

葎草가 항염 효과에 미치는 영향

황순이^{1)*} · 조미정^{2,3)} · 김상찬^{2,3)} · 지선영¹⁾

1) 대구한의대학교 안이비인후피부과교실

2) 한의과대학

3) 한방신약개발팀 (BK21 Team)

Anti-inflammatory effects of the MeOH extract of *Humulus japonicus* in vivo

Sun-Yi Hwang · Mi-Jeong Jo · Sang-Chan Kim · Seon-Young Jee

Objectives : The present study was examined to evaluate the anti-inflammatory effects of the *Humulus japonicus* MeOH extracts (HJE) in vivo.

Methods : The effects of HJE on anti-inflammation were measured by production of NO, iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), COX-2, I κ B α (Inhibitor kappa B alpha), NF κ B (Nuclear Factor kappa B), TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) and IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6 in Raw 264.7 macrophage cells stimulated with LPS.

- Results** :
1. All concentrations of HJE(0.03 and 0.10 mg/ml) had no significant cytotoxicity in Raw 264.7 cell during the entire experimental period.
 2. The level of NO and iNOS in culture medium was dramatically increased by LPS application. However, these increases were dose-dependently(0.03 and 0.10 mg/ml) attenuated by treatment with HJE.
 3. HJE extract reduced PGE₂ levels in a dose-dependent manner as a consequence of inhibition of COX-2 protein expression in Raw 264.7 macrophage cells stimulated with LPS.
 4. 0.10 mg/ml HJE significantly inhibited the phosphorylation of I κ B α indicating the suppression of NF- κ B pathway in Raw 264.7 macrophage cells stimulated with LPS.
 5. 0.10 mg/ml HJE significantly inhibited the production of TNF- α in Raw 264.7 macrophage cells stimulated with LPS.
 6. All concentrations of HJE significantly inhibited the production of IL-1 β , IL-6 in Raw 264.7 macrophage cells stimulated with LPS.

Conclusions : These results provide evidences that therapeutic effect of HJE on heat syndrome, especially due to the acute inflammation, are partly due to the reduction of some of inflammatory factors by inhibiting iNOS and COX-2 through the suppression of p-I κ B α . Moreover, it suggests that the mechanism of action of HJE comes from the suppression of inflammatory mediators, such as NO, PGE₂ and pro-inflammatory cytokines.

Key words : *Humulus japonicus*, Anti-inflammatory effects, NO, iNOS, COX-2, I κ B α , NF κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6

I. 서 론

염증 반응 물질 중 NO (Nitric Oxide) 및 COX-2 (Cyclooxygenase-2)의 생성 저해제는 염증 반응조절제로서의 가능성 때문에 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 牡丹皮, 靑黛, 苦楝皮, 款冬花, 當歸, 香附子 등의 한약에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다¹⁻⁷⁾.

濕熱壅塞之實證을 주하고 外瘍과 陽毒에 外敷할 수 있는 약으로 주변에서 쉽게 구할 수 있는 울초 (葎草, *Humulus japonicus*)는 梁代 陶弘景의 《名醫別錄》에 勒草로 처음 수록되어 있으나 현재 임상에서 많이 사용되지 못하고 있는 실정이다^{8,9)}. 현재까지 울초에 대한 연구로는 세포보호작용, 항돌연변이효과, 항산화작용 등이 보고되고 있으나 습열을 치료하는 기전과 관련된 연구는 드물다¹⁰⁻²⁾.

이에 울초의 항염증효과의 기전에 관한 연구로 저자는 MeOH로 추출된 울초 (HJE)가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서의 NO 생성, iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), COX-2 발현 및 $I\kappa B\alpha$ (Inhibitor kappa B alpha), $NF\kappa B$ (Nuclear Factor kappa B), $TNF-\alpha$ (Tumor Necrosis Factor-alpha), $IL-1\beta$ (Interleukin-1 β), $IL-6$ 등의 염증매개물질 발현에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.

