

黃芩이 LPS로 유발된 Raw 264.7 Cells의 염증인자에 미치는 영향

윤석빈, 한효상, 이영종*

경원대학교 한의과대학 본초학교실

Effect of Scutellariae Radix Extract on the Proinflammatory Mediators in Raw 264.7 Cells Induced by LPS

Seok-Bin Yoon, Hyo-Sang Han, Young-Jong Lee*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study aims at examining the anti-inflammatory effects of Scutellariae Radix extract.

Methods : Scutellariae Radix was hot water extracted to make the samples(SR) for the experiment. Their effects were examined on the increase of cell viability in mouse macrophage Raw 264.7 cells, the creation of nitric oxide(NO) in lipopolysaccharide(LPS)-induced Raw 264.7 cells, and the creation of cytokines of interleukin(IL)-1 β and others.

Results : The results of the experiment are as follows.

1. The MTT assay was carried out to check the cellular toxicity of the water extract of Scutellariae Radix. The results were found no significant toxicity caused to macrophages by the water extract of Scutellariae Radix.
2. The water extract of Scutellariae Radix significantly restricted the increase of NO in the LPS-induced macrophages after 24-hour culture.
3. The water extract of Scutellariae Radix significantly restricted the creation of IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, interferon-inducible protein(IP)-10, keratinocyte-derived chemokine(KC), and vascular endothelial growth factor(VEGF) in the LPS-induced macrophages at the concentration of 25 μ g/mL or higher.

Conclusion : The samples(SR) of hot water extract of Scutellariae Radix caused no significant cellular toxicity to macrophages and significantly restricted the creation of NO, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IP-10, KC, and VEGF in the LPS-induced macrophages at 25 μ g/mL or higher, thus demonstrating significant anti-inflammatory effects.

Key words : Scutellariae Radix, macrophage, cytokine, nitric oxide.

서론

黃芩은 『神農本草經』¹⁾ 中品에 “黃芩, 味苦平. 主諸熱, 黃疸, 腸澼, 泄利, 逐水, 下血閉, 惡瘡疽蝕, 火瘍, 一名腐腸, 生川谷.” 이라고 처음 收載되었으며, 淸熱瀉火, 燥濕解毒, 止血, 安胎의 효능이 있어 肺熱咳嗽, 熱病高熱神昏, 肝火頭痛, 目赤腫痛, 濕熱黃疸, 瀉痢, 熱淋, 吐衄, 崩漏, 胎熱不安, 癰腫疔瘡 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다²⁾.

黃芩의 기원으로 『대한약전』³⁾에 “속썩은풀 *Scutellaria*

baicalensis Georgi(꿀풀과 Labiatae)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것이다.” 라고 수재되어 있으며, 『중국약전』⁴⁾, 『북한약전』⁵⁾, 『일본약국방』⁶⁾도 모두 같은 식물을 기원으로 하고 있다.

黃芩의 성분으로는 flavonoid계 화합물로서 30여 종이 분리되어 있는데, baicalein, biacalin, chrysin, oroxylin-A, oroxylin- α -7-O-glucuronide, wogomin, wogonoside, wogonin glucuronide, neo-baicalein, koganebananin, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, skullcapflavone, dihydrobaicalin

*교신저자 : 이영종. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 031-750-5415, · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr.
· 접수 : 2011년 5월 11일 · 수정 : 2011년 6월 8일 · 채택 : 2011년 6월 10일

등이 있으며^{7,8)} sterol 류로는 β -sitosterol, campesterol, stigmasterol 등이 함유되어 있다⁹⁾. 또한 당류로서 sucrose 및 D-glucose 등이 함유되어 있고⁹⁾, 그 외 14종의 아미노산, 정유 등이 있다⁷⁾.

약리작용으로 김 등⁹⁾은 황금의 열수 추출물이 병원성 세균에 미치는 항균효과를 보고 하였고, 이 등¹⁰⁾은 염증성 장 질환에서 면역 조절 기능을 보고 하였으며, 이 등¹¹⁾은 항암효과를 보고 하였고, 조 등¹²⁾은 항산화효과를 보고 하였고, 김 등¹³⁾은 혈중 지질강하작용을 보고 하였으며, 박 등¹⁴⁾은 항 알레르기 천식작용을 보고 하였고, 이 등¹⁵⁾은 간 보호 기능을 보고 하였다.

