*J Korean Soc Food Sci Nutr*
*40(4), 486~492(2011)*

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2011.40.4.486

# LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서 애기땅빈대 (*Euphorbia supina* Rafin)의 염증매개물질 억제효과

박성철 · 손대열†

대구한의대학교 한방식품약리학과

# Inhibitory Effects of *Euphorbia supina* Rafin on the Production of Pro-Inflammatory Mediator by LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages

Sung-Chul Park and Dae-Yeul Son†

*Dept. of Herbal Food Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea*

## Abstract

**This study was designed to evaluate the effect of hot water extract (ESW) and 70% ethanol extract (ESE) from *Euphorbia supina* Rafin on LPS-stimulated inflammatory response in RAW 264.7 macrophages. Upon investigation at concentrations up to 1000 μg/mL, ESW and ESE did not have any cytotoxic effects on RAW 264.7 macrophages. ESW induced inhibition of 21.6%~54.8% of nitric oxide (NO) production at 100~1000 μg/mL, and $PGE_2$ production was inhibited up to 25.7%~38.2% at 250~1000 μg/mL, proportional to the ESW concentrations. ESW induced inhibition of 66.1% and 54.3% of IL-6 production at 250 and 1000 μg/mL, respectively. ESE (100~1000 μg/mL) induced inhibition of 38.3%~77.5% of NO, 40%~94.7% of $PGE_2$, and 43.9%~89.4% of IL-6 production, proportional to the ESE concentrations. Only 44.1% of IL-10 production was inhibited at a concentration of 500 μg/mL. ESE induced an increase in TNF-α production at a concentration of 100 and 250 μg/mL, whereas at high concentrations (500 and 1000 μg/mL), ESE induced inhibition of 19.2% and 92.4% of TNF-α production, respectively. In conclusion, concentrations of more than 500 μg/mL ESE demonstrated effective immune-modulating activity through inhibition of NO, $PGE_2$, IL-6, IL-10, or TNF-α production, as it relates to the macrophage's immuno-activity; therefore, ESE has potential as a good candidate substance for reduction of inflammatory responses.**

**Key words:** *Euphorbia supina* Rafin, inflammation, macrophage, nitric oxide, cytokine, prostaglandin $E_2$

## 서 론

애기땅빈대(*Euphorbia supina* Rafin)는 밭이나 들에서 자라는 대극과(*Euphorbiaceae*)에 속하는 일년생 초본으로 원줄기는 지면을 따라 퍼지며 길이 10~25 cm이고, 잎과 더불어 털이 다소 있고, 중앙부에는 붉은빛이 도는 갈색 반점이 있으며 백색의 유액이 함유되어 있다. 잎은 길이 5~10 mm, 너비 4~6 mm의 긴 타원형으로 마주나며 가장자리에 가는 톱니가 있고 수평으로 퍼져서 두 줄로 배열된다. 잎의 윗면은 진한 녹색으로 윤이 나고 뒷면은 녹백색이며, 잎자루는 몹시 짧다. 애기땅빈대는 우리나라와 중국, 일본, 동남아시아, 남북미 등 온대와 열대지방에 널리 분포하며 지금초(地錦草), 초혈갈(草血竭), 혈견수(血見愁), 오공초(蜈蚣草), 선도초(仙挑草)라고도 불리는데 항균, 항기생충, 해독, 지혈, 암, 염증 등에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(1-3). 애기땅빈대(*E. supina* R.)의 성분에 관한 연구로는 tannins(4,5), phenol성 물질 및 flavonoids(6,7), terpenoids(8,9) 등에 관한 연구가 보고되어 있고, 생물활성으로는 *in vitro*에서 항암활성과 항산화 활성이 보고되어 있다(10,11).

염증(inflammation)은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나이다. 염증은 유해물질이나 화학적 자극에 의한 손상으로 일어난다(12). 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증매개인자들(pro-inflammatory mediators)이 만들어지는데 이로 인하여 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다(13,14). 대식세포(macrophage)는 여러 종류의 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어와 숙주의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다(15,16). 대식세포가 이물질에 대응할 때 분비되는 interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α(TNF-α) 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다

†Corresponding author. E-mail: dyson@dhu.ac.kr
Phone: 82-53-819-1434, Fax: 82-53-819-1272

(17,18). 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구에서 TNF-α, IL-6, IL-1β 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다(19). 초기 염증반응에 깊이 관여하는 염증매개물질인 pro-inflammatory cytokine들의 형성은 phospholipase A2(PLA2)의 활성으로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 등을 대량 생성함으로써 염증매개에 큰 역할을 한다(17). 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(20,21).