II. 재료 및 실험방법

1. 울초 추출물 (HJE)의 제조

울초는 2008년 7월 대구광역시 수성구 외환동

원장지 주변에서 채취하였으며, 울초 400 g을 MeOH 6L에 넣고 3일간 추출한 후, 추출물을 거즈로 1차 여과하고 3000×g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 Rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결 건조하여 28.81 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20℃에서 보관하였다. HJE의 수율은 7.20%였으며 DMSO에 녹여 사용하였다.

2. 시약 및 기구

LPS (Difco, Detroit, MI, USA)와 MTT는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, FBS와 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. $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, COX-2의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells는 한국세포주연구재단 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cell은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

교신저자 : 황순이, 대구 수성구 상동 165

대구한의대학교 부속 대구한방병원 안이비인후과부과교실

(Tel : 053-770-2178, E-mail : sunnyh1005@dhu.ac.kr)

• 접수 2009/06/22 • 수정 2009/07/22 • 채택 2009/08/03

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells를 96 well plates에 5×10^4 cell/well로 분주한 다음 HJE를 농도별로 처치하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.03 및 0.10 mg/ml의 농도로 HJE를 처치한 후에 37°C, 5% CO₂의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml)를 50 µl 넣고 4시간 배양한 후 배지를 조심스럽게 제거하고 생성된 Formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, Austria)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100/(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

5. NO 생성량 측정

Raw 264.7 cells로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 50 µl와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H₂O) 50 µl를 96 well plates에 혼합하고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하였다. NO₂의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

20 mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM

b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000×g로 10분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. 각 단백질의 발현은 각 단백질에 특이적 항체를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, 2차 antibody는 Alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit을 사용하였다. 단백질의 발현은 ECL western blotting detection reagents (Amersham, UK)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다. 발색 후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 Densitometric analysis를 실시하였다.

7. Cytokine과 PGE2 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6 well plates에 5×10^5 cell/ml를 분주하고 HJE를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치 후 각 cytokine마다 특정 시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 바로 측정하거나, 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF-α, IL-1β와 IL-6는 ELISA Kit를 사용하여 측정하였으며, PGE₂는 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)를 사용하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

8. 통계적 검증

실험 결과는 mean±SD로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman - Keuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

III. 결 과

1. NO production에 미치는 영향

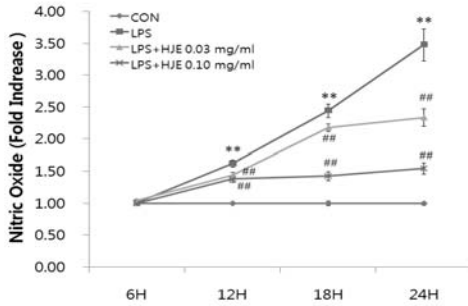
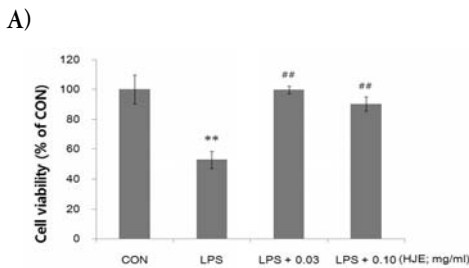


Fig. 1. Effects of HJE on the production of NO by LPS.

Raw 264.7 cells were treated with 0.03, 0.10 mg/ml of HJE dissolved in DMSO for 1 h prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), and the cell was further incubated for 24 h. The concentration of nitrite and nitrate in culture medium was monitored as described in materials and methods section. Data represent the mean \pm SD with eight separate experiments.

*: significant as compared to control, ** $p < 0.01$
#: significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$

2. Raw 264.7 cells의 생존율에 미치는 영향



3. iNOS 발현에 미치는 영향

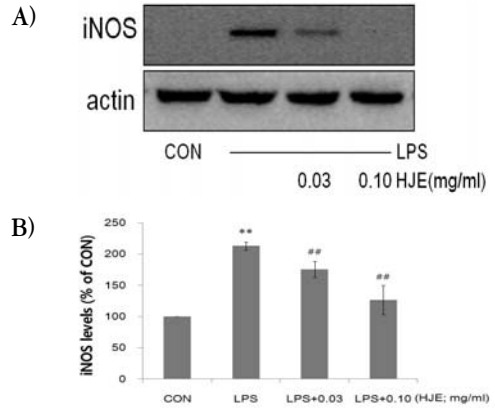


Fig. 3. Effect of HJE on the induction of iNOS expression by LPS.

