

LPS로 유도한 대식세포의 염증반응에서 우슬의 항염증 효과

김민선¹, 정진수², 이해윤², 주영승², 배기상¹,
서상완³, 조일주⁴, 박성주¹, 송호준^{1*}

1 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 우석대학교 한의과대학 본초학교실,
3 : 충북테크노파크 바이오센터 전통의학지원팀 4 : 광주여자대학교 미용과학과

The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages

Min-Sun Kim¹, Jinsoo Jeong², Hye-Youn Lee², Young-Sung Ju², Gi-Sang Bae¹,
Sang-Wan Seo³, Il-Joo Cho⁴, Sung-Joo Park¹, Ho-Joon Song^{1*}

1 : Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2 : Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
3 : ChungBuk Techno Park Bio center,
4 : Dept. of Beauty science, Kwangju Woman's University

ABSTRACT

Objectives : *Achyranthes japonica* (AJ) has been used as an anti-bacterial and anti-inflammatory agent. However, it is unclear that AJ could show the anti-inflammatory effects in macrophages. In this experiment, we studied whether AJ could inhibit the inflammatory responses in macrophages.

Methods : To measure out the cytotoxicity of AJ, we performed the MTT assay. We evaluated the nitric oxide (NO) production, and cytokine production such as interleukin (IL)-1b, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)-a. We also investigated the cellular mechanisms such as mitogen activated protein kinases (MAPK)s and nuclear factor kappa B (NF-kB).

Results : AJ inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production, AJ also inhibited production levels of IL-1b, IL-6 and TNF-a in LPS-stimulated macrophage. Finally, western blot analysis showed that AJ treatment inhibited the activation of p38 but not of extracellular signal-regulated kinase, c-jun NH2-terminal kinase and NF-kB.

Conclusions : These results showed that AJ down-regulated the inflammatory response via p38 in macrophages, which suggest that AJ could be a candidate on treating inflammatory diseases.

Key words : *Achyranthes japonica* (AJ), cytokine, inflammation

서 론

염증은 감염이나 상처에 대하여 후천적인 방어기전으로 작용 할 뿐 아니라, 많은 병리 생리학적인 조건에서 중요한 역할을 한다. 염증이 진행되는 동안 대식세포는 활성화 되어 다양한 감염원에 대항하는 반응을 하는데 주로 종양괴사인자, 인터루킨, 뉴코트리엔 등과 같은 염증 매개물질들을 생산한다. 그러나 이러한 세포활성물질들과 전 염증성 매개물질들이

과도하게 생산되면 죽상동맥경화증, 류마티스 관절염, 기관지 천식, 폐섬유증, 패혈증등과 같은 많은 염증 질환들이 나타난다. 따라서 염증반응의 억제는 염증질환을 치료하는데 있어서 중요한 목표가 된다.

토우슬(土牛膝 : *Achyranthes Radix*)은 莧科(비름과 ; Amaranthaceae)에 속한 多年生 草本인 쇠무릎(*Achyranthes japonica*)의 뿌리로 性味는 平하고 苦酸하여 肝, 腎經에 들어간다. 국내에서는 쇠무릎이라고도 칭하며 生用하면 散瘀血,

*교신저자 : 송호준. 원광대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 063-850-6844. · E-mail : songhj@wku.ac.kr.
· 접수 : 2011년 5월 10일 · 수정 : 2011년 6월 7일 · 채택 : 2011년 6월 10일

