

산국 꽃의 항염 활성 연구

유기선, 방찬성, 이경진, 함인혜, 최호영*

경희대학교 한의과대학 본초학교실

Anti-inflammatory effects of *Chrysanthemum boreale* flower

Kisun You, Chansung Bang, Kyungjin Lee, Inhye Ham, Ho-Young Choi*

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : *Chrysanthemum boreale* flower is widely distributed in Korea, Japan, China, and Eastern countries. *C. boreale* flower is also one of the herbs used for the treatment of various inflammatory disease in Korean Medicine. So, this research was designed to study anti-inflammatory effect of *C. boreale* flower and its mechanism.

Methods : We investigated nitro oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) production by ELISA. And expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor- κ B P50/65 (NF- κ B P50, NF- κ B P65) were measured in RAW 264.7 murine macrophage cells induced by LPS.

Results : MeOH ex., EtOAc fr., CHCl₃ fr. and Water fr. of *C. boreale* flower showed anti-inflammatory effect through inhibition of NO and PGE₂ expression respectively. Among them, EtOAc fr. and CHCl₃ fr. inhibited production of NO and PGE₂ through inhibition of iNOS and COX-2 expression. And MeOH ex., EtOAc fr. and CHCl₃ fr. inhibited translocation of NF- κ B P65, NF- κ B P50 by inhibiting phosphorylation of I κ B.

Conclusions : MeOH ex., EtOAc fr., CHCl₃ fr., and Water fr. of the *C. boreale* flower have anti-inflammatory activity.

Key words : *Chrysanthemum boreale*, anti-inflammatory effect, nitro oxide, prostaglandin E₂, inducible nitric oxide synthase, Cyclooxygenase-2, nuclear factor- κ B P50, nuclear factor- κ B P65

서론

산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로 우리나라 중부 이남의 산간지역에 널리 야생하고 있다^{1,2)}. 산국은 감국 *C. indicum*에 비해 꽃이 약간 작다는 차이점이 있지만 생육 시기나 식물의 형태가 매우 유사하므로, 산국 꽃은 감국 꽃과 같이 한약재 野菊으로 사용되었으리라 생각된다.

산국 꽃의 성분으로는 essential oil³⁾과 배당체, sesquiterpenoids 그리고 chrysanthemin 등이 있으며,⁴⁾ 정유 성분으로는 camphor, cis-chrysanthenol, α -thujone, 1,8-cineole, α -pinene, β -caryophyllene, germacrene, camphene, umbellulone 및 β -pinene 등이 보고되어 있다⁵⁾. Kang 등⁶⁾은 일부 항암 효과가 있다고 보고된 handelinelin을 분리하였으며, Han⁷⁾은 DPPH 라디칼을 소거 활성을 갖는

apigenin과 linarin을 분리하여 보고한 바 있다.

산국 꽃의 효능에 대하여 장 등⁸⁾은 꽃에서 분리한 sesquiterpene lactone은 인체암세포주인 UACC62, HCT15, UO-31, PC3 및 A549 cell에 비교적 강한 세포독성이 나타나는 것으로 보고하였다. 남 등⁹⁾은 꽃에서 분리된 일부 성분이 L1210, K562, A549세포에 항암 효과가 나타나는 것으로 보고하였다. 항균 활성에 대하여 장 등¹⁰⁾은 *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*에 항균 작용이 나타나는 것으로 보고하였으며, 남 등¹¹⁾은 산국 꽃의 chloroform 분획물이 감국 꽃보다 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 강한 항균력이 있다고 보고하였다. 그러나, 아직 산국 꽃의 항염 활성 및 기전에 대한 연구는 보고된 바 없다.

그러므로, 산국 꽃의 항염증 활성 및 기전을 밝히기 위하여 Lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 murine macrophage

*교신저자 : 최호영. 서울시 동대문구 회기동1 경희대학교 한의과대학 본초학교실.

· Tel : 02-961-9372. · E-mail : hychoi@khu.ac.kr.

· 접수 : 2011년 11월 1일 · 수정 : 2011년 11월 27일 · 채택 : 2011년 12월 16일

세포에 꽃의 MeOH 추출물과 분획물들을 처리한 후, Nitric Oxide (NO)의 생성량, prostaglandin E2 (PGE₂)의 분비량, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 Cyclooxygenase-2 (COX-2)의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 MeOH 추출물과 CHCl₃, EtOAc, water 분획물은 모두 유의한 항염증 효과를 나타내었고, 특히 chloroform 분획물은 뛰어난 항염증 효능이 있었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 산국 *C. boreale*의 꽃은 2007년 10월 경북 영천에서 채취하여 陰乾한 것으로 본 대학 본초학교실에서 감정한 후 細切하여 사용하였다. 시료의 일부는 경희대학교 한의과대학 본초학교실에 보관되어 있다 (Table 1).