본 연구에서는 항염증 효과가 있을 것으로 예상되는 애기땅빈대(*E. supina* R.) 추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증 매개물질 억제효과, 즉 NO, $PGE_2$, cytokine에 미치는 영향에 대해 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 애기땅빈대는 경북 경산시에서 2009년 10월경 생산된 것을 제천약초시장을 통해 구입하였다. 애기땅빈대 열수 추출물(ESW)은 분쇄한 애기땅빈대(100 g)에 물 1 L를 가하여 약탕기에서 2시간 2회 전탕한 후, 원심분리하여 Whatman No.1 여과지로 여과하고 감압농축 및 동결건조 하여 사용하였다. 애기땅빈대 에탄올 추출물(ESE)은 분쇄한 애기땅빈대(60 g)에 70% 에탄올 600 mL를 가하여 상온에서 24시간 교반추출한 후, 원심분리 하여 Whatman No.1 여과지로 여과하고 감압농축 및 동결건조 하여 시료로 사용하였다.

### 시약

Fetal Bovine Serum(FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), streptomycin-penicillin, Phosphate-BufferedSaline(PBS) 등의 세포배양용 시약은 Lonza(Walkersville, MD, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 lipopolysaccharide(LPS)는 SIGMA(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Cell proliferation assay(MTS)와 Griess reagent system은 Promega(Madison, WZ, USA)에서 구입하였다. Mouse IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α ELISA kit는 Pierce(Rockford, IL, USA)에서 구입하였고, Prostaglandis $E_2$($PGE_2$) ELISA kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 그 외 본 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 1등급 이상으로 사용하였다.

### 세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM에 10% inactivated fetal bovine serum과 100 U/mL penicillin G, 100 μg/mL streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% $CO_2$ 조건에서 배양하였다.

### 세포독성(MTS) 조사

애기땅빈대의 물 및 에탄올 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-caroboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetrazolium inner salt(MTS) assay 방법(22)으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다(23). 96 well plate에 $5\times10^4$ cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하여 24시간 배양한 후에, 시료를 농도별(100, 250, 500, 1000 μg/mL)로 처리하여 48시간 배양하였다. Well당 20 μL의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% $CO_2$ 조건에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader(Sunrise-basic, Tecan, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 세포만 배양한 무처리군의 생존도 100%를 기준으로 시료처리군의 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

### Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성되는 NO의 양을 세포 배양액 중 존재하는 $NO_2^-$의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용하여 측정하였다. 즉 96 well plate에 $5\times10^4$ cells/well RAW 264.7 세포를 분주하여 24시간 배양한 후에 다양한 농도(100, 250, 500, 1000 μg/mL)의 시료를 30분간 전처리한 다음, LPS(1 μg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액에 동일한 양의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% NED in 5% $H_3PO_4$)을 넣은 후 각 10분간 암반응 하였다. 발색정도를 microplate reader(Sunrise-basic)를 이용하여 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, NO의 농도는 $NaNO_2$ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

### Prostagladin $E_2$($PGE_2$) 측정

96 well plate에 $5\times10^4$ cells/well RAW 264.7 세포를 분주하여 24시간 배양한 후에 다양한 농도(100, 250, 500, 1000 μg/mL)의 시료를 30분간 전처리한 다음, LPS(1 μg/mL)를 처리하여 24시간 배양한 상층액을 13,000 rpm에서 15분 원심분리 하여 $PGE_2$ 정량에 사용하였다.

$PGE_2$의 측정은 제조사의 분석방법에 따라 정량하였다. 즉, goat anti-mouse polyclonal antibody로 코팅된 96 well plate에 준비된 standard 및 sample을 각각 150 μL씩 넣는다. Primary antibody solution을 50 μL씩 첨가하여 실온에서 1시간 반응, $PGE_2$ conjugate를 50 μL 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 4번 세척하여 substrate solution 200 μL씩 처리하여 실온 암소에서 30분간 반응시킨 후, stop solution을 100 μL씩 첨가하여 반응을 종결시켜서 microplate reader(Sunrise-basic)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 $PGE_2$값을 계산하였다.

### Cytokine(IL-6, IL-10, TNF-α) 측정

96 well plate에 $5\times10^4$ cells/well RAW 264.7 세포를 분주하여 24시간 배양한 후에 다양한 농도(100, 250, 500, 1000 μg/mL)의 시료를 30분간 전처리한 다음, LPS(1 μg/mL)를 처리하여 24시간 배양한 상층액을 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 cytokine 정량에 사용하였다.

