

## 국내산 삼채 에탄올 추출물의 항염증 효과

배기춘<sup>#</sup>, 배대열<sup>\*</sup>

(주) 삼채

### The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium Hookeri* cultivated in South Korea

Gi-Choon Bae<sup>#</sup>, Dae-Yeoll Bae<sup>\*</sup>

Samchae, Hanam, Gyeong-Gi, South Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Allium Hookeri* (AH) is a traditional herb to treat inflammatory diseases in India and Myanmar. Recently, AH cultivation was succeeded in South Korea. This study was performed to evaluate the anti-inflammatory effects of Korean AH in RAW264.7 cells, mouse macrophage cell line.

**Methods** : To evaluate the anti-inflammatory effects of root of AH, we prepared the 70% ethanol extract, then we examined the productions of nitrite, and pro-inflammatory cytokines. To examine the nitrite, and cytokines, the RAW264.7 cells were treated with AH, then stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 500 ng/ml) for 24 h. Then the cells were harvested for griess assay, ELISA and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Also to detect the ability of AH to induce heme oxygenase-1 (HO-1), we examined the HO-1 expression using real time RT-PCR and western blot. Furthermore, we examined the mitogen activated-protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activation to find out the underlying mechanisms.

**Results** : AH ethanol extract significantly inhibited the productions of nitrite and interleukin (IL)-1 $\beta$ . AH treatment increased the HO-1 expression dramatically at 1 h, then peaked at 3 h. When the HO-1 was inhibited by tin (Sn) protoporphyrin-IX (SnPP), the anti-inflammatory action of AH was reversed. AH treatment inhibited the activation of p38, but not extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) and also the degradation of inhibitory kappa B  $\alpha$  (Ik-B $\alpha$ ) in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

**Conclusions** : These data could suggest that AH exerts anti-inflammatory influences through up-regulation of HO-1 and deactivation of p38.

**Key words** : *Allium Hookeri* (AH), lipopolysaccharide (LPS), macrophages, inflammation, heme oxygenase-1 (HO-1)

## 서론

염증은 병원균 침입이나 조직 손상에 의해 일어나는 선천적 면역 반응으로, 다양한 면역 세포에 의해 진행되는 복합적인 과정이다<sup>1,2)</sup>. 염증 과정 중에는 대식세포와 같은 면역 세포가 병원균 침입에 반응하여 식작용(phagocytosis)을 하거나 사이토카인과 같은 염증성 인자들을 분비하여 병원균을 제거하는 과정이 포함된다<sup>3)</sup>. 만약 이러한 염증 반응이 조절되지

못하면, 다량 분비되는 염증성 인자들로 인해 다양한 질병 및 사망에 이를 수 있기 때문에 염증에 대한 이해가 더 필요하다<sup>4,5)</sup>. 실제로 박테리아 침입 시 일어나는 과도한 염증에 일어나는 패혈증과 같은 전신 염증의 경우는 30~60 %으로 높은 사망률을 보이고, 이러한 높은 사망률의 원인은 염증으로 인한 장기의 기능 손실로 인한 장기 부전이다<sup>6,7)</sup>.

Heme oxygenase-1 (HO-1)는 heme을 biliverdin/bilirubin, carbon monoxide, 와 free iron으로 전환시키는 효소이다<sup>8)</sup>.