The level of iNOS protein was monitored 24 h after treatment of cells with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) with or without HJE (0.03, 0.10 mg/ml) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS protein were determined by immunoblot analysis using specific iNOS antibodies. The actin was used as a loading control (A). The relative density level of protein bands was measured by scanning densitometry (B). Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. One-way ANOVA was used to compare the multiple group means followed by Newman - Keuls test.

*: significant compared with the control, ** $p < 0.01$
#: significant compared with the LPS alone, ## $p < 0.01$

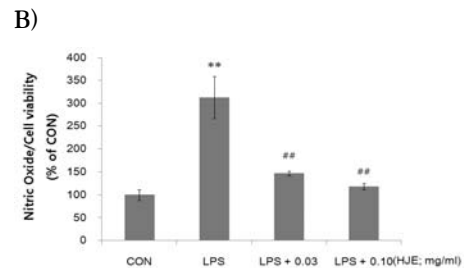


Fig. 2. Effects of HJE on the cell viability (A) and NO/cell viability (B) in LPS stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with 0.03, 0.10 mg/ml of HJE dissolved in DMSO for 1 h prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), and the cell was further incubated for 24 h. Data represent the mean \pm SD with eight separate experiments.

*: significant as compared to control, ** $p < 0.01$
#: significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$

4. I κ B α , NF κ B 발현에 미치는 영향

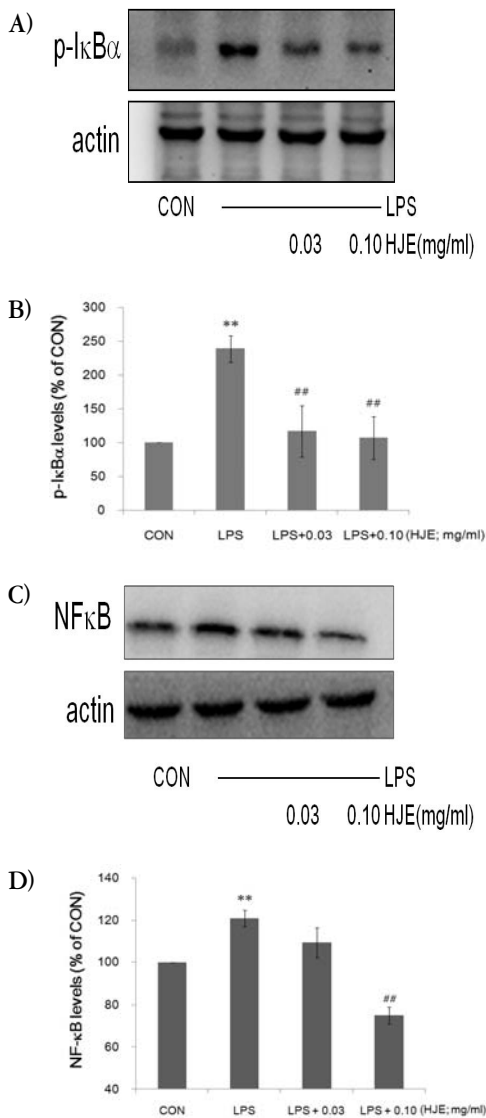


Fig. 4. Effects of HJE on the expression of I κ B α and NF κ B by LPS.

The level of I κ B α and NF κ B protein was monitored 15 min and 60 min after treatment of cells with LPS (1 μ g/ml) with or without HJE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The actin was used as a loading control (A, C). The relative density level of the bands was measured by scanning densitometry (B, D).