Table 1. Plant and herbal materials used for experiments

Plant	Used Part	Vouchers	Locality	Date
<i>C. boreale</i>	flower	KSY001	Yeongcheon : Korea	October, 2007

Vouchers are kept in College of Oriental Medicine, KyungHee University.

2) 추출 및 분획

(1) 추출

산국 꽃 100g을 메탄올 (MeOH)을 용매로 하여 110°C 추출기에서 3회씩 반복 추출하고, 감압농축기를 이용하여 감압농축한 후 MeOH 추출물 32.3g을 얻었다.

(2) 분획

위에서 얻은 100% MeOH 추출물 32.3g을 열수에 녹인 후, CHCl₃과 EtOAc를 이용하여 분획한 후 각 층을 농축하여 water층 4.3g, CHCl₃층 2.7g, EtOAc층 0.56g 을 각각 얻었다.

2. 생리활성 실험

1) 세포 배양 및 LPS 처리

본 실험에 사용된 murine macrophage RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Korea)에서 분양받았다. RAW 264.7의 세포 성장을 위한 기본 배지로는 DMEM을 사용하였고, 10% FBS, streptomycin sulfate (100 µg/mL), penicillin G (100 units/mL), 10 mM sodium bicarbonate를 첨가하였다. RAW 264.7 세포는 2×10⁵ cells/mL의 농도로 T-flask에 접종하여, CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air)에서 37°C의 조건으로 배양하였다. Lipopolysaccharide (LPS) 1 mg을 1X PBS 1 mL에 녹여서 필터한 후 사용하였다. 각 실험에서 세포를 24시간 배양한 다음 일정량의 시료를 LPS 처리 1시간 전에 넣어서 배양한 후 10 µg/ml 농도로 LPS를 처리하여 실험을 진행하였다.

2) 세포독성 시험 (MTS assay)

산국 꽃 추출물 및 분획물의 세포 독성을 확인하기 위하여, RAW 264.7 세포에서 MTS/PMS (Cell Titer 96TM Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Cat. G5421-Promega)를 이용하여 MTS assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5×10⁴ cells/mL로 접종하고, 24시간 배양 후, 시료를 혈청이 첨가되지 않은 DMEM 배지에 1.25 µg/mL, 2.50 µg/mL, 5.00 µg/mL, 10.00 µg/mL, 20.00 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 24시간 후 MTS와 PMS를 20:1의 비율로 잘 혼합하여 처리하고 3시간 배양한 후, ELISA Reader (Versamax, Molecular Devices Co., U.S.A.)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Nitrite의 발현량 측정

iNOS의 활성을 관찰하기 위하여, NO 생성량을 측정하였다. RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Nitrate/Nitrite colorimetric assay kit를 이용하여 세포질에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였으며, 실험 방법은 Cayman Chemical Company의 지시에 따라 정량하였다.

4) PGE₂ 생성량 측정

COX-2의 활성을 조사하기 위하여, 세포 내 PGE₂의 양을 정량하였다. 실험은 NO assay와 동일한 방법으로 세포질 용액을 취하여 유리된 PGE₂의 양을 PGE₂ EIA system (Amersham, RPN222)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

5) iNOS 발현량 측정 (Western blot)

NO의 생성을 유도하는 효소인 iNOS의 단백질 발현량에 미치는 시료의 영향을 조사하기 위해 western blotting을 실시하였다. 시료를 처리한 세포를 모아 PBS로 2회 씻어낸 후 Pro-prep 시약 100 µL를 가하여 -20°C에서 10분간 방치한 뒤 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 세포 내 단백질 용액을 Pro-measure 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고, 50 µg의 단백질을 취하여 샘플 버퍼와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열한 후 -20°C에서 보관하였다. 완성된 샘플은 12% SDS-acrylamide gel에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane으로 단백질을 transfer시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk 용액에 실온에서 1시간 blocking 시킨 후, iNOS primary antibody를 5% skim milk 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4°C에서 overnight하였다. 다음날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후, mouse와 goat secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 ECL Western Substrate (PIERCE, #3216)용액과 1분간 반응시킨 후 X-선 필름 (Kodak)에 노출시켜 현상하였고, TotalLab V.2.01 Software program을 이용하여 정량하였다.