\*교신저자 : 배대열, 경기 하남시 감북동 378-25

· Tel : 010-7204-6607 · E-mail : mansonman@naver.com

#제1저자 : 배기춘, 경기 하남시 감북동 378-25

· Tel : 010-9382-0855 · E-mail : ba555@daum.net

· 접수 : 2012년 10월 12일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 5일

이렇게 전환된 세 가지 형태의 생성물들과 HO-1 그 자체는 세포손상 및 사멸의 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 HO-1의 발현이 항염증 작용을 통하여 세포 손상을 억제한다는 연구 결과가 보고되었다<sup>9)</sup>. 실제로 활성화된 대식세포에서 HO-1이 증가하면 interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  등과 같은 전염증성 사이토카인들을 억제함이 보고되었다<sup>10,11)</sup>. 삼채 (三菜, *Allium hookeri*)는 뿌리 부추라고도 부르며, 히말라야 해발 1400m 이상 초고랭지에서 자생하며, 미얀마, 인도 등지에서 주로 섭취하고 있는 채소이다. 현지에서는 주밋 (juumyit)이라고도 부르며, 현지에서 우리나라의 파, 마늘처럼 쉽게 애용되는 채소이다. 단맛, 쓴맛, 매운맛이 난다고 하여 삼채(三菜)라고 부르기도 하며, 인삼 맛이 난다고 하며 삼채(蔘菜)라고 부르기도 한다. 현지에서는 민간처방으로 다양한 염증 질환과 암 질환 등에 사용하였으며, 미얀마 의학사전에는 삼채에는 다량의 식이유황이 포함되어 있어, 그 효능이 식이유황에서 기인한 것이 아닌가라는 추측이 있다. 이러한 삼채를 최근 한국에 들여와, 한국산 삼채로 국내에 맞게 재배에 성공하여, 그 성분 및 효능에 대한 관심이 집중되고 있다. 하지만 아직 국내산 삼채에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있지 않은 실정이다. 이 연구는 국내산 삼채에 대한 첫 번째 연구로, 그 기전 및 효능 연구에 초점을 두고 진행하였다.

이 연구에서는 국내산 삼채 뿌리의 효능에 초점을 맞추어, 국내산 삼채 뿌리의 항염증 효과를 관찰하였다. 효과를 규명하기 위해서, 대식세포주인 RAW264,7 세포에 lipopolysaccharide (LPS)로 염증을 유도하였을 때, nitrite와 IL-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  와 같은 염증성 인자들을 조사하였고, 그 조절 기전으로 HO-1과 mitogen activated-protein kinases (MAPKs), nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)의 변화를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용한 삼채는 (주)삼채, 순천만 삼채 농장에서 채집하였으며, 삼채 추출물의 제조 방법은 국내산 삼채 뿌리 10 g을 300 ml의 70 %에탄올을 사용하여 가열 환류추출한 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 삼채 70 % 에탄올 추출물 (5.6 g, 수득율 56 %)을 얻었다.

### 2) 시약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 HEPES, sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS, Tris-HCl 등은 SIGMA (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), anti-phospho-c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), anti-phospho-p38, anti-(inhibitory) I $\kappa$ -B $\alpha$ , anti-HO-1은 Cell signaling사 (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. ELISA

kit for mouse IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포배양

RAW264,7 대식세포는 ATCC에서 동결상태로 구입하였다. RAW264,7 대식세포는 FBS (10 %)과 penicillin (100 U/ml)와 streptomycin sulfate (100  $\mu$ g/ml)가 함유된 RPMI1640배지에서 습한 조건의 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양하였다. Confluent를 70 %로 유지해주었고, 2일에 한번 씩 개대 배양을 하였다. Passage 3회 이상에서 실험에 사용하였고, 8회 이상이 되었을 때는 폐기하였다.

### 2) 세포 독성 분석

RAW264,7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 동일한 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 삼채를 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) Nitrite Assay

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethylendiamide)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포들은 RPMI-1640배지에서  $2 \times 10^5$ /well의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 삼채를 처리하였다. LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100  $\mu$ l의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrometer로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

### 4) Cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264,7 cell을 자극하기 전 삼채를 3시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS로 자극한 후 24시간 뒤 이들 전염증성 사이토카인을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다. ELISA는 Mouse ELISA kit for IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  를 구입하여 시행하였다.

5) 정량 중합 효소 반응 real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA는 TRIzol 시약 (invitrogen, USA)을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 삼채를 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 TRIzol 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 µl의 chloroform 용액을 가하고 두 세 번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 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 µl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량 한다.mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 µl, Real time PCR master mix 4 µl (Roche), pimer 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 Applied Biosystems (CA, USA)에서 합성하였다.

6) Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5 x 10<sup>6</sup> cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 삼채 (500 µg/ml)를 전처리 하고 3시간 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 15분 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 농도별로 cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리 (5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 µl + protease inhibitor 10 µl)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4 X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10 % SDS-PAGE에 전기영동 한 후 5 % skim milk로 2 시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 Iκ-Bα, HO-1을 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

8) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean ± SE 로 나타내었으며, 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS를 이용하여 Two-way ANOVA에 준하였고 p-value 가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 삼채가 세포 독성에 미치는 영향

삼채 뿌리 70%에탄올 추출물의 대식세포 독성에 관해 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 삼채 추출물을 여러 농도로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그

결과 삼채 추출물을 처리한 실험군은 DMSO를 처리한 대조군에 비해 세포 생존율을 저하시키지 않았다. 즉, 삼채는 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

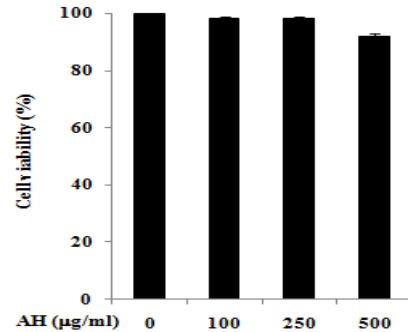


Fig. 1. Effect of AH 70% ethanol extract on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with or without AH as indicated concentration. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data represents mean ±SE of three independent experiments.

2. 삼채가 nitrite 생성에 미치는 영향

삼채의 항염증 작용을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 삼채를 다양한 농도로 3시간 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극하였다. 24 시간 후 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정된 결과 LPS 자극은 대식세포에서 NO의 생성을 증가 시켰다. 삼채를 전처리한 실험군에서는 nitrite의 생성이 유의하게 억제되었다(Fig. 2).

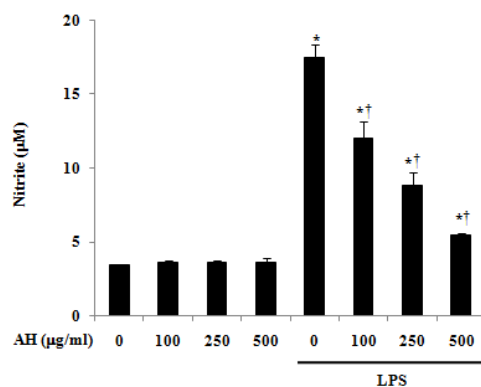


Fig. 2. The inhibitory effects of AH 70% ethanol extract on LPS-induced nitrite production. The cells were pre-treated with AH as indicated concentration for 3 hr, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. Nitrite release was measured by Griess assay. \*P < 0.05 : significant as compared to DMSO, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. Data represents mean ±SE of three independent experiments.

3. 삼채가 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 전염증성 사이토카인의 발현에 대한 삼채의 효과를 조사하기 위하여, 삼채를 다양한 농도로 전처리하고 LPS로 자극하였다. 24 시간 후 세포 상층액에서

IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  를 측정된 결과 LPS 자극은 대식세포에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  발현을 유의성있게 증가시켰다. 삼채를 전처리한 실험군에서는 IL-1 $\beta$  생성이 유의성있게 억제되었으나, IL-6, TNF- $\alpha$  은 유의성있게 억제되지 않았다 (Fig. 3).

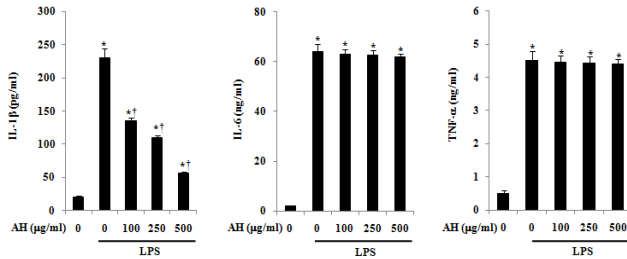


Fig. 3. Effect of AH 70% ethanol extract on the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with AH as indicated concentrations for 3 hr, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. \*P < 0.05 : significant as compared to DMSO, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. Data represents mean  $\pm$ SE of three independent experiments.

#### 4. 삼채가 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현에 미치는 영향

삼채가 RAW 264.7 세포에서 전염증성 인자를 단백질 수준에서 억제하였음에 착안하여 (Fig. 3), mRNA수준에서도 전염증성 인자들을 억제하는지 알아보기로 하였다. 삼채를 다양한 농도로 전 처리한 후 LPS로 자극하였다. 24시간 후 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  의 mRNA를 측정된 결과 LPS 자극은 mRNA의 발현을 유의성있게 증가시켰다. 삼채를 전처리한 실험군에서는 IL-1 $\beta$  mRNA발현이 유의성있게 억제되었으나, IL-6, TNF- $\alpha$  발현은 유의성있게 억제되지 않았다 (Fig. 4).