이러한 연구보고는 황芩의 효능인 淸熱瀉火, 燥濕解毒²⁾이 염증 및 면역과 밀접한 관련이 되어 있음을 알 수 있으며, 특히 최근에는 면역 매개물질인 cytokine의 염증 및 면역반응 조절기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 대식세포에서 분비되는 염증매개인자들(proinflammatory mediators)에 대한 황芩의 항염효과를 충분히 검토할 필요가 있다고 사료된다.

이에 저자는 본 연구에서 황芩을 열수 추출하여 제조한 시료(SR=Scutellariae Radix)를 대상으로 mouse macrophage Raw 264.7 cells의 cell viability와 lipopolysaccharide(LPS)로 유발된 Raw 264.7 cells의 nitric oxide(NO) 생성증가, 그리고 interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-17, keratinocyte-derived chemokine(KC) 등의 cytokine 생성증가에 미치는 영향을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 황芩(Scutellariae Radix; Root of *Scutellaria baicalensis* Georgi)은 전남 화순에서 재배한 것을 2008년 5월에 구입하였으며, 경원대학교 한의과대학 본초학교실에서 기원을 감정하였다(NO; 2008-05-0021). 모든 약재는 실험 전에 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 mouse macrophage(Raw 264.7 cells)이며 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 ethyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), DMSO(Sigma, USA), DMEM(Sigma, USA), 1×PBS(Sigma, USA), EDTA(Sigma, USA), isopropanol(Sigma, USA), trypsin-EDTA(Sigma, USA), Bio-Plex cytokine assay kit(Bio-Rad, USA), Procarta cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용 되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator(Nuaire, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), air compressor(Tamiya, Japan), homogenizer(Omni, USA), research microscope(Becton dickinson, USA), refrigerated centrifuge(Hanil, Korea), high-speed microcentrifuge(Zyrogm, Korea), personal microcentrifuge(Mylab, Korea), fume hood(Hanil, Korea), clean bench(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner(Branson, USA), microplate reader 680(Bio-Rad, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), multi-channel pipette(Bio-Rad, USA), water bath(Saehan Co, Korea), ice-maker(Vision Scientific Co, Korea), bio-plex 200(Bio-Rad, USA), vacuum filtration system(Millipore, USA), micromixer Mx2(FINEPCR, Korea), thermo micromixer(FINEPCR, Korea), thermo bath(FINEPCR, Korea), liquid nitrogen tank(CHART/MVE, USA), deep freezer(Ilshin Lab Co, Korea), vacuum freezing drier(Eyela, Japan) 등이다.

2. 방법

1) 황芩 추출물 제조

황芩 50 g을 정확하게 중량을 측정 한 뒤 환류추출기에 1차 증류수 2,000 mL와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper(Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 16.2 g을 얻었으며, 수율은 32.4%였다.

2) 세포 배양

Raw 264.7 cells은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3 일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 mL culture flask)에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) 세포독성 검사(cytotoxicity assay)

준비된 시료가 Raw 264.7 cells에 나타내는 세포독성 유발 효과를 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay¹⁶⁻¹⁷⁾를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 μ l씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate

buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 SR(25, 50, 100, 200 µg/mL)을 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT(Sigma, USA)를 100 µl씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 후 2 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µl 처리하고 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability(\%)} = \text{AT} / \text{AC} \times 100$$

AC : absorbance of control

AT : absorbance of tested extract solution,

4) Nitric oxide 생성측정

Weissman 등¹⁸⁾의 방법을 참조하여 다음과 같이 실험하였다. LPS를 단독처리(1 µg/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200 µg/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24, 48 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 µl을 채취하여 여기에 그리스 시약 100 µl을 혼합하여 15 분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 nitric oxide 생성은 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{Productions of Nitric oxide(\%)} = \text{AT} / \text{AC} \times 100$$

