

# 씀바귀 추출물이 LPS투여 흰쥐 및 Raw 264.7세포에서 전염증성 cytokines 생성에 미치는 영향

이 은\*

상지대학교 보건과학대학 제약공학과

## Effects of *Ixeris dentata* extract on the production of pro-inflammatory cytokines in the LPS stimulated rat and Raw 264.7 cells

Eun Lee\*

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

**Abstract** - The purpose of this study was to investigate anti-inflammatory effect of *Ixeris dentata* ethanol extract in lipopolysaccharide-exposed rats and Raw 264.7 cells. Plasma concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were lower in *Ixeris dentata*-treated groups than in control group. Concentration of plasma IL-10 was higher in *Ixeris dentata*-treated groups than in control group. Concentrations of liver IL-1 $\beta$  and IL-6 were lower in the *Ixeris dentata*-treated groups than in control group. However, concentrations of liver TNF- $\alpha$  and IL-10 were not significantly different among all treatment groups. In the study using lipopolysaccharide-exposed Raw 264.7 cells, concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  tended to be decreased, but concentration of IL-10 tended to be increased in *Ixeris dentata*-treated groups. Plasm concentrations of total protein and albumin appeared to be increased in *Ixeris dentata*-treated groups.

**Key words** - *Ixeris dentata* EtOH ext. LPS shock, Cytokines, Raw 264.7 cells

### 서 언

생체조직의 방어기전으로 나타나는 염증반응은 염증 매개물질들에 의해 진행된다. 그러나 염증매개물질들은 주변 조직의 발적, 발열, 종창, 동통 및 기능장애 등의 증상을 유도하고(Yun *et al.*, 2008) 질병의 상태를 악화시키거나 새로운 질병의 원인이 되기도 한다(Rabson *et al.*, 2005). 따라서 염증성 질환의 치료 및 수술 후의 환자관리에서 염증반응의 적절한 제어는 대단히 중요하다(Chao *et al.*, 2000).

현재 임상에서 항염증제로 몇몇 약물들이 응용되고 있다. 이들 약물들은 대다수가 효능에서는 어느 정도 좋은 평가를 받고 있으나, 장기복용 할 경우 출혈성 소화관궤양, 신장 기능저하 및 혈압상승 등의 부작용과 함께 심근경색 및 혈전형성 등의 순환계 질환을 유발할 수 있다고 보고되

었다(Boumpas *et al.*, 1993). 이와 같은 부작용은 수술환자 관리 및 염증성 질환자들의 치료효과에 부정적인 영향을 주며, 한편으로는 환자들의 심리적 부담을 가중시킨다. 따라서 효능과 안전성이 우수한 새로운 항염증제를 개발하기 위해 천연물을 이용한 많은 연구들이 수행되었으며(Barton *et al.*, 2001; Byun, 2005; Lee, 2007; Seo *et al.*, 2001), 이와 같은 연구결과들은 천연물로부터 염증반응의 조절능에 관여하는 기능성 물질의 개발 가능성을 시사해주었으며, 한편으로는 보다 더 광범위하게 많은 천연자원으로부터 염증반응에 관여하는 기능성물질들에 대한 탐색이 필요함을 인식시켜주었다.

씀바귀(*Ixeris dentata*)는 국화과에 속하는 다년생 식물(Lee, 1979)이며, 민간요법에서 진정, 최면, 해열, 조혈, 건위, 소화불량, 폐렴, 간염, 타박상, 종기 및 식욕촉진 등에 널리 이용되었다(Hukuta, 1988). 쯤바귀의 주요 구성물질은 aliphatics, triterpenoids(Arai *et al.*, 1963) 및 sesquiterpene glycoside 등으로 밝혀졌다(Seto *et al.*,

\*교신저자(E-mail) : elee@sangji.ac.kr

1986). 또한 여러 연구 결과에서 썸바귀는 지질강하 및 혈당저하 등의 다양한 생리활성 효과를 나타내어(Cho *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 1991), 썸바귀 내에 다양한 생리활성물질이 내재하고 있을 것으로 생각된다.

Lipopolysaccharide(LPS)는 병원균의 내독소로서 그람 음성 세균의 막 구조물로 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며, 여러 종류의 염증세포 및 조직구성 세포들이 생산하는 cytokine들의 생산을 촉진한다(Marriot *et al.*, 1998). 또한 LPS는 Raw 264.7 cell 과 같은 macrophage 또는 monocyte에서는 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(Willeaume *et al.*, 1996; Funk *et al.*, 1991; Bhattacharyya *et al.*, 2002; Binetruy *et al.*, 1991), 염증반응을 연구하는 실험 모델에 많이 응용된다(Mathiak *et al.*, 2000). 따라서 본 연구는 항염증 효과가 우수하고, 부작용이 없는 새로운 항염증제를 개발하기 위한 기초 연구의 일환으로 썸바귀 추출물을 급여한 흰쥐에게 LPS에 의한 급성기 염증반응을 유발시킨 후, 혈액 및 간장의 전염증성 cytokines들의 생산량과 혈액 내 생물학적 수치들을 조사하였으며, 한편으로는 썸바귀 추출물을 처리한 Raw 264.7 cell에 LPS를 처리한 후, 처리군별 전염증성 cytokines들의 생산량을 조사하여, *in vivo* 및 *in vitro*에서 썸바귀 추출물의 항염증효과를 검토했다.