6) COX-2 발현량 측정 (Western blot)

PGE₂를 생성하는 COX-2의 단백질 발현량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 iNOS 측정과 같은 방법으로 western blotting을 실시하였다. 시료를 처리한 세포를 모아 PBS로 2회 씻어낸 후 Pro-prep 시약 100 µL를 가하여 -20°C에서 10분간 방치한 뒤 4°C에서 12000 rpm으로 10분간 원심 분

리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 세포 내 단백질 용액을 Pro-measure 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고, 50 μg 의 단백질을 취하여 샘플 버퍼와 혼합하여 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열한 후 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 완성된 샘플은 12% SDS-acrylamide gel에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane으로 단백질을 transfer시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk 용액에 실온에서 1시간 blocking 시킨 후, iNOS primary antibody를 5% skim milk 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 하였다. 다음날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 mouse secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 ECL Western Substrate (PIERCE, #3216) 용액과 1분간 반응시킨 후 X-선 필름 (Kodak)으로 현상하였다.

7) NF- κ B 발현량 측정

iNOS와 COX-2의 전사인자인 NF- κ B의 발현에 대한 시료의 영향을 조사하기 위해 Western blotting을 실시하였다. 시료를 처리한 세포를 모아 PBS로 2번 씻어낸 후 Nuclear Extract Kit를 이용하여 단백질을 추출하였다. 얻어진 세포 내 단백질 용액을 Pro-measure 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고, 100 μg 의 단백질을 취하여 샘플버퍼와 혼합하여 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열한 후 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 완성된 샘플은 12% SDS-acrylamide gel에 전기영동 시킨 후 PVDF membrane으로 단백질을 transfer시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk 용액에 실온에서 1시간 blocking 시킨 후, I κ B, P50, P65 primary antibody를 5% skim milk 용액에 정해진 비율대로 희석하고, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 하였다. 다음 날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 mouse secondary antibody를 1시간동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 BCIP/NBT시약을 이용하여 발색하였다.

결 과

1. 산국 꽃 추출물 및 분획물의 생리 활성 실험

1) 세포 독성 시험

MTS assay를 이용하여 1.25 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 산국 꽃의 세포독성 실험을 수행하였다. 그 결과 MeOH Ex, Water Fr, EtOAc Fr,은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으나, CHCl₃ Fr.에서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도일 때 대조군과 비교하여 cell viability가 각각 79.3%, 62.9%로 나타났다.(Fig1)

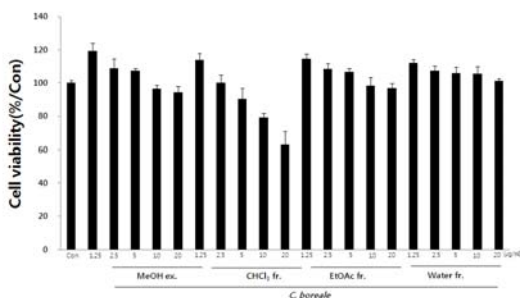


Fig. 1. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on cell viability in RAW 264.7 cell.

2) Nitrite 발현량 측정

LPS에 의해 RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Nitrate/Nitrite colorimetric assay kit를 이용하여 세포질에 존재하는 Nitrite의 형태로서 측정하였으며, 실험 방법은 Griess 시약을 사용하여 Cayman Chemical Company의 실험법에 따라 정량하였다.

그 결과 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 Nitrite 생성이 대조군에 비해 MeOH Ex, CHCl₃ Fr,과 EtOAc Fr, water Fr,에서 각각 약 38%, 78%, 30%, 53% 감소하였다.(Fig2)

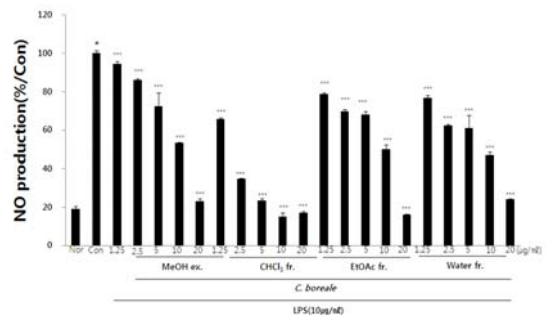


Fig. 2. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on LPS-induced nitrite production in RAW 264.7 Cells. #: p(0.05, compared with normal, ***: p(0.001, compared with control. The data were expressed as the mean \pm SD (N=3).