Cytokine의 측정은 제조사의 분석방법에 따라 정량하였다. 즉, 각 cytokine에 반응하는 항체가 코팅된 96 well plate에 준비된 standard와 sample들을 각 50 μL씩 분주하여 실온에서 2시간 배양하고 3회 세척한 다음 biotinylated antibody reagent를 well당 50 μL씩 분주하여 실온에서 1시간 배양하였고, 3회 세척한 다음 Streptavidin-HRP solution을 well당 100 μL씩 분주하여 30분간 배양하고, 3회 세척 후 마지막으로 TMB substrate solution을 각 well당 100 μL씩 분주하여 실온 암소에서 반응시켰다. Stop solution(0.16 M sulfuric acid) 100 μL씩 첨가하여 반응을 정지시키고, microplate reader(Sunrise-basic)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

### 통계학적 검정

모든 실험은 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었다. 통계학적 분석은 SPSS Inc.(Chicago, IL, USA) Version 18.0을 이용하였으며, one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하여 $p<0.05$인 경우를 유의적인 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 세포독성

MTS를 이용하여 애기땅빈대의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 확인하였다. 애기땅빈대 ESW와 ESE를 농도별(100~1000 μg/mL)로 처리한 결과, ESW 및 ESE는 조사된 모든 농도에서 95% 이상의 생존율을 보여 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않은 것을 확인하였다(Fig. 1).

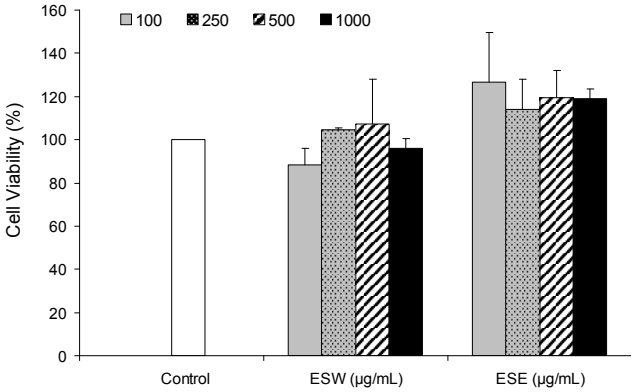


**Fig. 1. The effects of ESW and ESE on the viability of RAW 264.7 macrophages.** RAW 264.7 cells ($5\times10^4$ cells/well) were treated with different concentrations of ESW and ESE for 48 hr, and cell viability was determined by MTS assay. Results of three independent experiments were averaged to calculate the mean value of three independent experiments (SD=bars), and are shown as percentage cell viabilities compared with the viability of untreated control cells. ESW: water extracts from *E. supina* Rafin, ESE: 70% ethanol extracts from *E. supina* Rafin.

### Nitric oxide 생성 억제 효과

NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(24). NO의 합성경로는 세 가지 형태 즉, endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS), inducible NOS(iNOS)가 있는데 이중 iNOS는 칼슘의 농도에 상관없이 염증자극에 의해 지속적으로 다량 생성이 유도됨으로써 염증반응에 기여하게 된다(25). iNOS는 일반적으로 대식세포에서 TNF-α, IL-1β, IFN-γ와 같은 염증성 자극에 의해 유도되는 것으로 알려져 있으며, 특히 LPS 또는 세균의 lipopeptide를 처리하였을 때 급격히 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다(26). 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성(27)에 대한 ESW 및 ESE의 효과를 측정한 결과, LPS 처리군의 경우 NO의 농도는 66.30±4.44 μM/mL였고, ESW의 경우, 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 52.01±5.25 μM/mL, 45.17±1.54 μM/mL, 36.94±1.99 μM/mL, 29.91±3.62 μM/mL로 측정됨으로써 NO의 생성을 농도 의존적이고 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다. ESE의 경우, 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 40.94±0.57 μM/mL, 22.53±1.35 μM/mL, 16.78±1.0 μM/mL, 14.91±1.59 μM/mL로 측정됨으로써 NO의 생성을 농도 의존적이고 유의적으로 억제하였으며 ESW보다 높은 억제효과를 나타냈다(Fig. 2). ESW은 LPS 대조군에 비교하여 500, 1000 μg/mL 농도에서 NO의 생성을 각각 44.3%, 54.8% 억제하였는데, 이는 보두 700 μg/mL 농도에서 NO의 생성을 38.9% 억제한 것(28)보다 억제 효과가 좋은 것으로 나타났다. ESE은 LPS 대조군에 비교하여 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 NO의 생성을 각각 38.3%, 66%, 74.7%, 77.5% 억제하였으며, 이는 250 μg/mL 농도 이상의 조사된 모든 농도에서 보두 700 μg/mL 농도에서 38.9% 억제한 것(28)보다 양호한 것으로 나타났다. ESE 500, 1000 μg/mL의 경우는 보두산, 감초 700 μg/mL 농도에서 NO의 생성을 각각 69.5%, 77.4% 억제한 것(28)보다 억제 효과가 좋은 것으로 확인되었다.