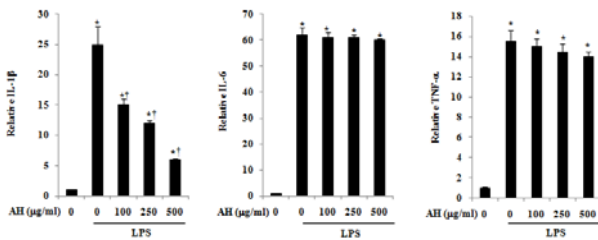


Fig. 4. Effect of AH 70% ethanol extract on the mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with AH as indicated concentrations for 3 hr, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. \*P < 0.05 : significant as compared to DMSO, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. Data represents mean  $\pm$ SE of three independent experiments.

#### 5. 삼채가 HO-1 발현에 미치는 영향

삼채가 HO-1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 삼채 (500  $\mu$ g/ml)을 처리하여 시간별로 HO-1의 발현을 관찰하였다. 그 결과, 삼채를 처리한 후 1시간부터 HO-1의 발현이 mRNA 수준 및 단백질 수준에서 증가하였다 (Fig. 5A

and B). 그리고 나서 3시간에 정점을 이루었고, 그러한 효과가 거의 24시간 까지 지속이 되었다. 이러한 효과는 삼채 농도 의존적으로 나타남에 따라 (Fig. 5C and D), 삼채의 HO-1 유도능이 있음을 알 수 있었다.

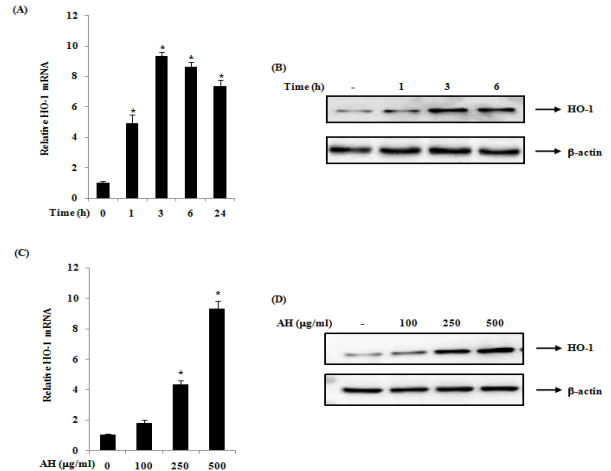


Fig. 5. Effects of AH on HO-1 expression in RAW264.7 cells. (A and B) Cells were incubated for indicated times with AH (500  $\mu$ g/ml). (C and D) Cell were incubated with indicated doses for 3 h. (A and C) Real time RT-PCR for mRNA level of HO-1 expression. (B and D) Western blot analysis for protein level of HO-1 expression. \*P < 0.05 : significant as compared to DMSO, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. Data represents mean  $\pm$ SE of three independent experiments.

#### 6. 삼채로 유도된 HO-1의 역할

삼채에서 유도된 HO-1이 과연 삼채의 항염증 작용에서 주요한 작용을 하는지 알아보기 위해, 삼채를 처리하기 전에, HO-1 억제제인, tin (Sn) protoporphyrin-IX (SnPP)를 처리하였다. SnPP를 처리하고, 삼채를 처리하여 HO-1의 발현이 억제된 후, 삼채가 억제했던 IL-1 $\beta$ 의 변화를 관찰한 결과, 삼채의 IL-1 $\beta$  억제 효과가 없어졌다 (Fig. 6). 이는 삼채로부터 나오는 HO-1이 삼채의 항염증 작용에 주요한 역할을 하면 보여준다.