消腫하고 熟用하면 補肝腎, 强筋骨한다. 중국에서는 懷牛膝 (*Achyranthis Bidentatae*)과 川牛膝(*Cyathula officinalis*) 및 麻牛膝(*Cyathula capitata*)로 분류해 놓았으며, 活血祛瘀하여 關節을 通利시키는 데는 川牛膝을 生用하여 치료하는 것이 좋고 肝,腎을 補益하고 筋骨을 强壯시키는 데는 懷牛膝을 炒用하는 것이 좋다. 이 외에 麻牛膝은 肝,腎經으로 들어가 祛風, 利濕, 活血, 通經 시키는 효능이 있어 風濕으로 인한 질병과 婦女들의 經閉, 癥瘕를 치료한다¹⁻³⁾. 우슬에 대한 실험적 보고로는 우슬 물추출물 약침의 LPS 유도 염증성 관절염 생쥐에서의 세포성 면역반응 억제효과^{4,5)}, 독성자유기 소거에 의한 산화억제효과⁶⁾, 항균효과⁷⁾, Carrageenan으로 유발한 관절염 흰쥐에서의 항염증효과⁸⁾, 파골세포 분화와 골흡수 억제효과^{9,10)}, 혈행개선효과¹¹⁾, 진통, 소염 항암효과 및 골 형성 촉진효과가 보고되었¹²⁻¹⁴⁾. 이와 같이 우슬에 대하여 다양한 선행연구가 보고되었으나 LPS로 유도한 생쥐 대식세포에서 항염증반응과 그 기전에 대한 연구는 진행되지 않았다.

이에 저자는 토우슬의 항염증작용 및 기전을 실험적으로 증명하고자 토우슬의 물 추출물을 제조하여 LPS로 유도한 대식세포에서 NO, 전염증성 사이토카인의 발현을 실험하였고 이러한 현상의 기전을 조사하기 위해 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family인 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun-NH₂-terminal kinase (JNK), p38 와 nuclear factor - kappa B (NF-κB)를 조사하여 유의성 있는 결과를 도출하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 토우슬 (*Achyranthes japonica*, AJ)은 옴니허브 (대구, 대한민국)에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 확인을 받은 후 사용하였다. AJ 100 g 을 증류수 1 L에 넣어 2시간 30분 동안 전탕 후에 물 추출물을 영하 80 °C에서 보관하였다. AJ 물 추출물은 영하 80 °C에서 동결건조 하여 추후 실험에 사용하였다. 동결 건조한 최종 AJ 물 추출물 가루는 24.3 g이었다.

2) 시약

RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Escherichiacoli 055 : B5 기원인 LPS는 Sigma-AldrichChemical (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 anti-inducible NO synthase (iNOS), anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK, anti-phospho-p38는 Cell signaling사에서 구입하였다. anti-inhibitory kappa B alpha (Ik-Ba) 항체 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA, USA)에서 구입하였다. Pre-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 표지자들은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. TRIzol reagent 및 중합효소반응 키트들은 Invitrogen Corporation (Carlsbad,

CA, USA)에서 구입하였다. iNOS, tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, IL-6 와 β-actin primer 등은 Genotech (Daejeon, RepublicofKorea)에서 제작하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 복강 대식 세포의 배양

Mouse에 thio-glycollate 3 ml을 복강 투여하고, 4일 후 마우스를 sacrifice하였다. RPMI1640+10%FBS+1% antibiotics 7~8 ml을 복강에 투여하여 넣고 복강액을 뽑아내 원심분리한 후 cell을 counting해서 Dish 혹은 Plate에 깔고 5% CO₂, 37°C가 유지되는 incubator에서 3시간 배양하고, suspension세포를 버린 후에 부착한 세포를 대식세포로 간주하여 실험하였다.

2) MTT 분석

대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 하는 방법을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하자면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2 x 10⁵/well의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AJ를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

3) 일산화질소(Nitric Oxide) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent : 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치한다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2 x 10⁵/well의 밀도로 현탁 하였고, 여러 가지 농도로 AJ를 처리하였다. 1시간 동안 AJ를 전처리한 뒤, LPS를 첨가하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 상층액을 따서 96-well plate에 loading한 후 100 μl의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물을 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 분광광도계 (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

4) Enzyme linked-immunosorbant assay (ELISA)

6 well에 대식세포를 1 × 10⁶cells/well로 현탁하고, 다양한 농도의 AJ를 (0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) 전처리 하고 1시간 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 24시간 배양하였다. 세포 상층액을 수집하여 TNF-α, IL-1β, IL-6를 ELISA 방법으로 정량하였다. IL-1β, IL-6 와 TNF-α를 탐색하는 ELISA 키트는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

5) mRNA 발현측정

(1) RNA추출

Total RNA는 TRIzol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 토우슬을 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24 시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 TRIzol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 두 세 번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량 했다.