### Prostagladin $E_2$($PGE_2$)

애기땅빈대 추출물의 LPS 처리군의 경우 $PGE_2$의 양은 1717.83±20.38 pg/mL였고, ESW의 경우, 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 1637.95±48.43 pg/mL, 1276.11±65.9 pg/mL, 1132.33±87.37 pg/mL, 1061.24±84.16 pg/mL로 측정됨으로써 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 $PGE_2$의 생성을

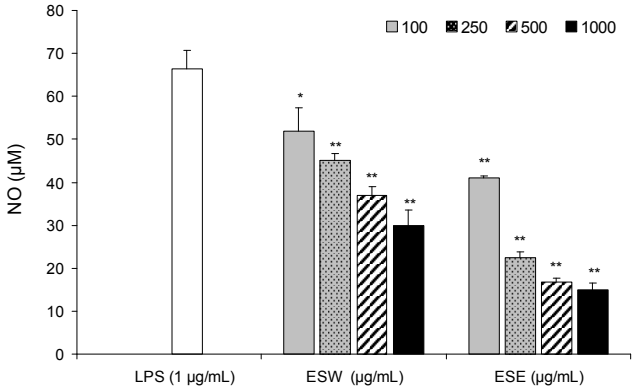


**Fig. 2. Effects of ESW and ESE on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.** RAW 264.7 cells ($5\times10^4$ cells/well) were treated with different concentrations of ESW and ESE for 30 min, and then stimulated with and without LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The nitrite concentrations in the medium were determined by Griess assay. Results of three independent experiments were averaged to calculate the mean value of three independent experiments (SD=bars). Asterisks indicate significantly different results gained from treatment with LPS alone ($^*p<0.05$, $^{**}p<0.001$). ESW: water extracts from *E. supina* Rafin, ESE: 70% ethanol extracts from *E. supina* Rafin.

유의적으로 억제하는 것으로 나타났다. ESE의 경우, 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 1027.69±324.22 pg/mL, 827.20±205.62 pg/mL, 129.88±82.42 pg/mL, 90.74±175.05 pg/mL로 농도 의존적이고 유의적으로 $PGE_2$의 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3). NO 생성억제효과와 마찬가지로 ESW보다 ESE가 훨씬 높은 $PGE_2$ 억제효과가 있는 것이 확인되었다.

ESW은 LPS 대조군에 비교하여 500, 1000 μg/mL 농도에서 $PGE_2$의 생성을 34%, 38.2% 억제하였는데, 이는 보두 700 μg/mL 농도에서 $PGE_2$의 생성을 23.2% 억제한 것(28)보다 억제 효과가 좋은 것으로 나타났다. ESE은 LPS 대조군에 비교하여 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 $PGE_2$의 생성을 각각 40%, 51.8%, 92.4%, 94.7% 억제하였는데, 이는 낮은 농도(100, 250 μg/mL)에서도 보두산과 보두(700 μg/mL)의 $PGE_2$ 생성억제(39.1%, 23.2%)(28)보다 억제 효과가 좋은 것으로 나타났으며, 고농도(500, 1000 μg/mL)의 경우는 보두산, 보두, 감초 700 μg/mL 농도에서 $PGE_2$의 생성을 각각 39.1%, 23.2%, 71.3% 억제한 것(28)보다 억제 효과가 월등히 좋은 것으로 확인되었다.

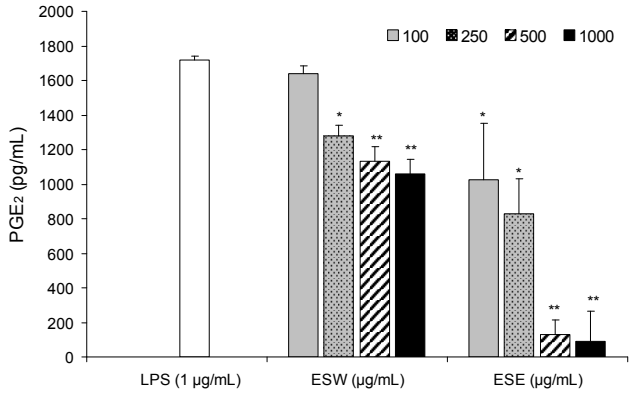


**Fig. 3. Effects of ESW and ESE on $PGE_2$ production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.** RAW 264.7 cells ($5\times10^4$ cells/well) were treated with different concentrations of the ESW and ESE for 30 min, and then stimulated with and without LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The $PGE_2$ in medium was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results of three independent experiments were averaged to calculate the mean value of three independent experiments (SD=bars). Asterisks indicate significantly different results from treatment with LPS alone ($^*p<0.05$, $^{**}p<0.001$). ESW: water extracts from *E. supina* Rafin, ESE: 70% ethanol extracts from *E. supina* Rafin.