## 재료 및 방법

### 시험동물 및 시험군

평균체중이 207.25  $\pm$  7.41 g인 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 36두를 1주일간 시험식에 적응시킨 후, 평균체중이 유사하게 대조군(생리식염수 100 mg/kg, B.W.), 처리1군(썸바귀 추출물 100 mg/kg, B.W.), 처리2군(썸바귀 추출물 200 mg/kg B.W.) 및 처리 3군(썸바귀 추출물 300 mg/kg B.W.)으로 나누어, 각 처리군당 9두 씩 임의 배치했다.

### 식이 및 물

식이(Table 1) 및 물은 시험기간 6주 동안 자유 급여했다.

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredients	Composition (%)
Casein	20.0
$\alpha$ -Corn starch	35.5
Sucrose	11.0
Lard	4.0
Corn oil	1.0
Mineral mix <sup>1)</sup>	3.5
Vitamin mix <sup>2)</sup>	1.0
Cellulose powder	23.7
DL-methione	0.3

<sup>1)</sup>Mineral mix. (g/kg diet) : CaCO<sub>3</sub>, 29.29; CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.43; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 34.30; NaCl, 25.06; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 9.98; Feric citrate hexahydrate, 0.623; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.516; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.121; ZnCl<sub>2</sub>, 0.02; KI, 0.005; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0025.

<sup>2)</sup>Vitamin mix (mg/kg diet) : Thiamine-HCl, 12; Riboflavin, 40; Pyridoxin-HCl, 8; Vitamin-B<sub>12</sub>, 0.005; Ascorbic acid, 300; D-biotin, 0.2; Menadione, 52; Folic acid, 2; D-calcium pantothenate, 50; P-aminobenzoic acid, 50; Nicotinic acid, 60; Cholin chloride, 2000 (IU/kg diet); Rethinyl acetate, 5000 (IU/kg diet); Cholecalciferol, 250 (IU/kg diet).

### 썸바귀 추출물 및 급여

양질의 썸바귀 500 g(건조중량)을 적당한 량으로 나누어 수조상에서 냉각수 환류하에 EtOH로 5시간씩 3회 추출하고, 여과, 감압 농축하여 EtOH extract 131 g을 얻었다. 썸바귀 추출물 급여는 매일 오후 5시경에 존대를 이용하여 경구 투여하였으며, 대조군은 동일한 방법으로 생리식염수를 투여했다.

### LPS 처리

LPS(*Escherichia coli* 026: B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A., Sigma) 처리는 6주간의 사양기간이 종료된 후, 5 mg/kg의 수준으로 각 처리군 모두 동일하게 복강 주사했다.

### 혈액 및 간장 채취

혈액 채취는 시험 최종일에 LPS 처리 직전(0 h), LPS 처리 후 2시간(2 h) 및 5시간(5 h)에 각 처리군 별로 심장 천자법에 의해 채혈했다. 간장 채취는 LPS 처리 후 5시간째의 혈액 채취가 끝난 후 적출하였다.

**Raw 264.7 세포배양과 cytokines 정량용 시료 채취**

마우스 대식세포인 Raw 264.7 cells은 한국 세포주은행 (서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin(100 µg/ml)이 첨가된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시험과정의 모든 cells는 80-90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

LPS 처리는 dish에 cells을 분주하고(1x10<sup>6</sup>/ml), 씬바귀 추출물을 각 처리 별 농도(0 µg/ml, 10µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml)로 처리 한 후 1시간이 경과하였을 때 1 µg/ml 수준에서 medium에 처리하였다. 씬바귀 추출물 및 LPS를 처리하지 않은 cell을 대조군으로 하였으며 시료채취는 LPS 처리 후 6시간째에 시행하였다.

**Cytokines 정량**

혈장 cytokine정량용 시료는 채혈 직후, 혈장을 분리하여 -80°C에 냉동 보관하였다. 간장 cytokine정량용 시료는 1 g의 간장을 채취하여 5 ml의 cold phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4, containing a protease inhibitors cocktail)과 함께 혼합하여 얼음위에서 분쇄 하였다. 분쇄 혼합물을 4°C, 15,000 rpm, 15분간 원심분리한 후, 상층부를 0.45 µm 필터로 여과하고, 다시 원심분리해서 상층부를 -80°C에 냉동 보관하였다.

Raw 264.7 cells들이 생산한 사이토카인 정량을 위해 배양액을 4°C, 15,000 rpm, 15분간 원심분리한 후, 상층부를 0.45 µm 필터로 여과하고, 다시 원심분리해서 상층부를 -80°C에 냉동 보관하였다.

Cytokine(IL-1β, TNF-α, IL-6 및 IL-10)정량은 시판 Kit(Biosource International, USA)를 이용했으며, ELISA

reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF-α의 최저 측정농도는 0.7 pg/ml이며, 다른 cytokine들은 3-8 pg/ml이다. 간장 cytokines 정량은 5 ml의 PBS에 식염수로 세척한 간장 1 g를 혼합한 조정액으로 측정하였으며, pg/mg 단위로 나타내었다.