AC : absorbance of control

AT : absorbance of tested extract solution,

5) Cytokine 생성측정

면역단백질 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Politch 등¹⁹⁻²⁰⁾을 참조하여 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리(1 µg/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200 µg/mL)와 함께 배지에 담아 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액(cell culture supernatant)을 채취하여 filter plate(96 well type)에 미리 준비되어 있던 antibody-conjugated capture beads와 결합시켰다. 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150 uL의 wash buffer로 세척하고, 세척이 끝난 뒤 각 well에 detection antibody를 추가한 후 30 분간 배양하였으며, 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 streptavidin-PE를 분주하고 상온에서 30 0~500 rpm의 조건으로 30 분간 진동배양(shaking)하였다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 120 uL의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5 분간 진동배양(shaking)한 후 Bio-Plex array reader(Bio-Plex 200)을 이용, 측정교자 하는 cytokine의 양을 조사비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 ± 표준오차 (mean ± SEM)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 분석하여 p-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

성적

1. 세포 생존율

SR이 대식세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 감소는 없었다(Fig. 1).

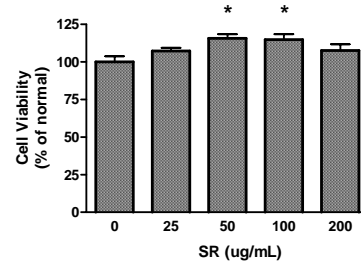


Fig. 1. Effect of SR on cell viability in Raw 264.7 cells for 24 hrs. incubation, SR : Water extract of Scutellariae Radix, Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. * represents P < 0.05 compared to the normal.

2. NO 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 2).

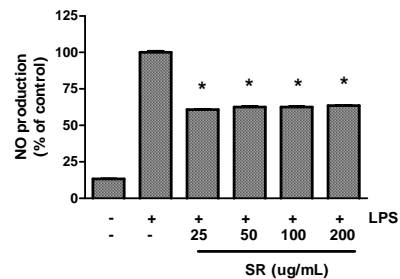


Fig. 2. Effect of SR on NO production in Raw 264.7 cells for 24 hrs. incubation with LPS, SR : Water extract of Scutellariae Radix, Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. Control : Treated with LPS (1 µg/mL) only. * represents P < 0.05 compared to the control.

3. IL-6 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 3).

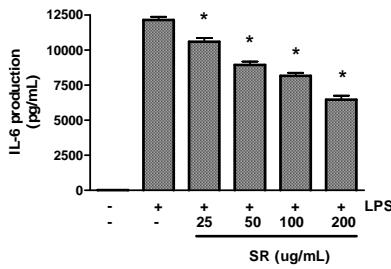


Fig. 3. Effect of SR on IL-6 production in Raw 264.7 cells treated with LPS. SR : Water extract of Scutellariae Radix. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

4. IL-10 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-10 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-10 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 4).

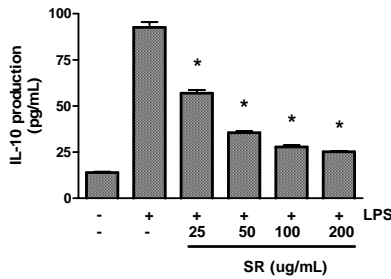


Fig. 4. Effect of SR on IL-10 production in Raw 264.7 cells treated with LPS. SR : Water extract of Scutellariae Radix. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

5. IL-12p40 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-12p40 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-12p40 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 5).

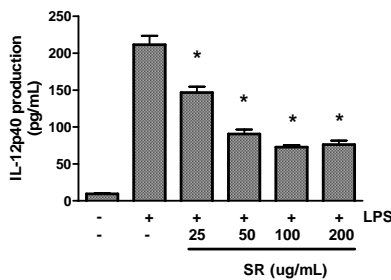


Fig. 5. Effect of SR on IL-12p40 production in Raw 264.7 cells treated with LPS. SR : Water extract of Scutellariae Radix. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

6. IL-17 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-17 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-17 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 6).