3) iNOS 발현 측정(Western blot)

Western blotting을 통해 산국 꽃이 RAW 264.7 cell에서 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, iNOS 발현양이 대조군에 비해 MeOH ex.에서 약19% CHCl₃ fr.에서 약 98%, EtOAc fr.에서 약 0.5%가 감소하였다. 그러나 water fr.에서는 153% 증가하였다.(Fig3)

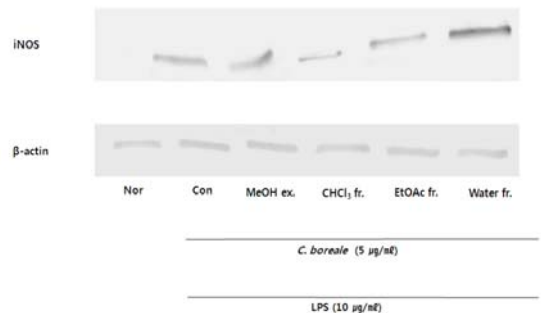


Fig. 3. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 Cells.

4) PGE2 생성량 측정

산국 꽃 추출물에 의한 COX-2의 활성을 조사하기 위해 세포내 PGE₂의 양을 정량하였다. 그 결과, PGE₂의 생성이 대조군에 비해 MeOH ex.에서 약 24%, CHCl₃ fr.에서 약 88%, EtOAc fr.에서 10% 감소하였다. 그러나 water fr.에서는 약 16% 증가하였다.(Fig4)

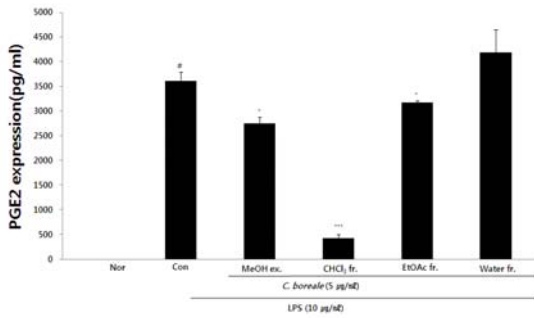


Fig. 4. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cell. #: p<0.05, compared with normal, *: p<0.05, ***: p<0.001, compared with control, The data were expressed as the mean ± SD (N=3)

5) COX-2 발현 측정

Western blotting을 통해 산국 꽃 추출물이 RAW 264.7 cell에서 COX-2 단백질의 발현에 미치는 변화를 확인하였다. 그 결과, COX-2의 발현량이 대조군에 비해 CHCl₃ fr.에서 약 37%가 감소하였고, EtOAc fr.에서는 23%가 감소하였다. 그러나 MeOH ex.에서는 약 26% 증가하였고, water fr.에서는 거의 변화가 없었다.(Fig5)

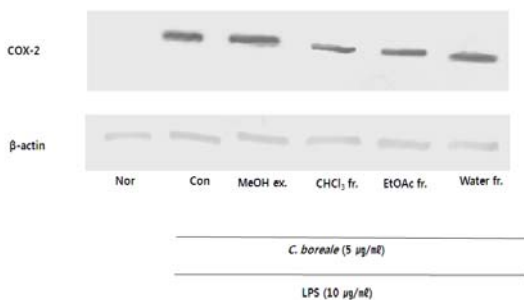


Fig. 5. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7 cell.

6) Iκ B 발현량 측정

산국 꽃 추출물에 의한 P50, P65의 활성을 조사하기 위해 P50, P65의 억제인자인 Iκ B의 양을 정량하였다. 그 결과 염증 유발시 IκB의 값이 39% 감소하는데 비해 산국 꽃의 MeOH ex.에서는 2%, CHCl₃ fr.에서는 거의 정상 값을 나타내었으며, EtOAc fr.에서는 15%가 감소하였다. 그러나 water fr.에서는 60%가 감소하여 염증 유발시보다 Iκ B가 더 감소하였다.(Fig6)



Fig. 6. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on LPS-induced Iκ B expression in RAW 264.7 cell.