**혈액 total protein 및 albumin 농도측정**

혈액의 total protein 및 albumin 농도 측정은 혈액 자동 분석기(Boehringer Mannheim, 독일)로 실시했다.

**통계처리**

실험결과는 SPSS package를 이용한 one-way ANOVA 검정을 수행하여 mean ± S.D 로 나타내었으며, 각 처리군 간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test에 의해 P<0.05 수준에서 실시했다.

**결과 및 고찰**

**Plasma IL-1β**

LPS를 처리한 후 2시간 및 5시간째 각 처리군 별 Plasma IL-1β의 농도를 Table 2에 나타내었다.

Plasma IL-1β의 농도는 전 처리군 동일하게 LPS 처리 후 2시간째 및 5시간째 모두 증가했다. 이러한 결과는 LPS 처리 후 4-6시간에 plasma IL-1β 농도의 피크가 나타났다는 다른 연구자의 결과(Mathiak *et al.*, 2000)와 유사했다.

IL-1β는 TNF-α와 함께 대표적인 염증성 cytokine으로, NO를 생성하게 하는 매개물질이다(Benvenistem, 1997; Benvenistem, 1998; Murphy *et al.*, 1993; Murphy, 2000). 급성기 염증반응에서 이들 두 cytokine의 혈액 내 농도는

Table 2. Effect of *Ixeris dentata* ext. ext. on plasma IL-1β concentration in lipopolysaccharide-exposed rats

Treatment	IL-1β (pg/ml), Time (h) <sup>*</sup>		
	0 h	2 h	5 h
Control (saline, 100 mg/kg)	12.73 ± 3.22 <sup>NS</sup>	171.58 ± 19.39 <sup>b</sup>	302.85 ± 37.16 <sup>b</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (100 mg/kg)	14.15 ± 3.28 <sup>NS</sup>	122.45 ± 11.21 <sup>a</sup>	235.17 ± 20.65 <sup>a</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (200 mg/kg)	12.53 ± 2.92 <sup>NS</sup>	117.39 ± 14.54 <sup>a</sup>	207.38 ± 25.77 <sup>a</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (300 mg/kg)	13.61 ± 3.53 <sup>NS</sup>	120.61 ± 13.18 <sup>a</sup>	191.45 ± 27.15 <sup>a</sup>

<sup>\*</sup>: 0 h, 2 h and 5 h after LPS injection.

<sup>ab</sup>: Means in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05). <sup>NS</sup>: Not significantly different (P>0.05).

급격히 증가하며, 상호 상가효과를 나타낸다(Mathiak *et al.*, 2000). 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 LPS 처리 후, 2시간 및 5시간째에 썸바귀 추출물 처리군 들의 plasma IL-1β의 농도는 대조군보다 낮은 수치를 보여 썸바귀추출물 처리군 들의 염증반응이 대조군보다 낮은 수준임을 나타내었다.

**Plasma IL-6**

각 처리군 별 Plasma IL-6의 농도를 Table 3에 나타내었다.

Plasma IL-6의 농도는 LPS 처리 후 2시간 및 5시간째 모두에서 증가했다. 그러나 증가량은 썸바귀추출물의 처리량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.

IL-6는 단핵구를 포함한 여러 종류의 세포에서 분비되며 다양한 기능을 갖는 cytokine이다(Choi *et al.*, 2009). 그러나 체내에서 과잉 생산 될 경우 악성 종양이나 자가 면역질환 및 감염성 질환 등의 여러 가지 질환을 유발할 수 있다(Hibi *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 1994; Van, 1990).

본 연구에서 LPS 처리 후 plasma IL-6의 농도가 5시간째에서도 증가하는 경향을 보여 Mathiak 등(2000)이 LPS로 유도한 염증반응에서 plasma IL-6 농도의 최고 피크

시간은 LPS처리 후 4-6시간이었다고 보고한 결과와 유사했으며, 썸바귀 추출물의 처리량이 증가함에 따라 Plasma IL-6의 농도가 감소하는 경향을 보여, 썸바귀추출물의 항염증효과를 시사해 주었다.

**Plasma TNF-α**

Plasma TNF-α농도(Table 4)는 LPS 처리 후 2시간 및 5시간째에서 증가했다. 그러나 썸바귀 추출물 처리군 들 모두가 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었으며, 썸바귀 추출물 처리군 들 간에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

TNF-α는 LPS 등의 여러 종류의 자극에 반응하여 Kuffer cell, monocytes 및 macrophage에 의해 방출되는 peptide mediator이며(Chamulitrat *et al.*, 1995), endotoxin의 제거효과를 가지고(Harbrecht *et al.*, 1994), IL-1β와 함께 감염 및 종양 생성 시에 나타나는 면역반응의 염증성 cytokine이다.