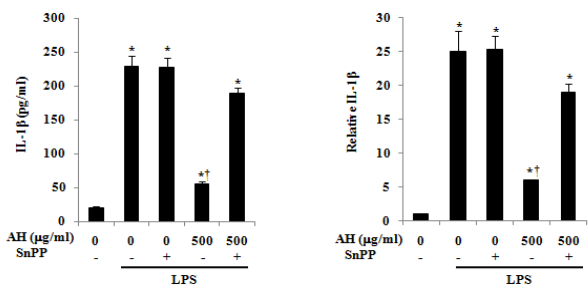


Fig. 6. The role of HO-1 on AH's anti-inflammatory action in RAW264.7 cells. Cell were incubated with SnPP (10  $\mu$ M) for 1 h, then treated with AH for 3 h. Then the cells were stimulated with LPS for 24 h. (A) The protein level and (B) mRNA levels of IL-1 $\beta$  were measured by ELISA and real time RT-PCR. \*P < 0.05 : significant as compared to saline, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. Data represents mean  $\pm$ SE of three independent experiments.

### 7. 삼재가 MAPKs와 NF-κB 활성화에 미치는 영향

삼재가 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 염증 억제 기전을 알아보기 위해 MAPK family인 ERK, JNK, p38의 활성화 정도를 알아보기로 하였다. MAPKs의 활성화는 각각의 인산화를 통해 이루어진다. 삼재를 다양한 농도로 전처리한 후 LPS로 자극하였다. 15분 후 인산화 정도를 측정한 결과 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서는 ERK, JNK, p38의 활성화와 Iκ-Bα의 분해가 증가하였다. 삼재를 전처리한 실험군에서는 p38의 활성화만이 억제되었다(Fig. 7).

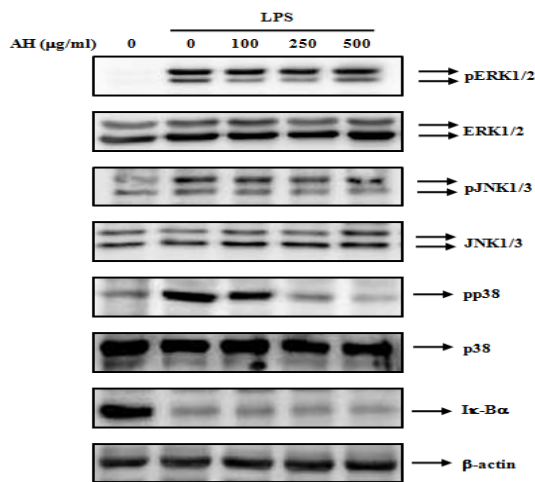


Fig. 7. Effects of AH on the activation of MAPKs and degradation of Iκ-Bα on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with AH as indicated doses for 3 hr, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 15 min. The activation of MAPKs and degradation of Iκ-Bα were measured by western blot. Data represents mean ±SE of three independent experiments.

### 고찰

본 연구에서는 국내산 삼재 뿌리를 70% 에탄올로 추출하여 추출물의 항염증 효과를 관찰하였다. 항염증 효과를 관찰하기 위하여, nitrite의 생성량과 전염증성 사이토카인 분비를 측정하였고, 그 조절기전으로 HO-1과 MAPKs, Iκ-Bα를 관찰하였다. 삼재 추출물은 nitrite 생성과 IL-1β의 생성을 유의성있게 억제함으로써 염증 억제 효과를 보여주었다. 게다가 삼재 추출물은 HO-1을 유도하였고, 삼재의 HO-1 유도능력이 삼재의 항염증 효과에 기여함을 보여주었다. 그리고 사이토카인 억제에 따른 염증 억제 기전으로 p38의 활성을 억제하였다.

염증반응은 인체가 불특정 원인에 의해 손상 받았을 때 그 손상 부위를 회복, 재생하려는 면역학적 방어기전이다<sup>12)</sup>. 염증반응이 일어나면 항원은 효과적으로 제거되지만 그 반응이 오히려 과도하게 나타나거나 지속적으로 나타나게 되면 급성 또는 만성 염증질환의 발병 원인이 되기도 하고, 이는 추후 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 질환의 병인이 될 수도 있다<sup>13,14)</sup>. 그렇기 때문에 과도한 염증반응에 의한 조직손상을 억제하기 위한 목적으로 항염제 사용이 필요하게 된다. 현재 사용되는 가장 강력한 항염제 중 하나인