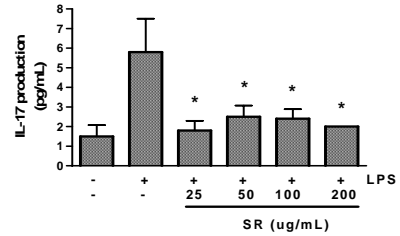


Fig. 6. Effect of SR on IL-17 production in Raw 264.7 cells treated with LPS. SR : Water extract of Scutellariae Radix. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

7. IP-10 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 interferon-inducible protein(IP)-10 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 7).

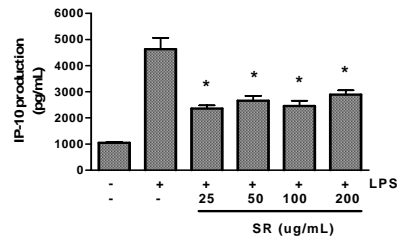


Fig. 7. Effect of SR on IP-10 production in Raw 264.7 cells treated with LPS. SR : Water extract of Scutellariae Radix. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

8. KC 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 KC 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 KC 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 8).

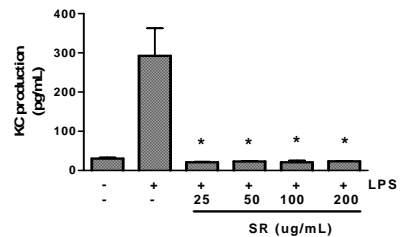


Fig. 8. Effect of SR on KC production in Raw 264.7 cells treated with LPS. SR : Water extract of Scutellariae Radix. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR. Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

9. VEGF 생성증가에 대한 영향

SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 vascular endothelial growth factor(VEGF) 생성증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 9).

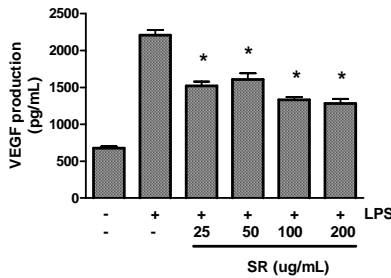


Fig. 9. Effect of SR on VEGF production in Raw 264.7 cells treated with LPS. SR : Water extract of Scutellariae Radix, Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with SR, Control : Treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

고찰

黃芩은 『神農本草經』¹⁾ 中品에 “黃芩, 味苦平. 主諸熱黃疸, 腸澼, 泄利, 逐水, 下血閉, 惡瘡疽蝕, 火瘍, 一名腐腸. 生川谷.” 이라고 처음 收載되었으며, 『大觀本草』²¹⁾에 “療痰熱, 胃中熱, 小腹絞, 消穀, 利小腸, 女子血閉, 淋露下血, 小兒腹痛” 이라 하였고, 『本草綱目』²²⁾에는 “宿芩乃舊根, 多中空, 外黃內黑, 卽今所謂片芩, 故又有腐腸, 妬婦諸名, 妬婦心黯, 故以比之. 子芩乃新根, 多內實, 卽今所謂條芩.” 이라 하여 宿芩과 子芩으로 분류하였다. 性은 寒하고, 味는 苦하며 淸熱瀉火, 燥濕解毒, 止血, 安胎의 효능이 있어 肺熱咳嗽, 熱病高熱神昏, 肝火頭痛, 目赤腫痛, 濕熱黃疸, 瀉痢, 熱淋, 吐衄, 崩漏, 胎熱不安, 癰腫疔瘡 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다²⁾.

黃芩의 주성분은 flavonoid계 화합물로 baicalein, baicalin, chrysin, oroxylin-A, oroxylin- α -7-o-glucuronide, wogonin, wogonoside, skullcapflavone, dihydrobaicalin⁷⁾과 그 외에 wogonin glucuronide, neo-baicalein, koganebananin 등이 있으며, sterol 류로서 β -sitosterol, campesterol, stigmasterol 등이 함유되어 있고, 또한 당류로서 sucrose 및 D-glucose 등이 함유되어 있는 것⁸⁾으로 알려졌다.