TNF-α의 과잉 생산은 T cell의 수를 감소시켜 방어체계를 무너뜨리며(Abul *et al.*, 2007), 광범위의 pathogenic 상태를 일으키고 간장 내에서 간세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다(Hamada *et al.*, 1999). 염증반응에서

Table 3. Effect of *Ixeris dentata* ext. on plasma IL-6 concentration in lipopolysaccharide-exposed rats

Treatment	IL-6 (pg/ml), Time (h)*		
	0 h	2 h	5 h
Control (saline, 100 mg/kg)	27.15 ± 5.03 <sup>NS</sup>	272.55 ± 31.29 <sup>b</sup>	651.33 ± 37.92 <sup>c</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (100 mg/kg)	29.52 ± 4.94 <sup>NS</sup>	212.74 ± 24.35 <sup>a</sup>	513.27 ± 41.12 <sup>b</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (200 mg/kg)	28.37 ± 4.58 <sup>NS</sup>	208.93 ± 19.68 <sup>a</sup>	497.35 ± 35.52 <sup>b</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (300 mg/kg)	27.44 ± 5.17 <sup>NS</sup>	192.51 ± 21.32 <sup>a</sup>	411.31 ± 27.44 <sup>a</sup>

\*: 0 h, 2 h and 5 h after LPS injection.

<sup>a,b,c</sup>: Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). <sup>NS</sup>: Not significantly different ( $P > 0.05$ ).

Table 4. Effect of *Ixeris dentata* ext. on plasma TNF-α concentration in lipopolysaccharide-exposed rats

Treatment	TNF-α (pg/ml), Time (h)*		
	0 h	2 h	5 h
Control (saline, 100 mg/kg)	15.27 ± 3.11 <sup>NS</sup>	703.58 ± 37.15 <sup>b</sup>	827.93 ± 52.47 <sup>b</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (100 mg/kg)	15.87 ± 3.25 <sup>NS</sup>	488.37 ± 40.72 <sup>a</sup>	653.19 ± 45.33 <sup>a</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (200 mg/kg)	14.51 ± 2.95 <sup>NS</sup>	514.74 ± 35.29 <sup>a</sup>	611.52 ± 40.81 <sup>a</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (300 mg/kg)	16.37 ± 3.02 <sup>NS</sup>	497.51 ± 41.26 <sup>a</sup>	637.35 ± 47.29 <sup>a</sup>

\*: 0 h, 2 h and 5 h after LPS injection.

<sup>a,b</sup>: Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). <sup>NS</sup>: Not significantly different ( $P > 0.05$ ).

TNF- $\alpha$ 는 혈액과 조직사이의 구조물인 내피세포를 자극하여 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1), ALCAM-1(activated leukocyte cell adhesion molecule-1) 및 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)과 같은 부착분자(adhesion-molecule)들의 생산을 촉진하여 각종의 백혈구들을 염증부위로 이동시키는 역할도 한다(Briscoe *et al.*, 1992; Gamber *et al.*, 1985). 이러한 기전들을 통하여 염증부위에 축적된 백혈구는 각종 cytokine들을 지속적으로 분비하여 미생물과 종양세포에 대한 독성을 유지하기도 하며(Boumpas *et al.*, 1993) 한편으로는 염증반응을 유발시켜 조직을 손상시키기도 한다(Tracy *et al.*, 1987). 따라서 TNF- $\alpha$ 의 생산을 제어하는 것은 염증반응조절에 중요한 과제가 된다(Marriot *et al.*, 1998). 본 실험의 결과에서 LPS 처리 후 TNF- $\alpha$ 의 농도는 2시간 및 5시간에서 썸바귀추출물 처리군 들이 대조군보다 유의하게 낮은 수치를 보여 썸바귀 추출물이 염증반응 조절기능에 관여함을 시사하고 있다.

**Plasma IL-10**

썸바귀 추출물이 LPS를 투여한 흰쥐의 Plasma IL-10 농도에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. Plasma IL-10 농도는 LPS 처리 후 2시간째 및 5시간째 모두에서 증가했

다. 그러나 썸바귀 추출물처리군 들은 대조군보다 유의하게 높은 값을 나타내었다.

IL-10은 IL-1 $\beta$ 나 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 분비를 조절하여 면역 조절작용에 관여하는 것으로 알려져 있다(Pender *et al.*, 1999; Schotte *et al.*, 2004). 또한 전염증성 cytokine 들이 과량 분비되어 IL-10과 균형을 이루지 못할 경우, 숙주의 생존력에 영향을 줄 수 있으므로(Clerici *et al.*, 1994) 염증 반응에서 IL-10의 분비는 매우 중요하다. 본 실험의 결과에서 LPS처리 후 2시간째 및 5시간째에서 썸바귀추출물 처리군 들의 IL-10농도가 대조군보다 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 썸바귀추출물에 염증반응조절에 관여하는 기능성 물질이 내재하고 있을 가능성을 한층 더 높여 준다.