Prostaglandin은 국소적으로 활성화되는 물질로서 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase(COX) 효소의 작용에 의해 합성된다. COX에는 두 가지 isoform인 COX-1과 COX-2가 있는데 COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준하게 만들어져 housekeeping 효소의 역할을 하는 반면, COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 대식세포, 단핵구, 혈관내피세포, 연골세포, 조골세포, 활막세포 등에서 분비된다(29). 조직이 손상되면 염증을 매개하는 물질들이 다량 생성되어 통증이 유발되게 되는데, 이중 $PGE_2$는 조직손상이 일어나는 부위에서 생성되어 말초신경 말단부위에 작용하여 통증에 대한 역치를 감소시키게 된다(30). 이와 같은 $PGE_2$를 ESW와 ESE가 억제하는 효과가 있는 것으로 보아 염증 조절에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

### Cytokine(IL-6, IL-10, TNF-α) 생성에 미치는 영향

그람음성 세균 세포외막의 성분인 LPS는 대식세포에서 면역기능을 조절하는 여러 분자 즉 IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 pro-inflammatory 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다(31,32). IL-6, IL-10, TNF-α와 같은 cytokine들은 각각 다양한 효과를 나타내지만 전반적으로 염증반응을 증가시키는데 관여한다(33). IL-6는 B와 T 림프구 기능을 조절, 생체 내 조혈작용을 하고, 급성기 반응의 유도물질이다. 또한, IL-1과 TNF-α와 더불어 염증에 중요한 작용을 하는 전염증성 매개물질에 속한다. IL-10은 B 림프구, 가슴샘세포, 비만세포의 증식을 자극 혹은 강화하고, TGF-β와 함께 사람 B 림프구에서의 IgA 합성과 분비를 자극하며, 조력 T 림프구의 TH1 형성을 상쇄시킨다. TH2 림프구에 의해 분비된 IL-10에 의한 TH1 림프구의 교차조절은 TH1 림프구를 직접적으로 방해하는 것이 아니다. 대신 IL-10은 단핵구와 대식세포에 작용하여 이들이 TH1 아집단을 활성화시키는 능력을 방해한다. 이는 항원전달세포 상에 제2형 MHC 분자의 발현을 억제할 수 있는 IL-10의 능력에서 기인하는 것으로 보인다. IL-10은 또한 단핵구-대식세포 계통에 강력한 면역억제 효과를 갖는다. 이를테면 병원체 파괴에 관여하는 산화질소나 다른 살균 대사산물의 생산을 억제하고 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, TNF-γ 와 같은 다양한 염

증성의 매개자 생산을 억제한다. 대식세포에 대한 이러한 억제효과는 TH1 활성화에 의한 생물학적 결과를 감소시키는 역할을 한다. TNF-α는 염증과 면역기능의 강한 매개물질이며, 다양한 세포의 성장과 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다. 다양한 세포에 세포독성 혈관형성, 골 흡수, 혈전과정을 촉진하고, lopogenetic 대사를 억제한다(33).

**IL-6 생성에 미치는 영향:** LPS 무처리군의 경우 6.78±2.73 pg/mL이었으나 LPS 처리함으로써 1563.43±37.04 pg/mL로 대폭 증가하는 것으로 나타났다. ESW의 경우, 250, 1000 μg/mL 농도에서 각각 529.63±184.75 pg/mL, 715.04±109.3 pg/mL로 측정됨으로써 IL-6의 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다. ESE의 경우, 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 877.77±179.29 pg/mL, 798.71±147.38 pg/mL, 473.25±56.49 pg/mL, 165.52±22.47 pg/mL로 농도의존적이고 유의적으로 IL-6의 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4). Kim 등(28)이 발표한 보두산, 보두, 감초의 IL-6 생성 억제효과는 700 μg/mL 농도에서 각각 70.7%, 61.9%, 61.1%였으며, 본 연구에서 진행된 애기땅빈대 ESW의 경우, 250, 1000 μg/mL 농도에서 각각 66.1%, 54.3%를 억제하여 비슷한 수준이었고, 특히 250 μg/mL 농도의 경우, 낮은 농도에도 억제효과가 더 뛰어난 것으로 나타났다. ESE의 경우, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 69.7%, 89.4% 억제하여 억제 효과가 더 뛰어난 것으로 나타났다.