약리작용으로 항균효과⁹⁾, 염증성 장 질환에서 면역 조절 기능¹⁰⁾, 항암효과¹¹⁾, 항산화효과¹²⁾, 혈중 지질강하작용¹³⁾, 항알레르기 천식작용¹⁴⁾, 간 보호 기능¹⁵⁾을 보고 하였다.

이와 같은 약리작용에 대한 연구를 살펴볼 때, 황금은 특히 면역매개인자들의 조절을 통하여 항염증, 항산화, 항알레르기 등의 다양한 효능이 있는 것으로 보인다. 그러나 황금의 약리중 대표적인 항염 효과에 대해 각각의 질환별 해당 면역매개인자들에 대한 연구는 보고되었으나 황금 물추출물을 이용하여 다양한 염증매개인자들에 대한 연구는 부족한 것으로 판단되었다. 이에 본 연구에서는 黃芩을 열수 추출하여 제조

한 시료(SR)를 대상으로 Raw 264.7 cells의 cell viability와 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 NO 생성증가, 그리고 cytokines(IL-1 β , IL-6, IL-17, KC 등)의 생성증가에 미치는 영향을 측정, 조사함으로써 黃芩의 항염증 효과를 살펴보고자 하였다.

염증은 국소 손상 또는 외상을 입었을 때에 일어나는 복합 반응으로, 상처를 유발하는 자극에 대한 방어 기전으로 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실 등의 증상이 나타나며²³⁾ 여기에는 각종 cytokines와 protein의 관여는 물론 prostaglandin E₂, lysosomal enzyme, free radical등 다양한 면역계 세포와 매개물질들이 관여하고 있다²⁴⁾.

외부 자극원 중의 하나인 LPS는 그람음성균의 세포 표면을 구성하는 물질로서 대식세포와 같은 염증성 세포의 활성을 증대시키고 이로 인해 활성화된 대식세포는 선천 면역뿐만 아니라 적응 면역 등에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾.

본 연구에서는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)으로부터 분양받은 Raw 264.7 cells에 SR을 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 뒤에 24 시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 후, 세포의 증식을 MTT assay을 이용하여 확인한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 Normal군에 비하여 SR이 Raw 264.7 cells에 유의한 세포증식을 감소시키지 않았으며 이는 SR이 대식세포에 유의한 세포독성을 유발하지 않는다는 것으로 볼 수 있다(Fig. 1).

일반적으로 NO는 병리적인 원인에 의한 과도한 염증상태에서 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 생성증가에 미치는 영향을 비교하기위해 24 시간 동안 처리한 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 2). 이와 같이 SR이 LPS에 의해 유발된 대식세포의 NO 생성증가를 억제하는 SR이 NO 과잉에 의한 염증악화를 억제할 수 있는 효능이 있음을 의미한다.

IL-6는 림프계세포와 골수성 림프계세포에서 생성되며 감염이나 손상 등에 의한 급성반응을 보이며 면역에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여 한다²⁷⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6 생성증가에 미치는 영향을 비교하기위해 24 시간동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 3).

IL-10은 중요한 면역 조절 cytokine으로 면역 억제, 항염증반응 및 B 림프구 자극 특성을 포함하는 광범위한 생화학적 작용 범위를 갖고 있다²⁸⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-10 생성증가에 미치는 영향을 비교하기위해 24 시간동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-10 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 4).

IL-12는 대식세포와 dendritic cell에서 생물학적으로 inactive form인 IL-12p40과 active form인 IL-12p70의 두 가지가 분비된다²⁹⁾. 최근의 연구에서 IL-12p40이 수용체경쟁을 통하여 IL-12p70의 생물학적 작용을 길항할 수 있다는 것이 관찰되었다³⁰⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-12p40 생성증가에 미치는 영향을 비교하기위해 24 시간동

안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-12p40 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 5).

IL-17은 결합 조직 세포에 작용하는 memory T-cell-derived cytokine으로, 염증매개인자의 생산을 촉진시키는 경향이 있다³¹⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-17 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-17 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 6).