**Liver cytokines**

LPS 처리 후 5시간째, 각 처리군 별 간장 내 cytokine의 농도를 Table 6에 나타내었다. 간장 IL-1 $\beta$  및 IL-6의 농도는 썸바귀추출물 처리군이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었으나, TNF- $\alpha$  및 IL-10의 농도는 모든 처리군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. LPS shock시에 간장의 Kuffer cell에서 방출되는 IL-1 $\beta$ 의 생물학적인 특성은 IL-6와 비슷하며, 이들 두 cytokine은 서로 협조하여 염

Table 5. Effect of *Ixeris dentata* ext. on plasma IL-10 concentration in lipopolysaccharide-exposed rats

Treatment	IL-10 (pg/ml), Time (h)*		
	0 h	2 h	5 h
Control (saline, 100 mg/kg)	25.47 $\pm$ 3.31 <sup>NS</sup>	49.71 $\pm$ 3.95 <sup>a</sup>	87.62 $\pm$ 9.66 <sup>a</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (100 mg/kg)	22.18 $\pm$ 3.57 <sup>NS</sup>	52.49 $\pm$ 4.17 <sup>a</sup>	121.35 $\pm$ 11.25 <sup>b</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (200 mg/kg)	23.97 $\pm$ 3.81 <sup>NS</sup>	71.55 $\pm$ 4.31 <sup>b</sup>	137.53 $\pm$ 9.74 <sup>b</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (300 mg/kg)	24.61 $\pm$ 3.42 <sup>NS</sup>	73.75 $\pm$ 3.92 <sup>b</sup>	142.17 $\pm$ 10.21 <sup>b</sup>

\*: 0 h, 2 h and 5 h after LPS injection.

<sup>a,b,c</sup>: Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). <sup>NS</sup>: Not significantly different ( $P > 0.05$ ).

Table 6. Effects of *Ixeris dentata* ext. on liver cytokines concentration in lipopolysaccharide-exposed rats

Treatment	IL-1 $\beta$ (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)	TNF- $\alpha$ (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
Control (saline, 100 mg/kg)	29.11 $\pm$ 5.13 <sup>b</sup>	13.851 $\pm$ 2.37 <sup>b</sup>	1.91 $\pm$ 0.75 <sup>NS</sup>	1.49 $\pm$ 0.61 <sup>NS</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (100 mg/kg)	20.43 $\pm$ 3.51 <sup>a</sup>	8.21 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 0.88 <sup>NS</sup>	1.71 $\pm$ 0.58 <sup>NS</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (200 mg/kg)	19.12 $\pm$ 3.73 <sup>a</sup>	8.47 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.57 <sup>NS</sup>	1.82 $\pm$ 0.76 <sup>NS</sup>
<i>Ixeris dentata</i> ext. (300 mg/kg)	17.58 $\pm$ 4.07 <sup>a</sup>	7.52 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 0.61 <sup>NS</sup>	1.88 $\pm$ 0.73 <sup>NS</sup>

<sup>a,b</sup>: Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). <sup>NS</sup>: Not significantly different ( $P > 0.05$ ).

증 및 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Kakuma *et al.*, 1992). 또한 IL-6는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , 및 바이러스 등의 자극으로 kupper cell에서 합성된다(Busam *et al.*, 1990; Jirik *et al.*, 1989). 본 연구에서 간장 IL-1 $\beta$  및 IL-6 농도가 썸바귀추출물 처리군에서 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 썸바귀추출물이 간장 IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생산을 저해하는데 관여하였음을 시사해준다.

TNF- $\alpha$ 는 LPS shock에 의해 간장 Kuffer cell로 부터 방출되는 전염증성 사이토카인이다(Hamada *et al.*, 1999). 또한 단핵구, Kuffer cell 및 간세포에서의 IL-8 생산을 자극하며, 이때 분비되는 IL-8은 간 내 중성구의 침윤과 간 손상을 일으키는 간경변의 예후 인자이다(Hill *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996). 또한 항염증 사이토카인 IL-10은 간장이 주요 공급원이며 macrophages, Kupffer cells, T와 B lymphocytes 및 hepatocytes 등에서 생성되며(Louis *et al.*, 1997), 점막의 T-cell 활성화와 metalloproteinase, extracellular matrix의 결손을 하향 조절하여 점막 손상을 억제하고, 활성화된 대식세포나 단핵구의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6, IL-8의 합성을 억제한다고 알려져 있다(Simpson *et al.*, 1997, Thompson *et al.*, 1998). 본 연구에서 LPS 처리 후 간장 TNF- $\alpha$  및 IL-10의 농도는 대조군과 썸바귀추출물 처리군 들 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 간장에서 생산되는 TNF- $\alpha$  및 IL-10의 생산량이 여타 cytokine 들보다 소량이므로 혈액으로의 유입량이 간장 내 잔류농도에 크게 영향을 주었는데 기인한 것으로 생각된다.

### Raw 264.7 macrophages cytokines

Raw 264.7 세포배양시험에서 썸바귀 추출물이 LPS shock 시에 전염증성 cytokine의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

IL-1 $\beta$ (Fig. 1), IL-6(Fig. 2) 및 TNF- $\alpha$ (Fig. 3)의 농도는 대조군보다 LPS 처리군 들이 높은 경향을 나타내었다. LPS 처리군 들 간에서는 TNF- $\alpha$ 의 농도가 유의한 차이를 나타내지는 않았지만, 3개 cytokine 농도 모두가 썸바귀추출물 처리군 들에서 낮은 농도를 나타내어, 썸바귀투여량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. IL-10(Fig. 4)의 농도는 썸바귀 10  $\mu$ g/ml 처리군이 대조군과 유의한 차이를 나타내지는 않았으나, 썸바귀 처리군 들 모두가 썸바귀 무처리 군보다 높은 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과들은 *in vivo* 실험에서 나타난 결과와 잘 부합되며,

