위하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 Densitometric analysis를 하였다.

#### 7. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6 well plate에 cells ( $5 \times 10^5$ /ml)을 분주하고 HAC를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 18시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

#### 8. 통계적 검증

실험 결과는 mean  $\pm$  S.D.로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

### III. 실험결과

#### 1. HAC가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 HAC의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 HAC를 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS처리 후 유의하게 증가하였으며, HAC를 처리한 실험군에서는 전농도에서 유의한 NO억제를 나타내었다(Fig. 1).

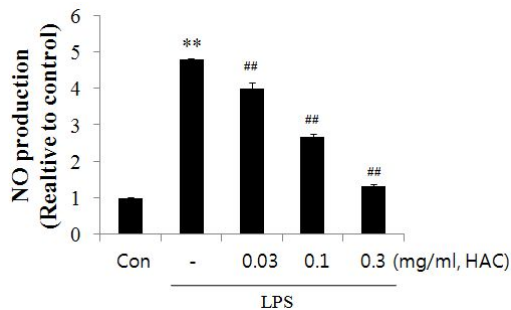


Fig. 1. Effects of HAC on the production of NO by LPS.

Raw 264.7 cells were treated with 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml of HAC dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the materials and methods section. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (\*, significant as compared to control. \*\*P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, ##P<0.01)

#### 2. HAC가 Raw 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향

HAC가 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, HAC의 세포 독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여, HAC를 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml로 처리하고 24시간 후 MTT

assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. LPS 단독 처리에서는 Con에 비교하여 약 60%의 세포 독성을 나타내었으나, LPS와 HAC (0.03, 0.1, 0.3 mg/ml)를 처리한 군에서는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

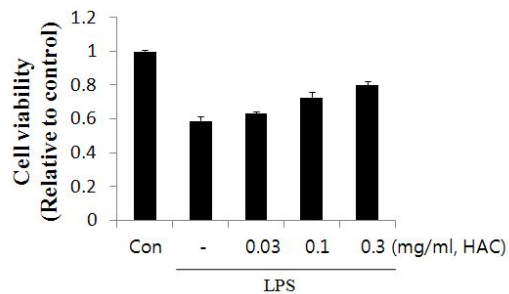


Fig. 2. Effects of HAC on the cell viability in LPS stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml of HAC dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments.

#### 3. HAC가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 iNOS 발현에 미치는 영향

HAC의 Nitric Oxide 생성 억제에 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사하였다. LPS 처리시에는 iNOS 단백질의 발현이 유의하게 증가되었으나, LPS에 HAC 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

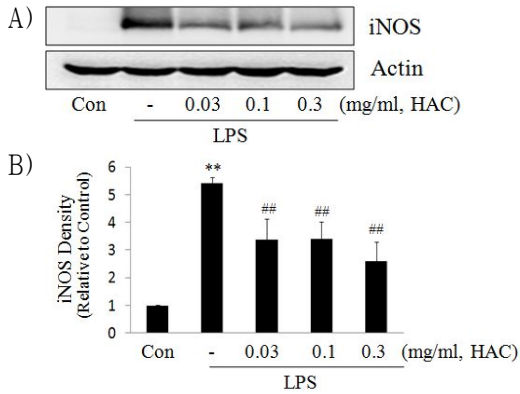


Fig. 3. Effect of HAC on the induction of iNOS by LPS.

The level of iNOS protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1 $\mu$ g/ml) with or without HAC pretreatment (i.e. 1h before LPS). The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B). (\*, significant as compared to control. \*\*P<0.01; #, significant as compared to LPS alone. ##P<0.01)

#### 4. HAC가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 NF $\kappa$ B 발현에 미치는 영향

염증반응에 의해 활성화되는 NF $\kappa$ B는 iNOS나 TNF- $\alpha$  유전자의 발현과 관련이 있다<sup>29</sup>. 일반적인 상태에서 NF $\kappa$ B는 세포질에서 억제분자인 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NF $\kappa$ B signaling cascade가 활성화되면 I $\kappa$ B, p105, p100이 인산화되면서 NF $\kappa$ B가 핵으로 전위하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도하게 한다. I $\kappa$ B protein의 종류는 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NF $\kappa$ B의 억제 단백질은 I $\kappa$ B $\alpha$ 이다<sup>14</sup>. 본 연구에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 는 LPS 처리에 의하여 감소하였으나, HAC의 전처치에 의하여 감소된 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 회복되었다. 그리고 핵분획에서의 NF $\kappa$ B는 LPS 처리에 의해 유의하게 증가하였으나, HAC의 전처치에 의하여 NF $\kappa$ B량이 감소하였다. 이러한 결과는 HAC가 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억

제하고 그로 말미암아 NF $\kappa$ B가 핵으로의 전위가 억제됨을 나타낸다(Fig. 4).