*: significant as compared to control, ** $p < 0.01$

#: significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$

5. TNF- α 에 미치는 영향

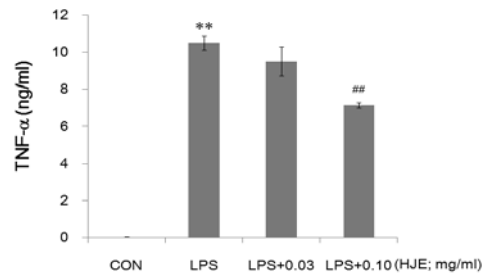


Fig. 5. The effect of HJE on LPS-stimulated TNF- α production.

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 HJE for 12 h. 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 Newman - Keuls test.

*: significant as compared to control, ** $p < 0.01$

#: significant as compared to LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

6. COX-2의 발현에 미치는 영향

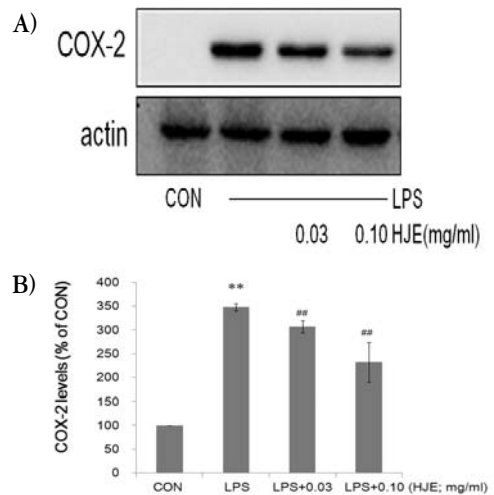


Fig. 6. Effect of HJE on the induction of COX-2 by LPS.

The level of COX-2 protein was monitored 24 h after treatment of cells with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) with or without HJE (0.03, 0.10 mg/ml) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of COX-2 protein were determined by immunoblot analysis using COX-2 specific antibodies. The actin was used as a loading control (A). The relative density level of protein bands was measured by scanning densitometry (B). Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. One-way ANOVA was used to compare the multiple group means followed by Newman - Keuls test.

*: significant compared with the control, ** $p < 0.01$
#: significant compared with the LPS alone, ## $p < 0.01$

7. PGE₂에 미치는 영향

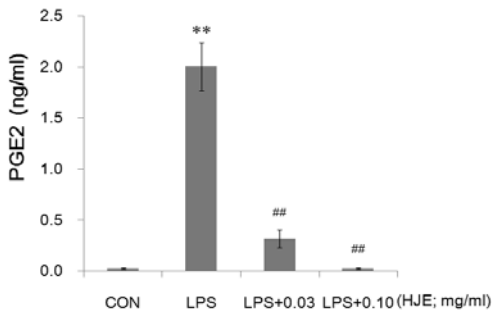


Fig. 7. Inhibition of LPS-activated PGE₂ production by HJE.

Raw 264.7 cells were cultured with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of HJE for 24 h to determine the level of PGE₂. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE₂. The data represent the mean \pm SD of three separate experiments. One-way ANOVA was used to compare the multiple group means followed by Newman - Keuls test.

*: significant compared with the control, ** $p < 0.01$
#: significant compared with the LPS alone, ## $p < 0.01$

8. IL-1 β , IL-6에 미치는 영향

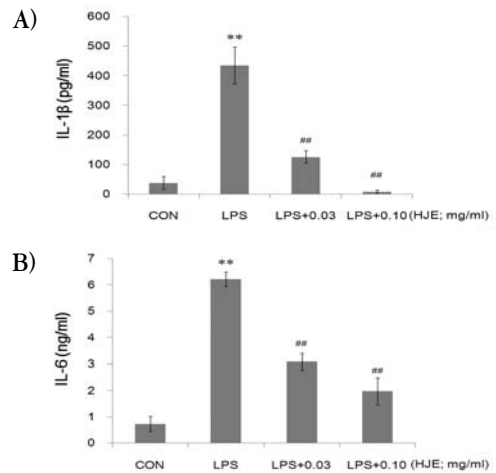


Fig. 8. The effect of HJE on LPS stimulated IL-1 β , IL-6 production.