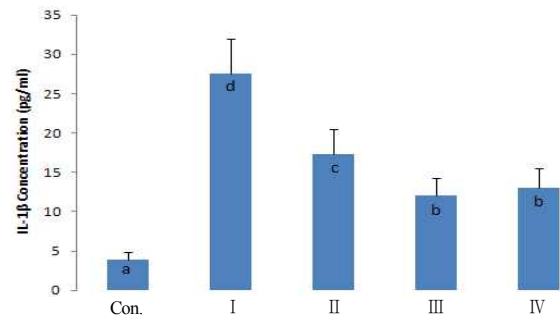


Fig. 1. Effect of *Ixeris dentata* ext. on IL-1 $\beta$  concentration in lipopolysaccharide induced Raw 264.7 macrophages. a,b,c,d: Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ), Con: Control, I: LPS (1  $\mu$ g/ml), II: LPS (1  $\mu$ g/ml)+10  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext., III: LPS (1  $\mu$ g/ml)+30  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext., IV: LPS (1  $\mu$ g/ml)+100  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext.

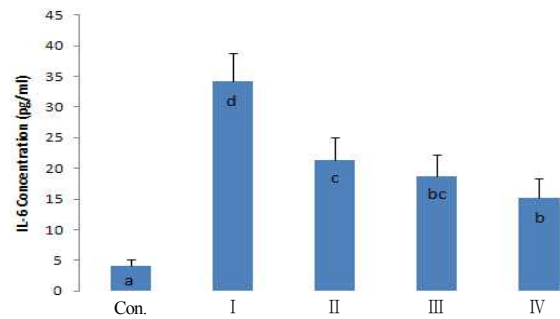


Fig. 2. Effect of *Ixeris dentata* ext. on IL-6 concentration in lipopolysaccharide induced Raw 264.7 macrophages. a,b,c,d: Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ), Con: Control, I: LPS (1  $\mu$ g/ml), II: LPS (1  $\mu$ g/ml)+10  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext., III: LPS (1  $\mu$ g/ml)+30  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext., IV: LPS (1  $\mu$ g/ml)+100  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext.

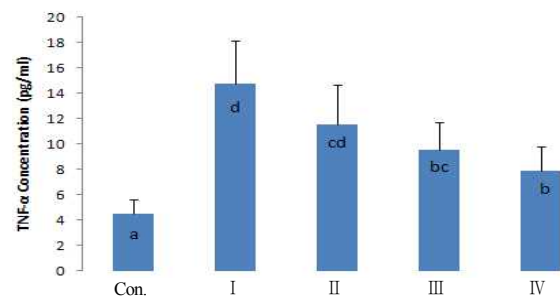


Fig. 3. Effect of *Ixeris dentata* ext. on TNF- $\alpha$  concentration in lipopolysaccharide induced Raw 264.7 macrophages. a,b,c,d,e: Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ), Con: Control, I: LPS (1  $\mu$ g/ml), II: LPS (1  $\mu$ g/ml)+10  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext., III: LPS (1  $\mu$ g/ml)+30  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext., IV: LPS (1  $\mu$ g/ml)+100  $\mu$ g/ml *Ixeris dentata* ext.

Table 7. Effects of *Ixeris dentata* ext. on the concentration of plasma total protein and albumin, and the ratio of albumin/globulin in lipopolysac charide-exposed rats

Treatment	total protein (g/dl)	albumin (g/dl)	Albumin/Globulin (%)
Control (saline, 100 mg/kg)	7.13 ± 1.11 <sup>NS</sup>	4.55 ± 0.94 <sup>NS</sup>	1.76
<i>Ixeris dentata</i> ext. (100 mg/kg)	7.58 ± 1.54 <sup>NS</sup>	4.71 ± 0.88 <sup>NS</sup>	1.64
<i>Ixeris dentata</i> ext. (200 mg/kg)	7.61 ± 1.39 <sup>NS</sup>	4.62 ± 0.71 <sup>NS</sup>	1.55
<i>Ixeris dentata</i> ext. (300 mg/kg)	7.59 ± 1.27 <sup>NS</sup>	4.65 ± 0.75 <sup>NS</sup>	1.58

<sup>NS</sup>: Not significantly different ( $P>0.05$ ).

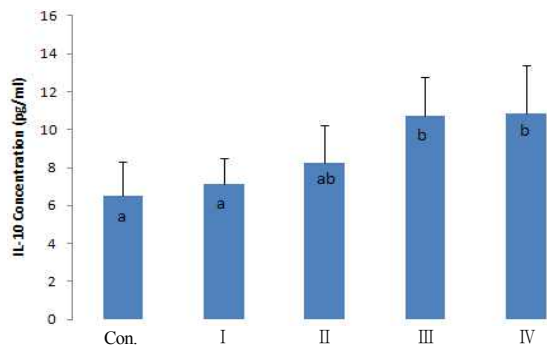


Fig. 4. Effect of *Ixeris dentata* ext. on IL-10 concentration in lipopolysaccharide induced Raw 264.7 macrophages.

<sup>NS</sup>: Not significantly different ( $P>0.05$ ), Con: Control, I: LPS (1 µg/ml), II: LPS (1 µg/ml)+10 µg/ml *Ixeris dentata* ext., III: LPS (1 µg/ml)+30 µg/ml *Ixeris dentata* ext., IV: LPS (1 µg/ml)+100 µg/ml *Ixeris dentata* ext.