**IL-10 생성에 미치는 영향:** IL-10 생성에 미치는 애기땅빈대 추출물의 영향은 LPS 무처리군의 경우 16.62±2.91 pg/mL이었으나 LPS 처리 후 45±7.84 pg/mL로 증가하였다. ESW의 경우 500 μg/mL 농도에서 IL-10 생성을 유의적으로 증가시켰고, ESE의 경우는 100, 250, 500, 1000 μg/mL

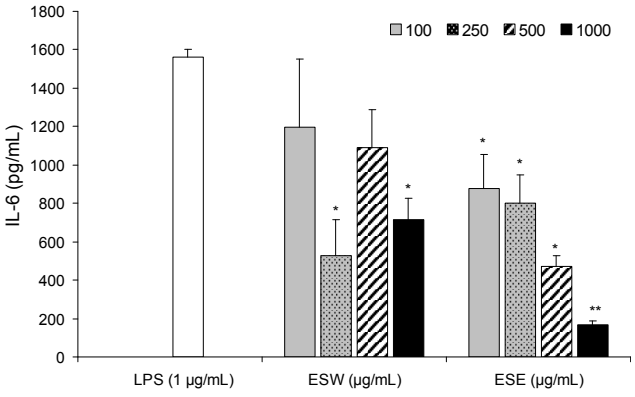


**Fig. 4. Effects of ESW and ESE on IL-6 production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.** RAW 264.7 cells ($5\times10^4$ cells/well) were treated with different concentrations of ESW and ESE for 30 min, and then stimulated with and without LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The IL-6 in medium was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results of three independent experiments were averaged to calculate the mean value of three independent experiments (SD=bars). Asterisks indicate significantly different results from treatment with LPS alone ($^*p<0.05$, $^{**}p<0.001$). ESW: water extracts from *E. supina* Rafin, ESE: 70% ethanol extracts from *E. supina* Rafin.

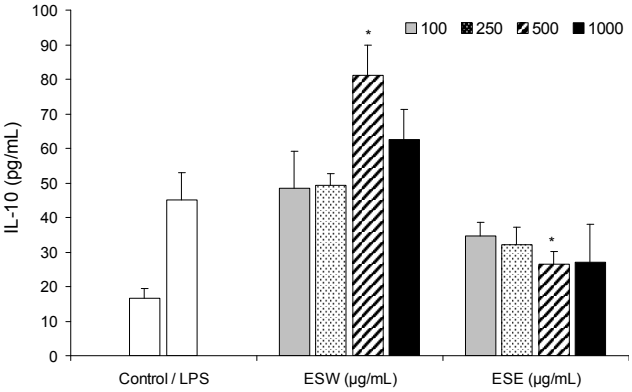


**Fig. 5. Effects of ESW and ESE on IL-10 production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.** RAW 264.7 cells ($5\times10^4$ cells/well) were treated with different concentrations of the ESW and ESE for 30 min, and then stimulated with and without LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The IL-10 in medium was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results of three independent experiments were averaged to calculate the mean value of three independent experiments (SD=bars). Asterisks indicate significantly different results from treatment with LPS alone ($^*p<0.05$). ESW: water extracts from *E. supina* Rafin, ESE: 70% ethanol extracts from *E. supina* Rafin.

농도에서 각각 34.57±4.11 pg/mL, 32.20±5 pg/mL, 26.51±3.58 pg/mL, 26.99±11.11 pg/mL로 측정되어 500 μg/mL 농도에서 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5). Yoon 등(34)이 발표한 황련의 항염증효과 연구에서는 대식세포에서 IL-10의 생성이 증가함으로 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 상대적으로 억제시킨다고 보고된 바 있다. 이는 TH2에 해당되는 IL-10의 대식세포에 대한 면역억제 효과로 인한 교차조절인 것으로 보인다. 반면에 본 실험의 에탄올 추출물(ESE)은 500 μg/mL 농도에서 IL-10의 생성이 유의적으로 억제되었음에도 불구하고, 다른 염증성 매개물질을 억제한 것으로 나타났다. 이는 TH1과 TH2 간의 교차조절로 인한 억제효과가 아닐 가능성이 시사되며, 추후 면역계 cytokine의 생성에 대한 연구를 통해 좀 더 정확한 원인을 규명할 수 있을 것으로 사료된다.

**TNF-α 생성에 미치는 영향:** LPS 처리 전 27.27±3.52 pg/mL 농도의 TNF-α 생성은 LPS 처리 후 4550.15±226.38 pg/mL로 증가하였다. ESW의 경우 500 μg/mL 농도에서 TNF-α의 생성을 유의적으로 증가시켰고, 반면 ESE의 경우 100, 250 μg/mL 농도에서 역시 TNF-α의 생성이 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으나, 500, 1000 μg/mL 농도에서는 3677.09±49.68 pg/mL, 346.22±16.14 pg/mL로 측정되어 TNF-α 생성이 유의적으로 억제되었다(Fig. 6). 특히, ESE은 LPS 대조군에 비교하여 1000 μg/mL 농도에서 TNF-α의 생성을 92.4% 억제하였는데, 이는 보두산, 보두, 감초 700 μg/mL 농도에서 TNF-α의 생성을 각각 81.5%, 41.2%, 62.9% 억제한 것(28)과 비교하여 월등한 TNF-α 생성 억제효과가 있는 것으로 확인되었다. TNF-α의 생성에 대한 영향은 ESW와 ESE가 상반된 결과를 나타냈는데, 이는 각각