Production of IL-1 β , IL-6 were measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of HJE for 12 h, 6h. The amount of IL-1 β , IL-6 were 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 Newman - Keuls test.

*: significant as compared to control, ** $p < 0.01$
#: significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$

IV. 고 찰

外瘍과 陽毒의 外敷에 사용되는 울초는 우리 주변에서 쉽게 구할 수 있음에도 불구하고 우리나라 임상에서 많이 응용되지 못하는 실정이다⁸⁾. 울초 (葎草, *Humulus japonicus*)는 삼과 (Cannabinaceae)에 속한 1년생 혹은 다년생 덩굴식물인 환삼덩굴의 전초로서, 잎은 대생하며 줄기와 엽병에 가시가 있고 7~8월에 담황색의 꽃이 피는 자웅이주의 식물로서, 우리나라 전역에 분포하고 있다^{11,13)}. 勒草,

黑草, 割人藤, 鋸鋸藤, 拉拉藤, 五瓜龍, 大葉五瓜龍 등의 別名으로 불리며^{8,9,14}), 性味는 苦甘寒無毒하고 肝肺大腸膀胱의 4經에 작용하며, 淸退虛熱, 淸熱解毒, 利尿通淋, 止泄痢, 驅瘀血 등의 효능이 있어, 虛熱不退, 瘧疾, 潮熱盜汗, 肺癆咳嗽, 癰腫, 瘰癧, 濕疹, 癢痒, 熱淋澀痛, 小便不利, 下痢, 痔疾, 肺結核, 肺膿瘍, 肺炎, 泄瀉 등의 병증을 치료한다^{14,15}). 울초의 성분 연구에 따르면 全草에는 luteolin, glucoside, choline, asparagine, tannin, 정유, 수지가, 열매에는 humulone, lupulone 등이, 잎에는 0.015%의 cosmosin과 vitexin 등이 들어 있다¹⁶). 또한 이 등, 박 등은 울초에 관한 세포 독성완화, 항산화효과를 보고하였다^{10,12}). 그러나 항염증효과의 기전에 관한 연구는 부족하여 저자는 울초의 iNOS 억제 기전 및 염증관련 cytokine의 발현에 대한 연구를 수행하였다.

염증(inflammation)은 전통적으로 “균의 감염, 열, 외상, 항원항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전”라고 정의되지만, 현재에는 염증을 신체 국소에서 일어나는 상해에 대한 생체조직의 방어반응으로 인식하고 있다. 즉, 각종 유해한 자극에 응답하여, 자극에 대한 상해를 제거하여 원래의 상태로 회복하려는 생체방어반응이 염증반응이다. 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창과 같은 징후가 발생된다^{17,18}). 수많은 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이 변화는 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 한다. 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, NO, PG, 염증을 유발시키는 여러 cytokine 등이 있다¹⁹).

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학전달 물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에

전달된다. 염증반응의 주요 화학 전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류 (histamine, serotonin 등)와 kinin류 (bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 PG와 IL류 등의 4군으로 분류된다¹⁶). 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 특히 염증반응에 관여하는 세포 중에서 대식세포는 각종 cytokine을 분비하여 대식세포의 유주, T 세포의 활성화와 증식억제, 혈관신생작용 등을 나타내어 염증반응을 조절한다고 인식되고 있다²⁰). 대식세포는 염증 반응시에 IL, TNF- α 와 같은 cytokine을 생산하고, COX-2를 활성화시켜 PG를 생산하여 감염초기의 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다^{21,22}). 또한 COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 세포자멸사의 억제, 세포분열 및 암세포 전이, 혈관신생을 유도하여 종양의 형성에 기여하는 것으로 알려져 있다²³).

Gram-negative 박테리아의 세포벽 구성성분인 LPS는 인지질, 다당류 및 소량의 단백질로 구성되며, 염증반응을 유발하는 유력한 인자로 대식세포의 TLR과 결합하여 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증반응 연구에서 빈용되는 실험모델이다²⁴). 일반적으로 LPS에 의해 활성화된 대식세포의 염증반응에는 다량의 Proinflammatory cytokines, NO, PGE₂가 iNOS와 COX-2에 의해 생성된다²⁵).