스테로이드는 신속한 염증 억제를 기대할 수 있으나, 감염, 골다공증, 혈압상승, 쿠싱 증후군 등의 심각한 부작용으로 인해 장기적인 사용은 바람직하지 않다<sup>15)</sup>. 또한 가장 널리 사용되고 있는 항염제 중 하나인 NSAIDs는 위장관 합병증 빈도가 높고, 이를 극복하기 위해 개발된 COX-2 선택적 길항제도 혈전증의 위험이 있는 환자의 경우, 뇌졸중, 심근경색증 등 심혈관계 부작용을 초래할 수 있음이 밝혀지면서 최근 큰 문제로 대두된 바 있다<sup>16,17)</sup>. 따라서 기존의 항염제가 지닌 부작용을 극복하고 장기적으로 안전하게 사용할 수 있는 항염 약물의 개발이 요구된다.

최근 들어 천연물을 이용한 항염증 제제개발 및 보고가 많다<sup>18-23)</sup>. 하지만 이러한 보고 및 연구가 지속되지 못하고 있는 실정이다. 천연물에 대한 추가적인 성분 분석 및 성분의 활성이 기대에 못 미치기 때문에 항염증 제제개발에까지 못 미치는 것이다. 하지만 이번 연구에서 사용된 삼재에는 다량의 식이유황이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 실제로 MBC와 경남농업과학 기술원에서 발표한 자료에 의하면, 삼재 뿌리에는 7 g/kg, 삼재 잎에는 10.7 g/kg의 식이유황이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이는 삼재 뿌리와 비교해보면, 국내산 마늘에 비해 6배, 양파에 비해 2배, 미얀마산 삼재 뿌리에 비해 2배 정도의 식이유황이 포함되어 있는 것이다. 이 식이유황은 methyl sulfonyl methane (MSM)이라고도 하며, MSM의 항염증 효과, 관절염 치료효과, 항암 효과, 운동 후 피로 개선 효과 등이 다수 보고되어 있다<sup>24-28)</sup>. 이를 비추어 보면, 삼재에 포함된 식이 유황이 모든 효과를 보여준다고 단정 지을 수 없지만, 삼재의 포함된 다량의 식이 유황이 삼재의 항염증 효과에 일부분 기여하지 않을 까하고 사료된다.

HO-1은 감염이나 병원균 침입을 통한 전신성 염증인 패혈증 시, 인체의 항성을 유지하는 데 아주 중요한 분자이다<sup>29)</sup>. 최근에 LPS로 유도한 염증에서 HO-1의 유의한 효과는 다수 발표되고 있는 실정이다<sup>30,31)</sup>. 보고에 따르면 HO-1의 발현이 증가하면 다수의 사이토카인과 염증성 인자들이 감소하고, 그에 따라 염증이 억제된다고 하였다<sup>30,31)</sup>. 그렇기 때문에 HO-1을 유도하는 것은 추후 염증 조절에서 주요한 인자라고 할 수 있다. 이 연구에서 국내산 삼재의 뿌리를 70%에탄올로 추출하여, 그 추출물로 HO-1의 발현을 관찰한 결과, HO-1의 발현이 비교적 이른 시간(1시간)에 빠르게 일어남을 알 수 있었다. HO-1의 발현이 염증성 인자들을 억제하여 항염증 효과가 있음에 착안하면, 삼재의 HO-1의 유도가 궁극적으로 삼재의 nitrite와 IL-1β 생성 억제에 크게 기여했다고 추측할 수 있다. 그리고 정말로 HO-1이 삼재의 염증 억제효과에 주요하게 작용하는 지 알아보기 위해, HO-1억제제를 처리하였다. HO-1억제제를 처리하면 삼재의 HO-1 유도능력이 감소할 것이고, HO-1 유도능력이 감소하면 염증 억제효과가 감소할 것이라는 가정하에 연구를 진행한 결과, 예상대로 HO-1억제제를 처리 시 삼재의 항염증 효과가 감소하였다. 이는 삼재의 주요한 항염증 기전은 HO-1임을 보여준다.