7) NF-κ B (P50, P65) 발현 측정

산국 꽃 추출물이 P50, P65의 활성에 미치는 변화를 확인하였다. 그 결과 P50의 발현량은 대조군에 비해 MeOH ex.에서, 28%, CHCl₃ fr.에서 42%, EtOAc fr.와 water fr.에서 각각 36%, 22%가 감소하였고, P65의 발현량은 대조군에 비해 MeOH ex.에서, 18%, CHCl₃ fr.에서 22%, EtOAc fr.에서 20%가 각각 감소하였다. 그러나 water fr.에서는 8%가 증가하였다.(Fig7,8)

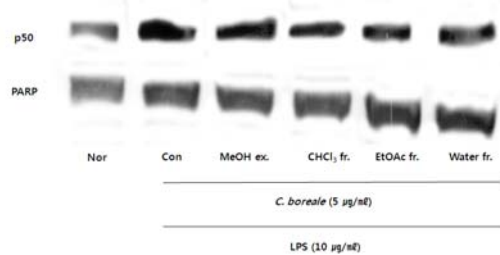


Fig. 7. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on LPS-induced P50 expression in RAW 264.7 cell.

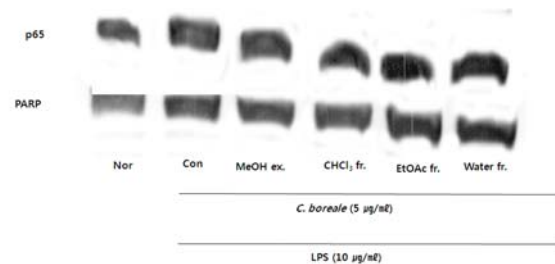


Fig. 8. The effects of *C. boreale* flower extract and fractions on LPS-induced P65 expression in RAW 264.7 cell.

고찰

국화 *C. morifolium*는 재배되고, 그 꽃을 건조하여 한약재 菊花(甘菊)로 사용하며, 감국 *C. indicum*의 꽃은 우리나라에서는 한약재 甘菊으로 사용하며, 중국에서는 野菊으로 사용한다. 정도의 차이는 있으나 모두 風熱을 疏散시키는 효능이 있다¹²⁾. 산국 *C. boreale*은 전국 각지에서 야생하며, 식물 형태가 감국 *C. indicum*과 매우 유사하므로, 산국의 꽃도 野菊으로 사용되었을 것으로 생각된다.

특히 野菊은 清熱解毒시키는 효능이 가장 강하여 瘡癰腫毒, 目赤腫痛을 치료하는데 가장 많이 사용된다¹²⁾. 이러한 효능은 항염증 작용과 관련이 있다고 볼 수 있다.

염증반응은 통증, 발적, 열종창 등의 증상을 수반하며¹³⁾, 과도한 염증반응은 암, 비만, 2형 당뇨, 심혈관 질환, 퇴행성 신경질환, 노화 등을 유발할 수 있다¹⁴⁾.

본 실험에서 사용된 RAW 264.7 cell은 murine macrophage로서 박테리아의 세포벽성분인 LPS에 의해 세포의 NOS 효소가 활성화 되면 세포의 염증반응의 중요한 인자인 NO 농도가 증가하게 된다. 이러한 특성에 의해 세포독성을 갖는 물질들의 독성검정을 위해 유용하게 사용되고 있다¹⁵⁾.

본 실험에서는 MTS assay를 이용하여 산국 꽃의 세포독성 실험을 수행하였다. 그 결과 MeOH ex, Water fr, EtOAc fr.은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으나,

CHCl₃ fr.에서 10 µg/ml, 20 µg/ml의 농도일 때 대조군과 비교하여 독성을 나타내었다. 따라서 이후 실험에서는 세포 독성이 없는 5 µg/ml의 농도로 실험을 진행하였다.

NO는 생리적, 병리적 기능을 두루 수행하는 인자로 합성(synthesis)과 다양한 메커니즘에 작용하며, 염증반응과 면역에 중요한 인자이다^{16,17}. 또한 NO는 신경계통 조직에서 신경 전달물질, 신경조절물질 또는 이차전령물질(second messenger)로 작용하는 것으로 알려진 free radical로서 NO의 형성은 흥분성 아미노산 수용체에 대한 자극과 관련이 있으며, 일단 산화질소가 생성되면 수용성 guanylate cyclase가 자극된다. NO는 산화질소 합성효소(NOS)에 의하여 arginine으로부터 합성되며 이때 NADH (Enoyl-acyl carrier protein reductase)와 함께 tetrahydrobiopterin이 조효소로 작용하는 것으로 알려져 있다¹⁸. NO는 iNOS에 의해 발생되는데 iNOS는 외부자극에 반응하여 생체를 방어하려는 목적으로 단시간에 다량의 NO를 생성하여, 급만성 염증에 관여하여, 숙주 세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하지만, 관절염과 같은 질환에서는 과잉 분비된 NO가 괴사, 통증 등의 이차적인 부작용을 일으키게 된다. 그러므로 이러한 NO를 발생시키는 iNOS의 활성을 억제하거나 단백질 발현을 억제하는 것은 많은 염증성 질병에서 치료의 중요한 관건이 되고 있다^{19,20}.