(2) 중합효소 반응

TRIzol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을 넣고 70 °C 에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase을 첨가하고 42 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1x PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92 °C에서 30초, 58 °C에서 45초, 그 후에 72 °C에서 30초를 30cycle 반복하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

iNOS : 5'-AGCCCAACAATACAAATGACCCTA-3' (forward)
 5'-TTC CTG TTG TTT CTA TTT CCT TTGT-3' (reverse)
 β -actin : 5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3' (forward)
 5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3' (reverse)

PCR반응이 끝난 후 1X 샘플링 buffer를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10 μ l씩을 넣고 전기영동 한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

(3) 정량적 중합효소반응

mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 ml, Real time PCR master mix 4 ml (Roche), primer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응 시켰다. PCR 조건은 92 °C에서 30초, 60 °C에서 45초, 그 후에 72 °C에서 30초를 40cycle로 하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 Forward (f)와 reverse (r) primer 및 TaqMan probe는 Roche (Basel, Switzerland)에서 합성하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

TNF- α : 5'-TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3' (forward)
 5'-ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3' (reverse)
 5'-CCC GAC TAC GTG CTC CTC ACC CA-3' (probe)
 IL-1 β : 5'-TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3' (forward)
 5'-GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3' (reverse)
 universal probe, M15131,1V (probe)
 IL-6 : 5'-TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3' (forward)
 5'-GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3' (reverse)
 universal probe, M20572,1V (probe)

6) 단백질 발현 검사

복강에서 추출한 마우스 대식세포를 60 mm culture dish에 5×10^6 cells로 배양하고 serum free media (RPMI 1640)으로 starvation overnight 시킨 후 토우슬 (0.5 mg/ml)으로 전처리 하고 60분 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간 별로 (0, 15, 30, 60 min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5,000 rpm, 5 min) 하여 그 상층 액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer (lysis buffer 1ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + proteaseinhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량 하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4x)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 동안 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 인산화와 Ik-Ba, iNOS를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

7)통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D. 로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램의 one way ANOVA, Duncan method에 준하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 우슬의 대식세포에 대한 세포 독성

어떤 화합물이나 혹은 식물에서 추출한 물질의 생명 활동을 조사하기 위한 전제조건으로서 세포 대사에 영향을 주지 않는지를 조사해보아야 한다. AJ 추출물이 세포 생존율에 영향을 주는지를 검사하기 위해서 복강 대식 세포에 AJ를 처리하고 세포 MTT 방법으로 생존율을 측정하였다. 세포 MTT 반응에서 80% 이상의 생존율을 보인 경우 세포독성이 없는 것으로 판단한다. AJ는 0.05-1 mg/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 보였으나, 80%이상의 생존율을 보이며 세포 독성에 큰 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

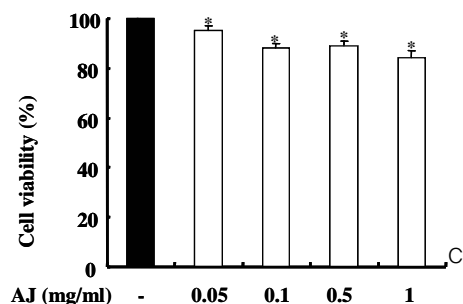


Fig. 1. Effects of AJ on cell viability. macrophage were incubated with or without AJ as indicated dose for 24 h. The cell viability was measured by MTT assay. The detail method are described in Material and Method section. The values are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs saline.