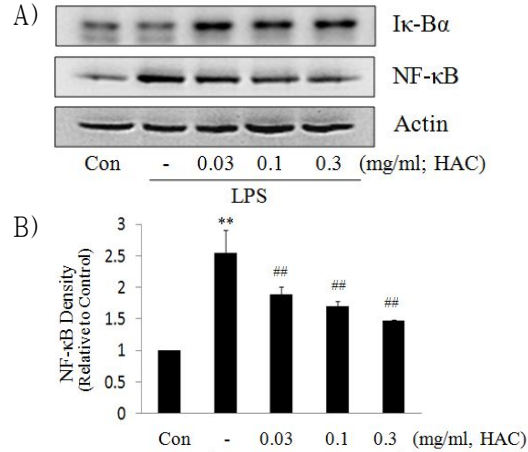


Fig. 4. Effects of HAC on the expression of I $\kappa$ B $\alpha$  and NF $\kappa$ B by LPS.

The level of I $\kappa$ B $\alpha$  and NF $\kappa$ B protein were monitored 15min and 60 min after treatment of cells with LPS (1  $\mu$ g/ml) with or without HAC pretreatment, respectively (i.e. 1h before LPS). The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B). (\*, significant as compared to control. \*\*P<0.01; #, significant as compared to LPS alone. ##P<0.01)

#### 5. HAC가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 cytokine에 미치는 영향

IL-6는 분화된 B-cell이 형질세포로 분화되도록 촉진시키고 antibody의 분비를 자극한다. IL-6는 또한 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>30</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, HAC 0.1, 0.3 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 HAC 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 5A). IL-1 $\beta$ 는 TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 $\beta$ 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>31</sup>. 본 연구에

서 LPS는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, HAC는 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 IL-1 $\beta$ 의 생성량을 줄였으며, 농도의존적인 감소를 나타내었다(Fig. 5B). TNF- $\alpha$ 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>29)</sup>. Macrophage와 mast

cell에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>31)</sup>. 본 연구에서 LPS는 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으나, HAC는 실험 전 농도에서 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 감소시키지 못하였다(Fig. 5C).