NO는 NOS효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 I형, II형, III형의 3종류가 있는데, 이 중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 I형이나 III형과 달리 II형은 iNOS로 cytokine이나 세균 등에서 분비되는 LPS나 calcium ionophore에 의해 일

부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion(O₂⁻)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 NO의 발생을 억제시켜 주는 것이 중요하다²⁶⁾.

본 연구에서는 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 HJE의 NO 생성억제를 평가하기 위하여 HJE를 0.03 및 0.10 mg/ml의 농도로 LPS 처치 전 1시간에 Raw 264.7 cells에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 12, 18, 24 시간에서 NO의 생성량이 다량 증가하였으며, 0.03 및 0.10 mg/ml HJE를 처치한 실험군에서는 시간 및 농도 의존적으로 유의성 있는 NO의 생성억제를 나타내었다.

HJE가 0.03 및 0.10 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제시킨 이유가 HJE의 세포독성으로 인한 것인지를 평가하기 위하여 HJE의 농도에 따라 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 실험에 사용된 HJE는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. HJE는 오히려 LPS에 의한 세포독성을 억제하였다. Sharifi 등은 PC-12 cell (Rat Pheochromocytoma)에서의 납의 독성은 납에 의한 NO의 과다생성이 세포독성을 유발함을 밝히고, 그 세포독성은 iNOS inhibitor인 L-NAME에 의해 억제됨을 밝혔다²⁷⁾. 이러한 결과로 볼 때 본 연구에서도 LPS에 의한 과량의 NO가 Raw 264.7 cells의 세포생존율을 저하시켰으며, HJE는 NO의 생성을 억제함으로써 세포생존율을 증가시킨 것으로 판단된다.

NO는 L-arginine으로부터 iNOS에 의하여 생성

되므로, HJE가 LPS로 활성화된 대식세포에서 iNOS의 발현에 미치는 영향을 평가하였다²⁸⁾. LPS 처치 시에는 iNOS의 발현이 유의하게 증가되었으나, LPS에 0.03 및 0.10 mg/ml HJE를 전처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. 이러한 HJE에 의한 iNOS의 발현의 억제는 NO의 생성 억제를 유도함을 의미한다.

COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. I형 효소인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다^{29,30)}.

한편, 염증에 관련되는 iNOS와 COX-2의 발현에 관여하는 것으로 NF κ B가 대표적인 전사조절 인자로 알려져 있다. 대식세포는 LPS 등의 염증유발 자극에 의해 NF κ B pathway가 활성화되어 iNOS나 TNF- α 등의 유전자 발현에 관련한다^{31,32)}. 또한 류마티오이드 관절염, 염증성 장질환, Multiple sclerosis, Psoriasis, Asthma 등의 질환에서도 NF κ B의 발현이 항진되어 있는 것으로 잘 알려져 있다³³⁾. 일반적으로 NF κ B는 세포질에서 억제단백질인 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105, p100 등과 결합하여 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 염증반응이 활성화되면 NF κ B 신호전달계가 작동되어 I κ B의 인산화가 진행되면서 NF κ B가 핵안으로 전위하여 COX-2, iNOS 등의 전사를 유도한다. I κ B 단백질의 종류는 α , β , ϵ 등의 여러 가지가 알려져 있지만, 세포내에서 가장 풍부한 NF κ B의 억제단백질은 I κ B α 이다³⁴⁾.