본 실험에서는 LPS에 의해 RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양을 측정하였으며, NO 발현량을 확인한 후 RAW 264.7 cell에서 iNOS 단백질 발현에 미치는 변화를 확인하였다.

그 결과 산국 꽃 추출물과 분획물은 iNOS 발현과 NO생성을 억제하여 항염효과를 나타낸다는 결과를 얻었으며, 클로로포름 분획물에서 가장 높은 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

Cyclooxygenase (COX)는 효소로서, 세포막에 존재하는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시켜 염증작용에 있어서 중요한 매개자인 prostaglandin의 합성을 조절하며 transform cell, 폐의 악성 종양, 또는 직장암에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 두개의 isoenzyme인 COX-1과 COX-2가 있다^{21,22}. COX-1은 정상 상태에서 발현하여 위장관 보호, 신장 기능조절과 같은 신체의 항상성 유지에 관여하며, COX-2는 염증이나 oxidative stress, 기타 면역 반응시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokine)류에 의해, 세포내 발현이 증가한다²³.

이 COX 활성에 따른 주요 산물이 바로 PGE₂이며, 염증질환, 자가면역질환, 종양성 질환의 병리에서 중요한 역할을 하며, 특히 염증 반응의 중요한 물질로 매개된다²⁴.

본 실험에서는 Western blotting을 통해 산국 꽃 추출물 및 분획물을 이용하여 COX-2와 COX-2 염증 기전에 관련된 PGE₂의 발현량을 측정하였다.

세포내 PGE₂의 생성을 정량한 결과 CHCl₃ fr. MeOH ex. EtOAc fr.에서 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 CHCl₃ fr.에서 가장 효과가 뛰어났다.

산국 꽃 추출물이 COX-2 단백질의 발현에 미치는 변화를 확인한 결과 PGE₂에서처럼 CHCl₃ fr.에서 발현량이 가장 많이 억제되었고 EtOAc fr.에서도 억제가 되었으나 MeOH ex.에서는 효과가 없어 MeOH ex.의 경우 COX-2가 아닌 다른 요소가 작용하는 것으로 생각되어진다.

NF-κ B는 단백질이 생성된 후의 변형과 세포내에서의 위치 변화에 따라 그 작용이 결정되는 특성을 지닌 전사 인자의 일종이며, 면역글로블린의 kappa light chain 유전자의 intronic enhancer에 존재하는 11개의 nucleotide에 결합하는 특이 단백질로서 1986년 Sen과 Baltimore에 의하여 처음 발견되었다. NF-κ B 전사인자군은 여러 가지 subunit로 구성된 homo- 또는 heterodimeric 이중합체들로서 특징지어진다고 알려져 있다²⁵. NF-κ B는 극소수의 세포를 제외하고 각종 조직에서 거의 어디에나 발현되며 염증, 면역, 세포자멸사(apoptosis), 발암, 조직재생 등 다양한 기능을 수행함이 알려져 있다²⁶. 특히 염증발현에는 encode inflammatory cytokines, adhesion molecules, chemokines, growth factor (GF), COX-2, iNOS 등의 유발 효소 세포의 표현력을 조절함으로써 영향을 미친다고 알려져 있다²¹. 포유류에서는 다섯 종류의 NF-κ B가 알려져 있는데, NF-κ B1(P50), NF-κ B2(P52), Rel 단백질 RelA(P65), RelB, c-Rel 등이 있으며, 활성화된 NF-κ B는 대부분의 세포에서 P50과 P65로 불리는 두 가지 하위구조 단백질로 구성된 이중합체가 가장 대표적이다²⁷. NF-κ B 단백질은 Iκ B라고 불리는 특이적 억제 단백질과 복합체를 이루고 있다. Iκ B는 다섯 가지가 있는데, Iκ Bα, Iκ Bβ, Iκ Bγ, Iκ Bε 와 Bcl-3가 있다. Bcl-3는 보조 활성화인자이고 나머지는 반응 억제 물질이다. 이중 P65 : P50 이합체(dimer)는 Iκ Bα 에 의해 억제되는 있는데, 이는 TNFα, IL(interleukin)-1, LPS, dsDNA에 IKKβ 가 활성화 되어 Iκ B를 활성화 시키고 인산화된 Iκ Bα 는 ubiquitination에 의해 분해되어 복합물을 이루고 있던 P65 : P50 이합체(dimer)가 유리되어 세포질로부터 핵 안으로 이동하여 전사인자로서 작용하게 된다고 알려져 있다^{28,29}.