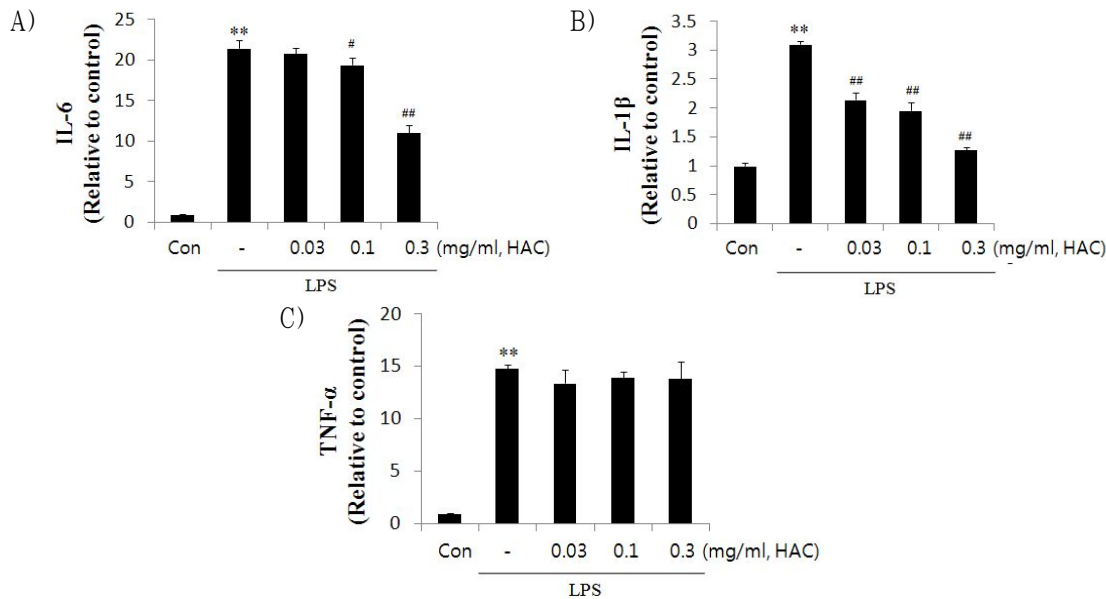


Fig. 5. The effect of HAC on LPS-stimulated cytokines production.

Productions of cytokines were measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of HAC for 6 h (IL-6, A) and 12 h (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , B and C). The amounts of cytokines were measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Newman - Keuls test (\*, significant as compared to control. \*\*P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, #P<0.05, ##P<0.01)

#### IV. 고찰

본 연구는 利濕退黃藥으로 사용되는 茵陳의 항염증효과를 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 茵陳의 전처치가 염증매개물질에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다.

茵陳은 清利濕熱, 退黃疸의 효능으로 濕熱黃疸, 小便不利, 濕瘡疥癩, 傳染性黃疸型肝炎에 응용된다

<sup>32)</sup> 茵陳은 0.1%의 정유성분 ( $\beta$ -pinene, capillone, capillene 등)을 포함하고 있으며, 지방유 (stearic acid, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, montanic acid 등)도 다량 포함되어 있다. 이 외에 capillin, capillene, capillone, capillarin 혹은 coumarin류의 scoparone, chromone류의 capillarisin, 및 flavonoid의 cirsilineol, cirsimaritin 등을 함유한다<sup>32,33)</sup>.

인진의 물 또는 알콜추출물은 利膽작용을 가지고

있으며, 이러한 利膽작용은 scoparone과 capillarisin에 의한 것으로, scoparone의 利膽작용은 담관말단의 oddi괄약근의 이완작용에 의한 利膽작용이다. 그러나, scoparone뿐만아니라, 茵陳蒿의 가수분해산물도 利膽작용을 한다. Capillarisin은 담관중말부의 담낭평활근에 직접작용하고, 콜린작용성 신경을 억제하여 利膽작용을 발휘하는 것으로 밝혀져 있다. 또한 scoparone에는 이뇨, 강압작용이 있으며, capillarisin에는 항암, 항균작용이 있다<sup>32)</sup>.

인진에 대한 최근의 연구로는 간섬유화억제효과, 항균효과, 항고지혈효과, apoptosis 억제효과, 독성억제효과, 항암효과 등이 연구되어 있지만, 항염증효과에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 염증효과에 대하여, 박 등<sup>15)</sup>은 인진이 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 cell에서 LPS와 IFN- $\gamma$ 로 유도되는 iNOS의 발현을 억제함을 밝혔으나, 인진의 iNOS 억제 기전 및 염증성관련 cytokine의 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 열수추출된 인진 (HAC)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증매개물질들에 미치는 영향을 평가하였다.

산화질소 (nitric oxide: NO)는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다<sup>34)</sup>.

Inducible NOS (iNOS)는 염증반응시 대량으로 생성되고, constitutively expressed NOS (cNOS)는 일반적인 상황에서 생리적으로 작용한다<sup>35)</sup>. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 두 가지로 나눌 수 있으며, cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)가 있다. 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 (IL-1) 및 TNF- $\alpha$ 등의 자

극에 의해 대식세포, 내피세포, 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>21-23,36,37)</sup>. 그런 까닭에 NO 생성 저해제는 septic shock 및 염증반응조절제로의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 HAC의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 HAC를 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 증가하였으며, HAC를 0.03 ~ 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 농도의존적으로 유의성있는 NO의 생성억제를 나타내었다.

HAC가 0.03, 0.1 및 0.3 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, HAC의 세포독성으로 인한 세포수의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, HAC의 농도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 실험에 사용된 HAC의 전농도는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

NO는 L-arginine으로부터 NOS를 경유하여 생성되므로<sup>34)</sup>, NO 생성의 억제에 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 HAC 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 유의하게 감소하였다.