2. LPS로 유도한 iNOS 발현과 NO 생성에 있어서 우슬의 억제 효과

iNOS에 의한 NO의 과도한 생성은 염증반응의 특징이다. 따라서 LPS로 유도한 iNOS 발현과 NO생산에 있어서 AJ 추출물의 효과를 검사하였다. 대식세포에 AJ를 다양한 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 각각에 LPS (500 ng/ml)를 처리하였다. AJ를 전 처리한 군에서는 LPS로 유도한 iNOS를 mRNA와 단백질수준에서 농도 의존적으로 억제하였다 (Fig. 2). 또한 Griess 반응을 통한 세포 상층액의 NO 생성량의 발현에 있어서도, Fig 2에서 보는 바와 같이 iNOS 측정 결과들과 일치하게 LPS로 유도한 NO 생성을 AJ는 농도 의존적으로 억제하였다.

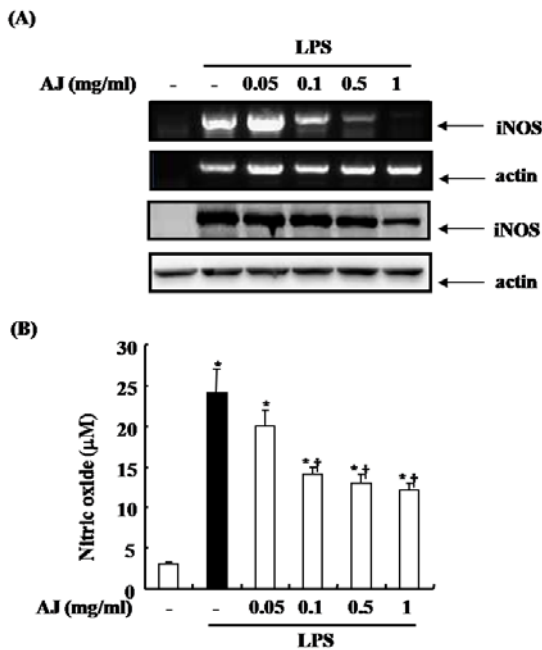


Fig. 2. Effects of AJ on LPS-induced iNOS protein and mRNA expression and NO production. Cells were pretreated with AJ as indicated dose for 1 h, then stimulated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. (A) Upper two panel indicated the protein levels of iNOS and beta-actin, lower two panel indicated the mRNA expression of iNOS and beta-actin. Beta-actin was used as loading control. (B) The supernatants were used to measure the nitric oxide production by griess assay. The values are means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs saline. + $P < 0.05$ vs LPS.

3. LPS로 유도한 TNF- α , IL-1b 및 IL-6 생성에 있어서 우슬의 억제 효과

LPS로 자극하면 전 염증성 세포활성물질이 분비되고 염증반응이 일어난다. LPS로 유도한 TNF- α , IL-1b 및 IL-6 생성에 있어서 우슬의 억제 효과를 검증하기 위해 ELISA를 이용하여 측정하였다. AJ 추출물은 LPS로 유도한 TNF- α , IL-1b 및 IL-6 생성과 mRNA 발현을 억제하였다. (Fig. 3).

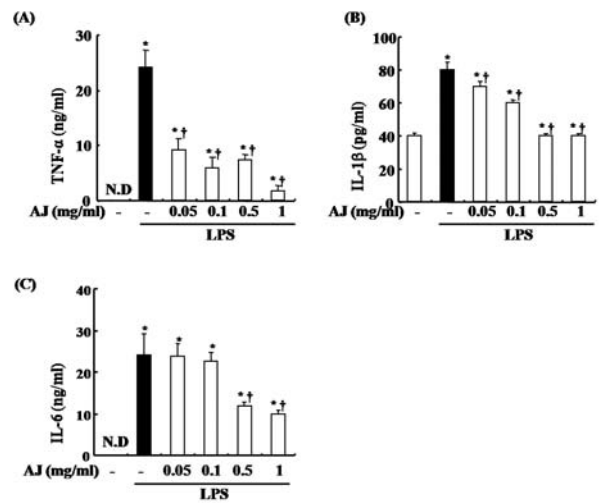


Fig. 3. The effects of AJ on LPS-induced cytokine production. Macrophage were treated with AJ as indicated dose, then stimulated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. The supernatants were harvested, then (A)TNF- α , (B)IL-1 β and (C)IL-6 protein levels were measured by ELISA as described in Material and Method. The values are means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs saline. + $P < 0.05$ vs LPS. N.D (not detectable)