IP-10은 다양한 호흡기 염증 반응에서 호중구와 단핵구의 화학 주성에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다³²⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IP-10 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 7).

KC는 주로 조직세포(endothelial cell, fibroblast), 거핵세포(megakaryocyte) 및 활성화된 단핵구(monocyte)에 의해 생성되고, 급성 염증 반응의 매개자로서 다른 cytokine 보다 먼저 나타나 우선적으로 호중구(neutrophil)에 작용한다³³⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 KC 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 KC 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 8).

VEGF는 주요한 성장인자로서 혈관 내피세포에서 발현되는 매우 특이한 유사분열 촉진인자이다. 초기단계의 모세혈관 생성 시 가장 중요하게 고려되는 것이 VEGF 자극으로 인한 혈관의 투과성이다³⁴⁾. SR이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 VEGF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 9).

이와 같이 SR이 LPS에 의해 유발된 대식세포의 각종 cytokine의 생성증가를 유의하게 억제하는 것은 SR이 대식세포의 cytokine 과다배출로 인한 염증질환 악화, 예를 들면 IL-12p40과 IL-17의 증가로 인한 류마티스성 관절염 악화, VEGF 증가로 인한 자궁내막증 유발, KC와 IP-10의 증가로 인한 호흡기염증악화, IL-10 증가로 인한 전신성홍반성낭창 악화, IL-6 증가로 인한 패혈증악화 등을 완화할 수 있는 항염효능이 있음을 의미한다.

이상의 결과, 황芩을 열수 추출하여 제조한 시료 SR은 대식세포에 유의한 세포독성을 유발하지 않으면서 LPS로 유발된 대식세포의 NO, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IP-10, KC, VEGF의 생성증가를 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제하는 등 유의한 항염효능을 가지고 있는 것으로 나타났다. 앞으로 황芩 발효 추출물을 이용한 대식세포 연관 면역질환 치료제의 개발을 위하여 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

황芩(*Scutellariae Radix*)의 항염효능을 연구하고자 황芩을 열수 추출하여 제조한 시료(SR)를 대상으로 Raw 264.7 cells의 cell viability와 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 NO 생성증가, IL-1 β , IL-6, IL-17, KC 등의 cytokine 생성증가

에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황芩 물추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 황芩 물추출물은 대식세포에 유의한 독성을 유발하지 않았다.
2. 황芩 물추출물은 24시간의 배양에서 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성증가를 유의하게 억제시켰다.
3. 황芩 물추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IP-10, KC, VEGF 생성량을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제시켰다.

이상의 결과, 황芩을 열수 추출하여 제조한 시료 SR은 대식세포에 유의한 세포독성을 유발하지 않으면서 LPS로 유발된 대식세포의 NO, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IP-10, KC, VEGF의 생성증가를 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제하는 등 유의한 항염효능을 가지고 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 경원대학교 연구비 지원을 받았기에 감사드립니다.

참고문헌

1. Sun XY, Sun FY. Shen nong ben cao jing. Beijing:Kexue jishu wenxian chubanshe. 1996:64.
2. Guojia zhong yiyao guanli ju <<Zhonghua bencao >> bian wei hui. Zhonghua bencao. Shanghai:Shanghai kexue jishu chubanshe. 1999:(7)200-10.
3. Korean Food and Drug Administration Notification 2007-89. The Korean Pharmacopoeia, 2007:993-4.
4. Guojia yaodian weiyuanhui. The Chinese Pharmacopoeia. Beijing:Huaxue gongye chubanshe. 2005:211-2.
5. The DPRK Pharmacology Committee. The DPRK Pharmacopoeia. Pyongyang:Medicine Science publisher. 2003:454-5.
6. Ministry of Health, labour and Welfare. The Japanese Pharmacopoeia. Tokyo:Kabushiki YakujiNippō-sha. 2005:1183.
7. Kim HC. The Pharmacology of Medicinal Herbs. Seoul: Jibmundang. 2008:129-33.
8. Herbal Pharmacology Compilation Committee. Herbal Pharmacology. Seoul: Shinil Books. 2009:239-43.
9. Kim EN, Paek JY, Kim YH, Han MD. Antibacterial Activities of a Aqueous Extract form *Scutellaria baicalensis* against Pathogenic Bacteria. Journal of Natural Sciences of Soonchunhyang University.