따라서 본 연구에서는 세포질에서의 COX-2, p-I κ B α , NF κ B의 발현을 평가하였다. COX-2는 LPS 처리시에는 3.5배 가량 단백질의 발현이 유의하게 증가되었으며, HJE를 전처리한 실험군에서는 COX-2의 발현을 유의하게 감소시켰다. 또한 세포

질에서 p-I κ B α 는 LPS 처치 시 유의하게 증가하였으나, HJE를 전처치한 실험군에서는 p-I κ B α 의 양이 유의하게 감소하였다. 또한 핵분획에서의 NF κ B는 LPS에 의해 유의하게 증가하였으며, 0.10 mg/ml의 HJE에 의해 유의하게 감소하였다. 이러한 p-I κ B α 및 NF κ B의 감소는 HJE가 I κ B α 의 인산화를 억제하고, 이차적으로 NF κ B가 핵으로 전위되는 과정을 억제함을 나타낸다.

PG는 Arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger이다. PG는 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 COX-2 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE₂, PGI₂는 혈관 투과성 향진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다^{30,35}. PGE₂는 세포막에 존재하는 인지질로부터 유래된 대사산물이며, phospholipase A2, COX 및 Hydroperoxidase가 관여하여 생성된다^{24,36}.

본 연구에서 LPS는 PGE₂의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, HJE는 LPS로 유도된 PGE₂를 유의성 있게 감소시켰다.

이러한 결과는 HJE가 LPS에 의한 COX-2의 발현 및 활성을 억제함으로써 인하여 PGE₂의 생성을 유의성 있게 감소시킴을 나타낸다.

한편, 대식세포는 LPS에 의해 다양한 cytokine, chemokine의 발현을 증가시킨다. cytokine으로는 TNF- α , IL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF 등이, chemokine으로서 IL-8, MCP-1 등의 발현이 증가된다³⁷. 이 중 TNF- α 는 pro-inflammatory cytokine으로서 monocytes, macrophages, mast cells 등으로부터 분비된다. 근래 TNF- α 는 많은

자가면역질환에 있어서 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{31,38}. 또한 염증관련 cytokine 중 IL-1은 화상 등의 경우에 PG, Leukotrienes, Platelet-activating factor, NO 등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다. 특히 IL-1 β 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, 간세포 등에서 분비되며, TNF- α , IL-2, IL-6와 함께 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 또한 IL-1 β 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화하고 hypothalamus에 작용하여 발열을 유도한다. 단핵구나 대식세포에서 분비되는 IL-6는 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로, IL-6의 level은 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다³⁸. 이에 본 연구에서는 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비를 측정하였다.

그 결과 LPS는 Raw 264.7 cells에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비를 유의하게 촉진시켰으며, HJE는 0.10 mg/ml의 농도에서 TNF- α 의 생성량을 유의하게 감소시켰다. 또한 HJE는 0.03 및 0.10 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 IL-1 β , IL-6의 생성량을 감소시켰다.

위의 연구결과를 종합하면, HJE가 NF κ B의 억제 단백질중의 하나인 I κ B α 의 인산화를 억제하여 NF κ B가 핵으로 전위되는 기전을 억제하고, 그 결과로 iNOS 및 COX-2의 발현이 억제되며, NO 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 cytokine이 감소되며, 또한 PGE₂의 생성을 억제함을 나타낸다.

이상의 연구결과는 울초추출물 (HJE)이 *in vitro*에서 유의한 항염증작용을 나타냄을 의미한다.

V. 결 론

울초추출물 (HJE)의 항염증효능을 평가하기 위

하여, 설치류 대식세포주인 Raw 264.7 cells를 LPS로 활성화시킨 후 NO의 생성량, iNOS, COX-2, I κ B α , NF κ B의 발현 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ 등에 미치는 HJE의 영향을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS에 의해 증가된 NO는 0.03 및 0.10 mg/ml HJE의 전처치에 의하여 시간 및 농도 의존적으로 유의하게 억제되었다. 또한 HJE 처치군은 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, HJE는 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였다.
2. HJE는 LPS로 증가된 세포질에서의 p-I κ B α 의 발현을 유의하게 억제하였으며, 핵분획에서의 NF κ B의 발현을 유의하게 억제하였다.
3. HJE는 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 분비되는 cytokine 중 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 유의하게 억제하였으며, LPS에 의해 발현이 증가된 COX-2, PGE₂는 HJE의 전처치에 의하여 유의하게 감소하였다.