4. mRNA 수준에서 우슬 추출물이 TNF- α , IL-1b 및 IL-6 활성에 미치는 영향

AJ 물 추출물이 대식세포에서 염증성 cytokine을 단백질 수준에서 억제하였음에 착안하여 (Fig.3), mRNA 수준에서도 염증성 cytokine의 활성을 억제하는지 알아보기 위해 AJ를 다양한 농도(0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml)로 전처리한 후 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 TNF- α , IL-1b 및 IL-6의 mRNA를 정량적 증합 효소 반응 방법으로 측정된 결과, mRNA 수준의 TNF- α , IL-1b 및 IL-6의 발현이 현저히 억제되었다 (Fig. 4).

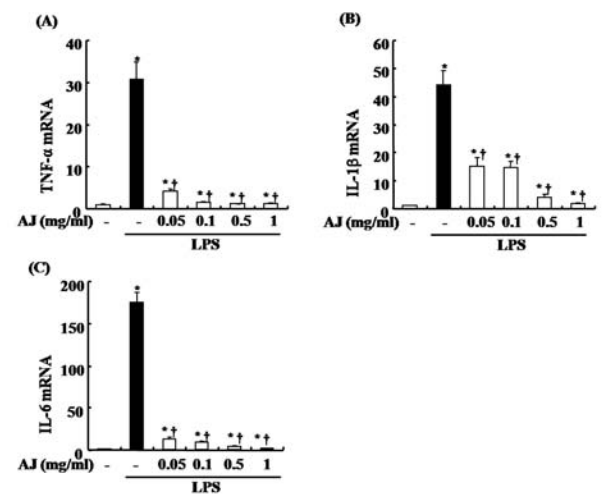


Fig. 4. The effects of AJ on LPS-induced cytokine production. Macrophage were treated with AJ as indicated dose, then stimulated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods. The values are means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs saline. + $P < 0.05$ vs LPS.

4. 우슬 추출물이 MAPKs 및 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향

AJ의 염증 매개물질 생성 억제 기전을 탐색하기 위해서 MAPKs와 NF- κ B의 경로를 조사했다. MAPKs와 NF- κ B는 전염증성 매개물질들을 유도하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다¹⁷⁾. 대식세포에 한 시간 동안 우슬을 전처리한 후 LPS로 염증 반응을 일으키고 Western blot으로 농도별 반응을 지켜보았다. 이를 분석한 결과 AJ 추출물은 LPS로 활성화된 대식세포에서 MAPKs중 p38의 인산화를 억제하였고, ERK1/2 및 JNK의 인산화는 억제하지 못하였다. 또한 NF- κ B의 활성화 지표인 I κ -Ba의 분해도 억제하지 못했다 (Fig. 5).

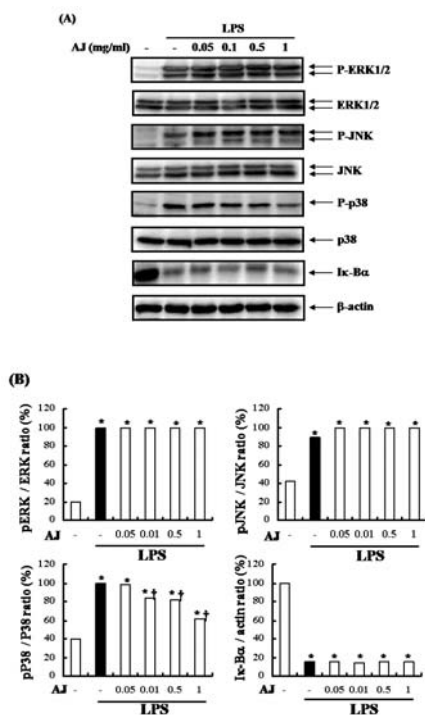


Fig. 5. Effects of AJ on MAPKs activation and I κ -Ba degradation, (A) Peritoneal macrophages (5×10^6 /dish) were treated with AJ as indicated dose for 1h, then stimulated with LPS (500 ng/ml) for 15 min and detected with phosphospecific ERK 1/2, JNK p38 and I κ -Ba antibody, as described in Material and Method. Pan-ERK 1/2, JNK, p38 was used as loading control. (B) The density of western blot data. The values are means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs saline. + $P < 0.05$ vs LPS.