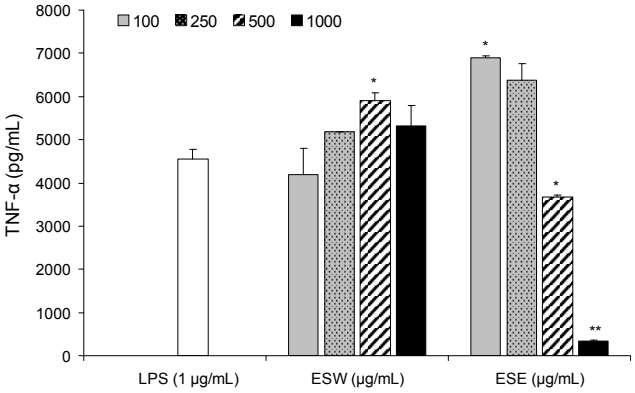


**Fig. 6. Effects of ESW and ESE on TNF-α production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.** RAW 264.7 cells ($5\times10^4$ cells/well) were treated with different concentrations of ESW and ESE for 30 min, and then stimulated with and without LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The TNF-α in medium was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results of three independent experiments were averaged to calculate the mean value of three independent experiments (SD=bars). Asterisks indicate significantly different results from treatment with LPS alone ($^*p<0.05$, $^{**}p<0.001$). ESW: water extracts from *E. supina* Rafin, ESE: 70% ethanol extracts from *E. supina* Rafin.

다른 용매로 추출하여 그 성분이 차이가 있을 수 있기 때문에 미치는 영향이 다르게 나타난 것으로 보인다. 이렇게 상반된 결과에 영향을 미친 성분에 대해서는 추후연구를 통해 규명할 계획이다.

## 요 약

본 연구는 애기땅빈대(*Euphorbia supina* Rafin.) 열수(ESW) 및 에탄올 추출물(ESE)의 항염증 효과를 조사하기 위하여 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 생성되는 염증매개물질에 대한 억제효과를 조사하였다. ESW와 ESE은 조사된 모든 농도에서 95% 이상의 생존율을 보여 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. ESW의 경우, NO의 생성을 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 21.6%, 31.9%, 44.3%, 54.8% 억제하였고, $PGE_2$의 생성은 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 25.7%, 34%, 38.2% 억제하여 농도 의존적이고 유의적인 억제효과가 확인되었다. IL-6의 생성은 250, 1000 μg/mL 농도에서 각각 66.1%, 54.3% 억제하였다. IL-10, TNF-α의 생성은 500 μg/mL 농도에서 유의적인 증가를 나타냈다. ESE의 경우, NO의 생성을 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 38.3%, 66%, 74.7%, 77.5%, $PGE_2$의 생성은 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 40%, 51.8%, 92.4%, 94.7% 농도 의존적이고 유의적으로 억제하였다. IL-6의 생성은 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도에서 각각 43.9%, 48.9%, 69.7%, 89.4% 억제하였다. IL-10의 생성은 500 μg/mL 농도에서 44.1% 억제하였고, TNF-α의 생성은 1000 μg/mL 농도에서 92.4% 억제하였다. 결과를 종합해 볼 때, 애기땅빈대는 ESW보다는 ESE의 경우가 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증매개물질 억제효과가 좋은 것으로 나타났으며, ESE는 저농도보다는 500 μg/mL 이상의 고농도에서 NO, $PGE_2$, IL-6, IL-10, TNF-α와 같은 염증매개물질 억제효과가 좋은 것으로 확인되었다. 따라서 애기땅빈대 ESE는 500 μg/mL 농도 이상에서 염증매개물질 억제 보조제로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