이러한 결과로 보아, HJE는 NF κ B의 억제단백질 중의 하나인 I κ B α 의 인산화를 억제하여 NF κ B가 핵으로 전위되는 기전을 억제하고, 그 결과로 iNOS 및 COX-2의 발현이 억제되며, NO 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 cytokine이 감소되며, PGE₂의 생성을 억제함을 나타낸다. 따라서 淸虛熱藥으로 사용되는 울초는 과도한 NO 및 염증성 cytokine에 의한 염증성 질환의 치료에 적극 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. 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 Raw 264.7 cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007;4(3):327-33.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정헌택, 김운철. 활성화된 설치류 Raw 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지*. 2002;10(2):189-97.
6. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, Chung HT. 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.
1. Chun SC, Jee SY, Lee SG, Park SJ, Lee

7. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 항부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):771-6.
8. 張山雷. 張山雷醫集(本草正義). 北京. 人民衛生出版社. 1995:311
9. 陶弘景. 名醫別錄. 北京. 人民衛生出版社. 1986:165
10. 이정현, 이강창, 하대호, 손일홍, 이환봉, 오연균, 최대호, 김원신, 박승택, 전병훈. Methotrexate의 심근독성에 대한 울초의 효과. 동의생리병리학회지. 2001;15(4):585-9.
11. 박승우, 김성환, 정신교. 환삼덩굴 (*Humulus japonicus*) 추출물의 항돌연변이 효과와 Flavonoid 성분의 분리. 한국식품영양과학회지. 1995;27(6):897-901.
12. 박승우, 정신교, 박종철. 환삼덩굴로부터 분리한 Luteolin-7-O- β -D-Glucoside의 활성산소 소거능. 한국식품영양과학회지. 2000;29(1):106-10.
13. 신민교. 임상본초학. 서울. 영림사. 1997:449-50.
14. 蔣長遠. 中草葯臨床實驗錄. 重慶. 科學技術文獻出版社. 1984:124
15. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울. 정담. 1998:4377-80.
16. 허재연, 정창호, 심기환. 환삼덩굴 잎과 줄기의 화학성분. 농업생명과학연구. 2003;37:1-7.
17. 박광균. 구강생화학. 서울. 군자출판사. 1999:318-25.
18. 약품생화학분과위원회편. 분자약품생화학. 서울. 동명사. 2003:59-71.
19. 대한병리학회. 병리학. 서울. 고문사. 1995:71-104.
20. 정해영역. Toshio Hirano편저. 생명과학과 분자의학을 위한 분자생물학. 서울. 월드사이언스. 2002:73-85.
21. 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.
22. 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.
23. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. J Natl Cancer Inst. 2006;98(11):736-47.
24. 국윤범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. 대한한의학제학회지. 2002;10(1):113-29.
25. Posadas I, Terencio MC, Guillen I, Ferrandiz ML, Coloma J, Paya, M, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000;361:98-106.
26. 김룡규, 신경민, 천상국, 지사영, 서성훈, 박희준, 최종원, 이경태. 넙취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과. 약학회지. 2002;46(5):343-9.
27. Sharifi AM, Mousavi SH, Bakhshayesh M, Tehrani FK, Mahmoudian M, Oryan S. Study of correlation between lead-induced cytotoxicity and nitric oxide production in

- PC12 cells. *Toxicol Lett*, 2005;160:43-8.
28. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988; 333:664-6.
 29. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. *약학회지*. 1998;42(6):558-66.
 30. 서영준. 발암과정에 있어서 cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. *분자세포생물학뉴스*. 2001;13:8-17.
 31. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by saquinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British Journal of Pharmacology*. 2003;139:11-20.
 32. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 오미소독음이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2002;16(2):921-7.
 33. Williams AJ, Dave JR, Tortella FC. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration. *Neurochem Int*. 2006;49(2):106-12.
 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. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. *약학회지*. 1998;42(6):558-66.
 36. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6:3051-64.
 37. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001;13(2):85-94.
 38. 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.