고찰 및 결론

대식세포를 LPS로 자극하면 TNF- α , IL-1 β , IL-6등과 같은 사이토카인 및 일산화질소의 발현을 증가시킨다. LPS가 혈액에 있을 경우 즉각적으로 LPS binding protein (LBP)과 결합하고 다시 CD14복합체를 형성하는데 이렇게 형성된 LPS/ LBP/ CD14 복합체가 세포표면에 작용하여 MAPK의 활성화를 일으킨다¹⁵⁻¹⁷⁾.

Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다¹⁸⁾. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포매개성 면역반응에

관여하는데, 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 iNOS가 발현되어 NO를 생성하게 된다¹⁹⁻²²⁾. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하고 또한 활성화된 대식세포는 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하게 된다^{23,24)}. 염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, TNF- α 및 IL-6와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다^{25,26)}.

토우슬(土牛膝: *Achyranthes japonica*)은 비름과에 속한 다년생초본인 쇠무릎의 뿌리로 맛은 달고 쓰며 성질은 추하고 肝,腎經에 들어가서 어혈을 없애고 부스럼을 없애는 효능이 있다. 병증으로는 淋病, 血尿, 癥瘕, 難産, 산후의 瘀血에 의한 浮腫 및 疼痛, 喉痺, 癰腫, 打撲傷들을 치료한다¹⁻³⁾. 이러한 효과들로 미루어 볼 때 토우슬이 염증성 면역반응에도 유효할 것으로 사료되어 본 실험의 약물로 선택하였다. 이미 회우슬의 효능에 대한 논문으로 진통, 소염, 항암효과 및 골 형성 촉진효과가 보고되었다¹²⁻¹⁴⁾. 우슬에 관한 분류와 연구는 약리학적, 문헌적으로 많이 진행되었지만 토우슬이 어떠한 기전으로 대식세포에서 항염증 효과를 나타내는지에 관해서는 아직 밝혀진 바가 거의 없다. 이 연구를 통해서 토우슬은 대식세포에서 p38을 통해 일산화질소 및 전염증성 사이토카인 생성을 감소시켜 염증반응을 억제한다는 것을 보여주었다.

Fig. 2에서 토우슬을 LPS로 활성화된 대식세포에 전처리한 결과 NO의 합성 과정 및 NO의 발생을 억제하는 것으로 나타난다. NO는 NO synthase의 L-아르기닌으로부터 NO를 생산한다²⁷⁾. iNOS는 마이크로몰 수준의 NO를 생성하고 iNOS는 다양한 염증 질환들을 포함하는 병리학적 상태에 관여하는데 이상의 결과들은 토우슬이 iNOS발현을 억제함으로써 NO생성을 억제한다는 것을 설명한다 (Fig. 2). 또 토우슬이 LPS로 자극한 염증성 세포활성물질 생산을 억제하는지 조사하였다. LPS로 대식세포를 자극하였을 때 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생산이 유도되었고, 토우슬은 이를 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 3 및 4).

MAPKs는 3가지로 구성되어 있으며, ERK, JNK, P38로 정의된다²⁸⁾. MAPKs의 신호경로들은 LPS로 유도되어 활성화된 대식세포에서의 iNOS 및 전염증성 세포활성물질 발현에 관여한다²⁹⁾. MAPKs는 주로 인산화 되지 않은 불활성 상태에서는 세포질에 머물다가 인산화에 의하여 활성화되면 핵으로 이동하면서 cytokine 생성에 관여한다³⁰⁾. 본 연구에서 토우슬은 LPS로 유도된 의 활성화는 억제하였으나 ERK 1/2, JNK의 활성을 억제하지 못하였다. 따라서 토우슬은 p38의 활성을 억제하여 대식세포에서 항염증작용을 한다고 생각된다.