NO를 생성하는데 관여하는 iNOS의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NF $\kappa$ B, AP-1, C/EBP등이 있으며<sup>29)</sup>, 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NF $\kappa$ B이다<sup>38)</sup>. NF $\kappa$ B는 세포자멸사의 억제, 세포주기의 조절, oncogenesis 등과도 관련이 있으며<sup>30)</sup>, 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS



나 TNF- $\alpha$  등의 유전자 발현에 관련한다<sup>29)</sup>. 일반적인 상태에서 NF $\kappa$ B는 세포질에서 억제분자인 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p105, p100 등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NF $\kappa$ B 신호전달계가 활성화되면 I $\kappa$ B, p105, p100이 인산화가 진행되면서 NF $\kappa$ B가 핵으로 전위하여 COX-2, iNOS, Bcl $_{XL}$ , cIAPs 등의 전사를 유도한다. I $\kappa$ B 단백질의 종류는 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NF $\kappa$ B의 억제단백질은 I $\kappa$ B $\alpha$ 이다<sup>30)</sup>.

본 실험에서는 세포내에서의 I $\kappa$ B $\alpha$ , 핵분획에서의 NF $\kappa$ B의 발현량을 측정하였다. LPS처리시에는 I $\kappa$ B $\alpha$  단백질이 세포내에서 감소하였으나, LPS에 HAC를 처치한 실험군에서는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 양이 급격히 증가하였다. 이러한 결과는 LPS에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화가 그 만큼 증가하였으며, HAC에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화가 억제되고 있음을 의미한다. 핵분획에서의 NF $\kappa$ B는 LPS에 의해 유의하게 증가되었고, HAC에 의해 NF $\kappa$ B는 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 I $\kappa$ B $\alpha$ 와의 결과와 같이 고려해 볼 때, LPS에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화가 증가되고, 이차적으로 NF $\kappa$ B가 핵으로 전위되는 과정을 HAC가 유의하게 억제하고 있음을 의미한다.

TNF- $\alpha$ 는 LPS반응의 주요 매개체로서 macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 중앙세포에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>31)</sup>. 본 연구에서 LPS는 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유의하게 촉진시켰으나, HAC는 전농도에서 TNF- $\alpha$ 의 감소를 나타내지 못하였다.

한편, IL-1 $\beta$ 는 단핵구, 대식세포, B-cell, 수지상세포, 간세포 등에서 분비되며 IL-1 $\beta$ 는 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 $\beta$ 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>31)</sup>. 또한 IL-1은 septic shock<sup>39)</sup>, 화상<sup>40)</sup>, 간식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury<sup>41)</sup>의 경우에 prostaglandins, leukotrienes,

platelet-activating factor, nitric oxide등의 매개물 질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다<sup>42)</sup>.

본 연구에서 LPS는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, HAC는 실험에 사용된 전농도에서 모두 유의하게 IL-1 $\beta$ 의 생성량을 감소시켰다.

단핵구나 대식세포에서 분비되는 또 다른 cytokine인 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>31)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, HAC 0.1, 0.3 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 농도의존적으로 유의성 있게 감소시켰다.

이러한 연구결과는 HAC가 NF $\kappa$ B의 억제단백질중의 하나인 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 phosphorylation을 억제하여 NF $\kappa$ B가 핵안으로 translocation되는 기전을 억제하며, 그러한 결과로 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6의 감소가 초래되는 것을 의미한다. 그러나, 본 연구는 인진 粗抽出物이 in vitro에서 나타내는 연구결과이므로, 향후 in vivo에서의 효능 및 효능기전이 확보되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

인진추출물 (HAC)의 항염증효능을 평가하기 위하여, 설치류 대식세포주인 Raw 264.7 cell을 LPS로 활성화시킨 후 nitric oxide의 생성량, inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등의 염증매개물질에 미치는 영향을 살펴본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS는 NO의 생성량을 유의성있게 증가시켰으며, HAC 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml을 전처치한 실험군에서는 증가된 NO를 유의하게 억제하였다. 또한 HAC처리군은 LPS단독처리군에 비교하여

- 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.
2. LPS에 의하여 유의하게 증가된 iNOS 단백질의 발현은, HAC의 전처치로 발현량이 유의하게 감소되었다.
  3. LPS에 의해 감소된 I $\kappa$ B $\alpha$ 는 HAC에 의해 발현이 증가되었으며, 핵분획에서의 NF $\kappa$ B 발현은 HAC의 전처치에 의하여 유의하게 감소하였다.
  4. IL-6와 IL-1 $\beta$ 는 LPS에 의해 유의성있게 증가되었으며, HAC의 전처치에 의해 유의성 있게 감소시켰다.