- 2008;14(1):11-8.
10. Lee SH, Lim BO, Choue RW. Immunoregulatory Effects of Water Extracts of *Scutellariae Radix* in DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease Animal Model. *The Korean Journal of Nutrition*, 2004;37(6):431-9.
 11. Lee YY, You KH, Kim SY, Ahn BZ. Augmentation of the Cytotoxic Effects of Anticancer Drugs by (±)-ar-Turmerone and Extracts of the *Lithosperma* and *Scutellaria* Roots against Human Leukemia Cell Lines. *Yakhak Hoeji*, 2004; 37(6):431-9.
 12. Cho SU, Oh WW. Anti-Oxidative Effects of *Scutellariae Radix*. *Kor. J. Herbology*. 2005; 20(3):67-74.
 13. Kim KS, Cha MH, Lee SW, Yoon YS. A Study on the Inhibitory Effects of *Scutellariae Radix* on Fat Accumulation. *Korean Journal Of Oriental Medicine*. 2003;9(2):45-54.
 14. Park GB, Park YC. Effect of *Scutellariae Radix* extract on immune cells in OVA-induced asthmatic mice Lung tissue. *College of Oriental Medicine, Daejeon University*. 2005;14(1):35-42.
 15. In SL, Kang KL, Choue RW. Beneficial Effects of Water Extracts of *Scutellariae Radix* on Immune Function in Mice Fed Alcohol. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006;35(5):536-42.
 16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983;65:55-63.
 17. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*, 1990;131:165-72.
 18. Weissman BA, Gross SS. Measurement of NO and NO synthase. *Current Protocols in Neuroscience*. 2001;7:13.
 19. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod*. 2007;22(11):2928-35.
 20. Lee KS, Chung JH, Lee KH, Shin MJ, Oh BH, Hong CH. Bioplex analysis of plasma cytokines in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Immunol Lett*. 2008;121(2):105-9.
 21. Tang SW. *Da guan ben cao*. Hefei:An wei kexue jishu chuban she. 2002:277-8.
 22. Lee SJ. *Bon cho kang mok*. Seoul:komoonsa. 1973:453-5.
 23. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby Immunology. Seoul:epublic. 2008:60, 315-41.
 24. Yun HJ, Heo SK, Lee YT, Park WH, Park SD. Anti-inflammatory Effect of *Evodia Officinalis* DODE in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells. *Kor J Herbology*. 2008;23(1) L 29-38.
 25. Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm*, 1995-1996;46(1): 1-12.
 26. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-actived macrophage. *Phytother Res*. 2003;17(5):485-9.
 27. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*. 1992 Oct;258(5082):593-7.
 28. Moore KW, O' Garra A, Malefyt RW, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.
 29. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Diczig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol*. 1991;146(9):3074-81.
 30. Chen L, Chen D, Block E, O' Donnell M, Kufe DW, Clinton SK. Eradication of murine bladder carcinoma by intratumor injection of a bicistronic adenoviral vector carrying cDNAs for the IL-12 heterodimer and its inhibition by the IL-12p40 subunit homodimer. *J Immunol*. 1997;159:351-9.
 31. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007;117(5): 1175-83.
 32. Zeng X, Moore TA, Newstead MW, Deng JC, Lukacs NW, Standiford TJ. IP-10 mediates selective mononuclear cell accumulation and activation in response to intrapulmonary transgenic expression and during adenovirus-induced pulmonary inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(2):103-12.
 33. Conti P, Boucher W, Letourneau R, Feliciani C, Reale M, Barbacane RC, Vlagopoulos P, Bruneau G, Thibault J, Theoharides TC. Monocyte chemotactic protein-1 provokes mast cell aggregation and [3H]5HT release. *Immunology*. 1995;86(3):434-40.
 34. Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M, Ferrara N. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest*. 1999;104(11):613-20.