세포 배양실험에서도 썸바귀추출물이 염증반응의 완화에 활성을 나타냄을 시사한다.

**혈액 total protein 및 albumin 농도**

복막염 및 말기 신장질환의 급격한 혈청알부민의 감소는 염증반응이 중요한 요인이라는 것이 밝혀졌다(Yeun *et al.*, 1997, Cueto, 2001). 따라서 염증반응의 정도와 혈청알부민의 농도는 상당한 관련성을 나타낸다. 본 연구에서는 total protein 및 albumin의 농도(Table 7)가 썸바귀추출물 처리 군에서 다소 높은 경향을 보였으나, 대조군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 이러한 결과는 rat의 혈청 내 albumin 및 total protein농도에 영향을 미칠 수 있는 생체 내 여러 요인(김 등, 2002)들이 복합적으로 작용하여 나타난 결과로 생각되며, 추후 시료채취 시간을 좀 더 체계적으로 하여 관찰해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

**적 요**

썸바귀추출물이 LPS shock 염증반응에서 항염증효과에 미치는 영향을 검토하기 위하여 생체 및 세포배양실험에서 전염증성 cytokine들의 생성과 혈액 내 생물학적 수치를 조사했다.

그 결과 LPS 염증유도 rat에서 썸바귀 추출물은 혈액 내 전염증성 cytokines 들, 즉 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 생산을 저해하고, 한편으로는 IL-10의 생산을 촉진하였다.

간장 IL-1β 및 IL-6의 농도는 썸바귀추출물 처리군이 대조군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었으나, TNF-α 및 IL-10의 농도는 모든 처리군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Raw 264.7 cell의 세포배양실험에서는 TNF-α의 농도가 유의한 차이를 나타내지는 않았지만, 3개 cytokine 모두가 썸바귀 투여량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. IL-10의 농도는 썸바귀 처리군 들 모두가 높은 경향을 나타내었다.

혈액 내 total protein 및 albumin의 농도는 대조군과 유의한 차이를 나타내지는 않았으나, 썸바귀추출물 처리 군에서 높은 경향을 보였다.

이상의 결과들을 종합해 보면 썸바귀 추출물에는 항염증반응에 관여하는 기능성물질이 내재하고 있음을 시사해 준다.

**사 사**

본 연구는 2010년도 상지대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Abul., K., H. Andrew and S.P. Lichtman. 2007. Cellular and molecular immunology. 6th edition. pp. 353-354.
- Arai, Y.Y., M. Kusumoto, K. Nagao and H. Shiojima. 1963. Composite constituents: Aliphatics and triterpenoids isolated from the whole plants of *Ixers debilis* and *I. dentata*. *Yakugaku Zasshi* 103:356-359.
- Barton, C.C., E. Barton, P.E. Ganey, S.L. Kunkel and R.A. Roth. 2001. Bacterial lipopolysaccharide enhances aflatoxin B<sub>1</sub> hepatotoxicity in rats by a mechanism that depends on tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Hepatology* 33:66-73.
- Benvenistem, E.N. 1997. Immunology of the Nervous System. Oxford University Press, New York. USA. pp. 419-459.
- Benvenistem E.N. 1998. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:259-275.
- Bhattacharyya, A., S. Pathak, S. Datta, S. Chattopadhyay, J. Basu and M. Kundu. 2002. Mitogenactivated protein kinases and NF-kappaB regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J.* 366:376-82.
- Binetruy, B., T. Smeal and M. Kariu. 1991. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351:122-7.
- Boumpas, D.T., G.P. Chrousos, R.L. Wilder, T.R. Cupps and J.E. Balow. 1993. Glucocorticoid therapy of immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.* 119:1198-1208.
- Briscoe, D.M., R.S. Cotran and J.S. Pober. 1992. Effect of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 *in vivo*: correlation with CD3+T cell infiltration. *J. Immunol.* 149:2954-60.
- Busam, K.J., T.M. Bauer, J. Bauer, W. Gerok and K. Decker. 1990. Interleukin-6 release by rat liver macrophages. *J. Hepatol.* 11:367-373.
- Byun, B.H. 2005. Effects of *Inonotus obliquus* Ethanol Extract on Cytokine Expression in Raw 264.7 Cell. *Korean J. Herbology* 20(2):55-60.
- Chamulitrat, W., M.E. Blazka, S.J. Jordan, M.I. Luster and R.P. Mason. 1995. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in endotoxin-primed rats administered carbon tetrachloride. *Life Sci.* 24:2273-80.
- Chao, C.Y., S.L. Yeh, M.T. Lin and W.J. Chen. 2000. Effects of parenteral infusion with fish-oil or safflower-oil emulsion on hepatic lipids, plasma amino acids, and inflammatory mediators in septic rats. *Nutrition* 16:284-288.
- Cho, J.S., H.Y. chung and H.S. Young. 1990. A preliminary study on hypo-cholesterolemic and hypoglycemic activities of some medical plants. *Korean J. pharmacogn.* 21:153-155.
- Choi, J.S., H.S. Young and B.W. Kim. 1991. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Ixeris dentata* in diabetes rats. *Arch. Pharm. Res.* 13:269-270.
- Clerici, M., E. Ferrario, D. Trabattoni, S. Viviani, V. Bonfganti and D.J. Vanzon . 1994. Multiple defects of T helper cell function in newly diagnosed patients with Hodgkin's disease. *European J. Cancer* 30A:1464-1470.
- Funk, C.D., L.B. Frunk, M.E. Kennedy, A.S. Pong and G.A. Fitzgerald. 1991. Human platelet/ erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* 5:2304-2312.
- Gamber, J.R., J.M. Harlan, S.J. Klebanoff and M.A. Vadas. 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:8667-8671.
- Hamada, E., T. Nishida, Y. Uchiyama, J. Nakamura, K. Isihara and H. Kazuo. 1999. Activation of Kupffer cells and caspases-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin. *J. Hepatol.* 30:807-818.
- Harbrecht, B.G., M. Disilvio, A.J. Demetris, R.L. Simmons, and T.R. Billiar. 1994. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates in vivo nitric oxide synthesis and induces liver injury during endotoxemia. *Hepatology* 20:1055-1060.
- Hibi, M., K. Nakajima and T. Hirano. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.* 4(1):1-12.
- Hill, D.B., L.S. Marsano and C.J. McClain. 1993. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 18:576-580.
- Hirano, T., T. Matsuda and K. Nakajima. 1994. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells* 12(3):262-277.
- Huang, Y.S., C.Y. Chan, J.C. Wu, C.H. Pai, Y. Chao and S.D. Lee. 1996. Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J. Hepatol.* 24:377-384.
- Hukuta, J.R. 1988. Illustrate Medicinal Plants of the World. Amazon. Co. Tokyo, Japan. pp. 1067-1068.
- Jirik, F.R., T.J. Podor and T. Hirano. 1988. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment



- IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.* 142:144-147.
- Kakuma, S., A. Fukatsu, T. Shinagawa, S. Kurokawa and A. Kusakabe. 1992. Localization of intra hepatic interleukin-6 in patients with acute and chronic liver disease. *J. Clin. Pathol.* 45:408-411.
- Lee, E. 2007. Anti-inflammatory effect of *Scutellariae Radix*. *Korean J. Plant Res.* 20(6):548-522.
- Louis, H., O. LeMoine, M.O. Peny, E. Quertinmont, D. Fokan and M. Goldman. 1997. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A- induced hepatitis in mice. *Hepatology* 25:1382-1389.
- Marriot, J.B., M. Westby, S. Cookson, M. Guckian, S. Goodbourn and G. Muller . 1988. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- $\alpha$  production. *J. Immunol.* 161:4236-4243.
- Mathiak, G., G. Grass, T. Herzmann and T. Luebke. 2000. Cu-Zetina C, Boehm SA. Capase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. *British J. Pharmacol.* 131:383-386.
- Murphy, S., M.L. Simmons, L. Agullo, A. Garcia, D.L. Feinstein, E. Galea, D.J. Reis DJ, D. Minc-Golomb and J.P. Schwartz. 1993. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* 16:323-328.
- Murphy, S. 2000. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1-13.
- Pender, S.L., E.J. Breese and U. Günther. 1999. Suppression of T-cell-mediated injury in human gut by interleukin 10: Role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterology* 115: 573-583.
- Rabson, A., I.M. Roitt and P.J. Delves. 2005. *Really Essential Medical Immunology*. Blackwell publishing Ltd, Oxford, UK. pp. 1-14.
- Schotte, H., B. Schluter, P. Willeke, E. Mickholz, A. Schora, W. Domschke, and M. Gaubitz. 2004. Long-term treatment with etanercept significantly reduces the number of pro-inflammatory cytokine secreting peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 4:112-118.
- Seo, W.G., H.O. Pae, G.S. Oh , K.Y. Chai, T.O. Kwon, Y.G. Yun, N.Y. Kim and H.T. Chung. Inhibitory rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, Raw 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* 76:59-64.
- Seto, M., T. Miyasa and S. Fukushima. 1986. Sesquiterpene lactones from *Ixeris dentata* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* 34:4170-4176.
- Simpson, K.J., N.W. Lukacs, L. Colletti, R.M. Strieter and S.L. Kunkel. 1997. Cytokines and the liver. *J. Hepatol.* 27: 1120-32.
- Thompson, K.C., A. Trowern, A. Fowell, M. Marathe, C. Haycock and M.J.P. Arthur. 1988. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *in vitro*. *Hepatology* 28:1518-1524.
- Tracy, K.J., Y. Fong, D.G. Hesse, K.R. Manogue, A.T. lee and G.C. Kuo. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330:662-664.
- Van Snick, J. 1990. IL-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8:253-278.
- Willeaume, V., V. Kruys, T. Mijatovic and G. Huez. 1996. Tumor necrosis factor- $\alpha$  production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J. Inflamm.* 46:1-12.
- Yun, H.J., S.K. Heo, H.S. Yi, Kim CH, B.W. Kim and S.D. Park. 2008. Anti-inflammatory effect of Injinho-tang in RAW 264.7 Cells. *Korean J. Herbology* 23(2):169-178.

(접수일 2011.7.13; 수정일 2011.8.18; 채택일 2011.9.20)