이러한 결과로 보아, HAC는 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 NO 및 과량의 pro-inflammatory cytokine 생성과 관련된 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

### 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

### 참고문헌

1. 신민교. 임상분초학. 서울:영림사. 1997:688-9.
2. 정보섭, 신민교. 도해향약대사전. 서울:영림사. 2003:1016-7.
3. 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향에 대한 연구. 대한한방내과학회지. 2005;26(4):853-63.
4. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진이 TGF- $\beta$ 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(3):141-55.
5. 최인호, 김연희, 이동녕, 김형준. *Candida albicans*에 대한 계지, 백두옹, 백선피, 백작약, 빈랑, 인진의 항진균효과. 동의생리병리학회지. 2005;19(3):690-5.
6. 함인혜, 정성웅, 이경진, 박규하, 최호영. 인진호와 한인진이 Triton WR-1339로 유도된 고지혈증 흰쥐에 미치는 영향. 대한분초학회지. 2005;20(1):45-52.
7. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진 butanol 분획의 TLC추출성분이 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(2):57-69.
8. 이지현, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 HepG2 인체간암세포의 TGF $\beta$ 1-induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(1):53-61.
9. 김이화, 김연희, 김연정, 장미현, 정주호, 김창주. 인진 약침액이 신경아세포주에서 에탄올에 의해 유발된 아포토시스에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(1):90-5.
10. 강우성, 이장훈, 우홍정. 인진과 인진사령산가 감방이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999;20(1):91-105.
11. 이채중, 김형환, 김종대, 김철호. 인진호의 열수 및 메탄올, 에테르, 부탄올 추출물이 CCl<sub>4</sub>유발에 의한 간독성 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(1):100-7.
12. 우홍정, 이장훈, 김영철. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol중독 및 CCl<sub>4</sub> 중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):411-29.
13. 이재동, 김재규. 인진수침이 Dimethylnitrosoamine으로 유발된 흰쥐의 손상간에 미치는 영향. 경희대논문집. 1991;14:315-31.
14. 손갑호, 김성훈. 시호(柴胡), 인진(茵陳)의 간암세포에 대한 항암활성 및 항암제와의 상승(相乘)작용. 대한한의학회지. 1995;16(2):414-32.
15. 박진상, 문석재, 문구, 원진희. 인진추출물이 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포주의 iNOS 발현 및 superoxide 형성에 미치는 영향. 한국

- 전통의학회지, 1999;9(1):200-11.
16. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol*. 2000; 10:8-15.
  17. 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.
  18. McDaniel 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.
  19. 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.
  20. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL. TNF and IFN $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*. 1994;6:399-406.
  21. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 2000;28:217-26.
  22. 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.
  23. 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.
  24. Yoon TG, Byun BH, Kwon TK, Suh SI, Byun SH, Kwon YK, Kim SC. Inhibitory effect of *Farfarae Flos* water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2004;18(3):908-13.
  25. 장선일, 김형진, 황기명, 배현욱, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지*. 2002;10(2):189-197.
  26. 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.
  27. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2003;17(3):771-6.
  28. Chun SC, Jee SY, Lee SG, Park SJ, Lee JR, Kim SC. Anti-Inflammatory Activity of the Methanol Extract of *Moutan Cortex* in LPS-Activated Raw264.7 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007;4(3):327-33.
  29. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by sauchinone

- effects on I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology*. 2003;139:11-20.
30. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 2001;159(2):387-97.
  31. 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.
  32. 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1992:328-9.
  33. 木村正康. 漢方藥理學(1). 東京:南山堂. 1997:311-2.
  34. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-6.
  35. Kubes p. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*. 2000;47:6-9.
  36. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69:625-35.
  37. 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 RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2001;76:119-23.
  38. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 오미소독음이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2002;16(2):921-7.
  39. 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.
  40. Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1 $\beta$  in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest*. 1993;23:311-9.
  41. 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.
  42. 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.