본 실험에서는 산국 꽃 추출물에 의한 P50, P65의 활성을 조사하기 위해 세포내 P50, P65의 억제인자인 Iκ B의 양을 정량하였다. 그 결과 산국 꽃 추출물이 세포내에서의 Iκ B의 인산화를 억제하여 P50, P65가 세포질로부터 핵 안으로 이동하여 전사인자로서 작용하게 하는 것을 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 결과를 종합하여 볼 때 산국 꽃의 분획물 중에서 MeOH ex, CHCl₃ fr.과 EtOAc fr.에서 항염증 효과가 나타나며, 특히 CHCl₃ fr.에서는 강한 항염증 효과가 나타난다는 것을 알 수 있다.

결론적으로 清熱解毒의 효능으로 瘡癰腫毒의 치료에 사용이 가능한 산국 꽃 추출물 및 분획물의 항염증 활성 실험결과 NO생성과 PGE₂ 생성억제를 통해 항염증 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 그 중 CHCl₃ fr.과 EtOAc fr.은 iNOS와 COX-2의 발현 억제를 통해 NO생성과 PGE₂의 생성억제를 하는 것으로 나타났고, MeOH ex, CHCl₃ fr, EtOAc fr.에서는 Iκ B의 인산화를 억제하여 NF-κ B(P50, P65)의 이동을 억제하는 효과도 있는 것으로 나타났다.

결론

산국 꽃의 항염 활성 기전을 연구하기 위하여 LPS로 자극된 murine macrophage 세포에 산국 꽃 MeOH 추출물과 CHCl₃, EtOAc, Water 분획물을 투여한 후 NO 및 PGE₂ 생성량과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 측정하고, 세포내

IkB양과 p50, p65의 핵 내 발현량을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTS assay 결과 MeOH ex, CHCl₃ fr, EtOAc fr, Water fr. 등은 각각 5.00 µg/mL 의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
 2. NO 활성 측정 결과 MeOH ex,은 약 38% 억제하였고, CHCl₃ fr,은 약 78%, EtOAc fr,은 약 30%, Water fr,은 약 53% 억제하였다.
 3. iNOS 단백질 발현 측정 결과 MEOH ex,은 약 19% 억제하였고, CHCl₃ fr,은 98%, EtOAc fr,은 약 1% 억제하였다.
 4. PGE₂ 생성 측정 결과 MeOH ex,은 약 24% 억제하였고, CHCl₃ fr,은 약 88%, EtOAc fr,은 약 10% 억제하였다.
 5. COX-2 단백질 발현 측정 결과 CHCl₃ fr,은 약 37% 억제하였고, EtOAc fr,은 약 23% 억제하였다.
 6. Iκ B와 NF-κ B(P50, P65)의 발현량 확인 결과 MeOH ex, CHCl₃ fr, EtOAc fr,은 Iκ B의 인산화를 억제하여 NF-κ B(P50, P65)가 세포핵 내로 이동하는 것을 억제하는 것으로 나타났다.
- 이상의 실험 결과 산국 꽃 추출물 및 분획물이 항염 효과 및 기전을 확인할 수 있었다. 모든 추출물 및 분획물에서 일정한 항염 활성이 있었고, 특히 CHCl₃ fr.에서의 항염 활성이 가장 뚜렷하였다. 이러한 연구 결과는 한의학 임상에서 淸熱解毒의 목적으로 산국 꽃을 다양한 염증성 질환에 보다 적극적으로 응용할 수 있게 하고, 항염증 치료 한약제제 개발에도 응용될 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