NF- κ B는 전사인자 (transcriptional factor)로서, 염증반응과 면역 반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하여 종양형성, 자가 면역 질환, 염증 질환에 중요한 역할을 담당한다^{31,32)}. NF- κ B는 세포질 내에서 억제분자 I κ -Ba와 결합된 불활성형으로 존재하며 I κ -Ba가 인산화 (phosphorylation)되고 NF- κ B와 분해 (degradation)되면서 분리된 NF- κ B가 핵 안으로 이동하여 NO 및 전염증성 cytokine의 생성을 유도한다^{33,34)}. Fig 5.에서 나타난 것 처럼, LPS를 통해 염증반응이 일어나면 I κ -Ba의 분해가 시작된다. 거꾸로 생각하면 I κ -Ba의 분해를 막으면 NF- κ B의 활성화도 억제된다고 볼 수

있다. 하지만 본 연구에서는 토우슬 추출물이 LPS로 유도된 Ik-Ba 분해를 억제하지 못했다. 이는 토우슬의 항염증효과가 전사인자인 NF-kB를 통하지 않는다는 것을 나타낸다 (Fig.5). 결과적으로 토우슬 물 추출물의 항염 효과는 NF-kB가 아닌 MAPK p38의 직접적인 영향으로 생각할 수 있다. 이전의 보고에서도 말하길, MAPKs와 NF-kB는 서로 다르게 사이토카인의 분비를 촉진할 수도 있다는 보고도 있다. 특히 p38은 NF-kB와 독립적으로 사이토카인을 조절할 수 있음이 알려져 있다^{35,36}. 또한 p38 억제제인 SB239063을 이용하여 사이토카인의 발현을 억제한 논문이 다수 발표되어 있으며^{37,38}, p38 억제를 통한 사이토카인의 발현을 억제하는 기전이 토우슬의 주요한 기전이라고 결론지을 수 있다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 토우슬은 MAPKs중에 p38의 억제를 통하여 NO와 전염증성 cytokine (TNF-a, IL-1 β , IL-6)의 생산을 억제한다. 토우슬의 이와 같은 작용은 LPS 및 박테리아 감염으로 유발되어지는 패혈증과 같은 염증 질환에 효과적일 것 이라고 생각된다. 앞으로 토우슬의 항염증 작용에 대한 in vivo 실험들도 함께 이루어져야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2010년 원광대학교 교비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Kang BS et al. Herbal medicine, 6th revised edition, seoul : yonglin publisher, 2000 : 427-428.
- Shin MK. Clinical Traditional Herbalogy. seoul : yonglin publisher, 2010 : 539-543.
- Chinese Treditional medicine management agency 《chinese herbal medicine》 commission, 1th edition vol 2. shanghai : shanghai technology publisher, 1999 : 830-837.
- Lee SD, Kim KS. The effect of Achyranthis Radix and Apitoxin Aqua- acupuncture on cellular immune responses to LPS-induced arthritis in mice. J Kor Acupuncture & Moxibustion Society. 1999 ; 16(3) : 287-315.
- Do WS, Kim KH, Kim KS. Effect of aqua-acupuncture(Cortex Ulmi Pumilae, Ramulus Cinnamomum, Radix achyranthis, Apitoxin · Calculus Bovis · Fel Ursi · Moschus compound) in mice with lipopolysaccharide induced arthritis. J Kor Acupuncture & Moxibustion Society. 2001 ; 18(1) : 157-169.
- Li XP. Experimental study on anti-senility of the 4 famous Chinese herbs produced in Huaiqing area. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1991 ; 11(8) : 486-7.
- Jung SM, Choi SI, Park SM, Heo TR. Antimicrobial effect of *Achyranthes japonica* Nakai extracts against *Clostridium difficile*. Kor J Food Sci Technol. 2007 ; 39(5) : 564-8.
- Kim YO, Lee SW, Lee SE. Effects of Achyrantes japonica on carrageenan -induced arthritis rat model. Kor J Medicinal Crop. 2009 ; 17(6) : 470-4.
- Kim JH, Ki JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory effects of Achyranthis Bidentatae Radix on osteoclast differencitation and bine resorption. Kor J Herbology. 2010 ; 25(1) : 65-74.
- Hu SM, Zhou P, Fu Q, Yang JJ, Gao XM. Effect of a Chinese herbal prescription on collagen I in rat's femur under simulated weightlessness. Zhongguo Gu Shang. 2010 ; 23(2) : 117-9.
- Xie F, Li X, Sun K, Chu Y, Cao H, Chen N, Wang W, Liu M, Liu W, Mao D. An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage. J Tradit Chin Med. 2001 ; 21(3) : 225-31.
- Lu T, Mao C, Zhang L, Xu W. The research on analgesic and anti-inflammatory action of different processed products of Achyrantes bidentata. Ahong Yao Cai. 1997 ; 20(10) : 507-9.
- Chen XM, Tian GY. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from Cyathula officinalis Kuan Carbohydr Res.2003 ; 338(11) : 1235-41.
- Gao XY, Wang DW, Li FM. Determination of ecdysterone in Achyrantes Bidentata Bl and its activity promoting proliferation of osteoblast-like cells. Yao Xue Xue Bao.2000 ; 35(11) : 868-70.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P,Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signal activation of adaptive immunity. Nature. 1997 ; 888(6640) : 394-7.
- Aderem A Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature. 2000 ; 406(6797) : 782-7.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor4(TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : evidence for TLR4 as the Lps gene product. J immunol. 1999 ; 162(7) : 3749-52.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases : roles, tolls and controls. Cell 1994 ; 78 : 915-8.
- Kwqamata H, Ochiai H, Mantani N, terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxidied RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 2000 ; 28 : 217-26.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han

- JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*, 2000 ; 406 : 301-9.
21. 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 RAW264.7 macrophages stimulated with interferon and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol*, 2000 ; 35 : 21-8.
 22. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW264.7 macrophages. *Life Sci*, 2001 ; 69 : 625-35.
 23. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances gene expression in RAW264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol*, 2001 ; 76 : 119-23.
 24. Horwood HJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D, Foxwell BM. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6 production. *L Immunol*, 2006 ; 176(6) : 3635-41.
 25. Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I and Yoshikawa M. Structural requirements of Flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic Med. Chem*, 2003 ; 11 : 1995-2000.
 26. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*, 2004 ; 70(2) : 93-103.
 27. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis*, 1999 ; 179 : 939-44.
 28. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*, 2000 ; 25 : 7-9.
 29. Celec P. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine the next generation. *Biomed Pharmacother*, 2004 ; 58 : 365-71.
 30. Oh CH translation. simple immunology. seoul medical korea, 2006 : 161-200.
 31. Lawrence T, et al. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med*, 2001 : 1291-7.
 32. Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett*, 1999 ; 442(1) : 89-94.
 33. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1994 : 141-9.
 34. Zandi E, et al. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 1997 ; 91(2) : 243-52.
 35. Sigala I, Zacharatos P, Toumpanakis D, Michailidou T, Noussia O, Theocharis S, Roussos C, Papapetropoulos A, Vassilakopoulos T. MAPKs and NF-kappaB differentially regulate cytokine expression in the diaphragm in response to resistive breathing: the role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011 ; 300(5) : R1152-62.
 36. Chang JH, Park JY, Kim SK. Dependence on p38 MAPK signalling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells. *Immunology*, 2006 ; 118(2) : 164-70.
 37. Underwood DC, Osborn RR, Kotzer CJ, Adams JL, Lee JC, Webb EF, Carpenter DC, Bochnowicz S, Thomas HC, Hay DW, Griswold DE. SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000 ; 293(1) : 281-8.
 38. Smith SJ, Fenwick PS, Nicholson AG, Kirschenbaum F, Finney-Hayward TK, Higgins LS, Giembycz MA, Barnes PJ, Donnelly LE. Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *Br J Pharmacol*, 2006 ; 149(4) : 393-404.