1. Lee CB. 1989. *Coloured flora of Korea*. Hyangmunsa, Seoul, Korea. p 511.
2. Choi JG. 2004. *The medicine of grasses, flowers and trees*. Hanmunhwa, Seoul, Korea. p 193-201.
3. National China Medical Administration. 1999. *China medical herbs*. Shanghai science technology publisher, Shanghai, China. p 789-792.
4. Lee SH, Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. 1991. Tannins and related compounds. CV. Monomeric and dimeric hydrolyzable tannins having a dehydrohexahydroxydiphenoyl group, supinanin, euphorscopin, euphorhelin and jolkianin, from *Euphorbia* species. *Chem Pharm Bull* 39: 630-638.
5. Agata I, Hatano T, Nakaya Y, Sugaya T, Nishibe S, Yoshida T, Okuda T. 1991. Tannins and related polyphenols of Euphorbiaceous plants. Ⅷ. Eumaculin A and eusupinin A, and accompanying polyphenols from *Euphorbia maculata* L. and *E. supina* Rafin. *Chem Pharm Bull* 39: 881-883.
6. Fang Z, Zeng X, Zhang Y, Zhou G. 1993. Chemical constituents of spottedleaf euphorbia (*Euphorbia supina*). *Zhongcayao* 24: 230-233.
7. An RB, Kwon JW, Kwon TO, Chung WT, Lee HS, Kim YC. 2007. Chemical constituents from the whole plants of *Euphorbia supina* Rafin. *Kor J Pharmacogn* 38: 291-295.
8. Tanaka R, Matsunaga S. 1999. Terpenoids and steroids from several Euphorbiaceae and Pinaceae plants. *Yakugaku Zasshi* 119: 319-339.
9. Chung BS, Kim HG. 1985. Studies on the terpenoid constituents of *Euphorbia supina* Rafin. *Kor J Pharmacogn* 16: 155-159.
10. Tanaka R, Kurimoto M, Yoneda M, Matsunaga S. 1990. 17β,21β-Epoxyhopan-3β-ol and β-alnincanol from *Euphorbia supina*. *Phytochemistry* 29: 2253-2256.
11. Hong HK, Kwak JH, Kang SC, Lee JW, Park JH, Ahn JW, Kang HS, Choung ES, Zee OP. 2008. Antioxidative constituents from whole plants of *Euphorbia supina*. *Kor J Pharmacogn* 39: 260-264.
12. Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK, Lee KT. 2009. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of Curcuma heyneana is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF-κB pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 9: 1049-1057.
13. Yun HJ, Hoe SK. 2008. Anti-inflammatory effect of Injinhotang in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol* 23: 169-178.
14. Choi WY, Jo MJ, Kim SC, Jung JY. 2009. *Aucklandiae Radix* has inhibiory effects of pro-inflammatory mediator in LPS-induced RAW 264.7 cell. *Journal of Jeahan Oriental Medical Academy* 7: 1-12.
15. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. 2000. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* 10: 8-15
16. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis fac-

tor and L-arginine-dependent mechanism act as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1425-1431.
17. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 24-32.
18. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Hwangnyenhaedok-tang* in LPS-activated macrophage cells. *Kor J Herbol* 24: 39-47.
19. Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T, Huez G. 1996. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm* 46: 1-12
20. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 178: 749-754.
21. Choi YJ, Jo WS, Kim HJ, Nam BH, Kang EY, Oh SJ, Lee GA, Jeong MH. 2010. Anti-inflammatory effect of *Chlorella ellipsoidea* extracted from seawater by organic solvents. *Kor J Fish Aquat Sci* 43: 39-45.
22. Desai A, Vyas T, Amiji M. 2008. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci* 97: 2745-2756.
23. Kim PJ, Yun HJ, Heo SK, Kim KA, Kim DW, Kim JE, Park SD. 2009. Anti-inflammatory effect of *Bodusan*. *Kor J Herbol* 24: 49-56.
24. Jeoung YJ, Choi SY, An CS, Jeon YH, Park DK, Lim BO. 2009. Comparative effect on anti-inflammatory activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* grown in germinated brown rice extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Kor J Medicinal Crop Sci* 17: 97-101
25. Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707.
26. Sunyer T, Rothe L, Jiang X, Anderson F, Osdoby P, Collin-Osdoby P. 1997. $Ca^{2+}$ 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* 138: 2148-2162.
27. Weisz A, Cicatiello I, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginene. *Biochem J* 316: 209-215
28. Kim PJ, Yun HJ, Heo SK, Kim KA, Kim DW, Kim JE, Park SD. 2009. Anti-inflammatory effect of *Bodusan*. *Kor J Herbol* 24: 49-56.
29. Rocca B, FitzGerald GA. 2002. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol* 2: 603-630.
30. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. 2006. Prostagladin $E_2$ synthesis and secretion: the role of $PGE_2$ synthases. *Clin Immunol* 119: 229-240.
31. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. 2002. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB regulate *H. pylori*-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J* 366: 376-382.
32. Binetruy B, Smeal T, Kariu M. 1991. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphoylation of its activation domain. *Nature* 351: 122-127.
33. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne. 2008. *Kuby immunology.* 6th ed. The Korean Society for Microbiology, E Public, Seoul, Korea. p 600-623.
34. Yoon KR, Kim YJ, Lee E, Lee JM. 2009. Anti-inflammatory effect of *Coptidis Rhizoma*. *Kor J Herbol* 24: 79-86.

(2010년 12월 21일 접수; 2011년 1월 26일 채택)