1. Kim JG. Illustrated natural drugs encyclopedia, Seoul : Namsandang, 1997 ; 4(1) : 59.
2. Kim TJ. Korean resoures plants IV. Seoul : Seoul National Univ. Press, 1996 : 259.
3. Shin SH, Choi YI. Analysis of essential oil from *Chrysanthemum sibiricum* and the comparison with essential oils from some chrysanthemum spp. Korean Journal of Pharmacognosy, 1986 ; 13(153) : 153-6.
4. Lee TB. Illustrated flora of Korea, Seoul : Hyangmoon, 2003 : 379.
5. Hong CU. Essential oil composition of *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum*. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol, 2002 ; 45(2) : 108-13.
6. Kang SS, Kim JS, Son KH, Lee CO, Kim YH. Isolation of handelin from *Chrysanthemum boreale*. Arch Pharm Res 1996 ; 19(5) : 406-10.
7. Han WS. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Chrysanthemum boreale* Makino. Korean J Medicinal Crop Sci, 2003 ; 11(1) : 1-4.
8. Jang DS, Park KH, Ko HL, Lee HS, Kwon BM, Yang MS. Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several compositae plants. Part 3. Inhibitory activity on nitric oxide release and ACAT. Kor J Pharmacogn, 1998 ; 29(3) : 243-7.
9. Nam SH, Yang MS. Isolation of cytotoxic substances from *Chrysanthemum boreale* M. Agricultural Chemistry and Biotechnology, 1995 ; 38(3) : 273-7.
10. Jang DS, Park KH, Yang MS. Germacranolides from flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino. Kor J Pharmacogn, 1998 ; 29(2) : 67-70.
11. Nam SH, Yang MS. Antibacterial activities of extracts from *Chrysanthemum boreale* M. Agricultural Chemistry and Biotechnology, 1995 ; 38(3) : 269-72.
12. Seo MW, Joo YS. Textual discussion on *Chrysanthemum*. J. of Herbology, 1998 ; 13(1) : 233-6.
13. Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. Immunobiology. Seoul : Life Science Publication Co, 2002 : 42.
14. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Benedetto RD, Filesi C, Masella R. Polyphenols intracellular signalling and inflammation. Ann Ist Super Sanita, 2007 ; 43 : 394-405.
15. Spinass GA. The dual role of nitric oxide in islet beta-Cells. News Physiol Sci, 1999 ; 14 : 49-54.
16. Andreas K, Nussler, Timothy R, Billiar. Inflammation immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. J Leuko Biol, 1993 ; 54(2) : 171-8.
17. Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. FEBS Lett, 1995 ; 693 : 136-9.
18. Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, Seo EK, Lee KT. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-κ B inactivation in RAW 264.7 Macrophage Cells. Bio Pharm Bull, 2007 ; 30(12) : 2345-51.
19. Badger AM, Cook MN, Swift BA, Newmantra TM, Gowen M, Lark M. Inhibition of interleukin-1 induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/

- chondrocyte cultures by the natural product, hymenialdisine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 ; 290(2) : 587-93.
20. Dray A, Urban L. New pharmacological strategies for pain relief. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996 ; 36 : 253-80.
 21. Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E₂ : effect of anti-inflammatory drugs cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem.* 1999 ; 271(1) : 18-28.
 22. Lee J, Kim HJ, Choi HJ, You YH, Hwang KT, Lee MY, Park CS, Jun WJ. Effects of *Oenanthe javanica* on transcriptional regulation of COX-2 by inhibiting translocation of p65 Subunit in LPS-stimu. *Food Sci. Biotechnol.* 2006 ; 15(6) : 975-9.
 23. Kwon SK. SAR of COX-2 inhibitors. *Biomolecules & Therapeutics.* 2001 ; 9 : 69-78.
 24. Chou T, Earl Fu, Shen E. Chitosan inhibits PGE₂ formation and COX-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Com.* 2003 ; 308 : 403-7.
 25. Choi HS, Yoo CG, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS. Activation of the NF- κ B p50/p65 complex in human lung cancer cell lines. *Tuberculosis and Respiratory Diseases.* 1999 ; 46(2) : 186-7.
 26. Lee MS, Kim KA. NF- κ B pathway in metabolic/endocrine Diseases. *Journal of Korean Endocrine Society.* 2006 ; 21(5) : 352-3.
 27. Liou HC. Regulation of the immune system by NF- κ B and I κ B. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2002 ; 35(6) : 537-46.
 28. Kang GC, Kim BG, Park JS, Choi YS, Cha SJ, Park SJ, Chang IT, Park SI, Lee TJ, Choi YC. Correlation between the expression of nuclear factor- κ B p65 protein with the expression of nuclear factor- κ B p50 Protein and the clinicopathologic factors in colorectal cancer. *Journal of the Korean Surgical Society.* 2008 ; 75(2) : 84-9.
 29. Hwang IS, Jee YH. Correlation between the expression of nuclear factor- κ B p65 protein with the expression of nuclear factor- κ B p50 protein and the clinicopathologic factors in colorectal cancer. *Korean J Vet Res.* 2005 ; 45(1) : 7-15.