MAPKs와 NF-κB는 세포 증식, 분화, 생존과 사멸 등을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있으며, 염증성 사이토카인 및 염증 매개 인자들의 생성에 관여한다<sup>32)</sup>. 대식세포에 LPS로 염증 유도 시, MAPKs와 NF-κB는 활성화되고 이에 따라 다량의 염증 인자들이 분비되고, 이에 따라

세포는 활성화되어 조직 및 인체에 손상을 주게 된다<sup>32)</sup>. 하지만 이 연구에서는 결과적으로 삼채의 항염 효과는 NF- $\kappa$ B가 아닌 MAPK p38의 직접적인 영향으로 생각할 수 있다. 이전의 보고에서도 말하길, MAPKs와 NF- $\kappa$ B는 서로 독립적으로 염증성 매개 인자들을 조절 할 수도 있다는 보고도 있다. 특히 p38은 NF- $\kappa$ B와 독립적으로 사이토카인을 조절할 수 있음이 알려져 있다<sup>33,34)</sup>. 또한 p38 억제제인 SB239063 을 이용하여 사이토카인의 발현을 억제한 논문이 다수 발표되어 있으며<sup>35,36)</sup>, p38 억제를 통한 사이토카인의 발현을 억제하는 기전이 삼채의 주요한 기전이라고 결론지을 수 있다.

이상의 결과를 종합해 보면, 삼채 70% 에탄올 추출물은 대식세포에서 HO-1을 유도하고, p38의 활성을 억제하여 nitrite와 IL-1 $\beta$ 의 생성을 억제함을 보여주었다. 삼채의 이와 같은 작용은 천식, 아토피, 관절염과 같은 자가 면역질환 뿐 아니라, 소화기 염증질환, 피부염증 질환 등에도 응용이 가능할 것으로 생각된다. 향후 삼채 뿌리 뿐만 아니라 삼채 잎을 통해서도 연구가 이루어지고, 삼채 추출 용매를 변경하고 성분 분석을 하는 등 다양한 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 결론

삼채 70% 에탄올 추출물의 항염증 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 삼채 70% 에탄올 추출물은 대식세포에서 세포 독성을 보이지 않았다.
2. 삼채 70% 에탄올 추출물은 nitrite와 IL-1 $\beta$ 의 생성을 유의성 있게 억제하였다.
3. 삼채 70% 에탄올 추출물은 HO-1을 유도하였다.
4. 삼채 70% 에탄올 추출물은 p38의 활성화를 억제하였다.

이상의 결과, 삼채 70% 에탄올 추출물은 대식세포에서 HO-1을 유도하고, p38의 활성을 억제하여 nitrite와 IL-1 $\beta$ 의 생성을 억제하였으며, 추후 염증 질환 억제에 탁월한 효과를 보일 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. Maines MD. The oxygenase system: a regular of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997 ; 37 : 517-54.
2. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma associated inflammation. *Curr Opin Crit Care*. 2006 ; 12 : 595-601.
3. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 ; 91 : 2046-50.
4. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS,

- Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clin Exp Immunol*. 2007 ; 147(2) : 227-35.
5. Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, Goodson WH, Andrews WS. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery*. 1984 ; 96(1) : 48-54.
6. Russell JA, Boyd J, Nakada T, Thair S, Walley KR. Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol*. 2011 ; 17 : 48-85.
7. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care* 2005 ; 9 : S13-19.
8. Lee MS, Lee J, Kwon DY, Kim MS. Ondamtanggamibang protects neurons from oxidative stress with induction of heme oxygenase-1. *J Ethnopharmacol*. 2006 ; 108 : 294-98.
9. Choi BM, Kim HJ, Oh GS, Pae HO, Oh H, Jeong S, Kwon TO, Kim YM, Chung H T. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neurosci Lett*. 2002 ; 328 : 185-9.
10. Lin HY, Juan SH, Shen SC, Hsu FL, Chen YC. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochem Pharmacol*. 2003 ; 66 : 1821-32.
11. Bornman L, Baladi S, Richard MJ, Tyrrell RM, Polla BS. Differential regulation and expression of stress proteins and ferritin in human monocytes. *J Cell Physiol*. 1999 ; 178(1) : 1-8.
12. Schmith VD, Foss JF. Effects of inflammation on pharmacokinetics/pharmacodynamics: increasing recognition of its contribution to variability in response. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 ; 83(6) : 809-11.
13. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett*. 2008 ; 267(2) : 204-15.
14. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 ; 8(5) : 349-61.
15. Fan H, Morand EF. Targeting the side effects of steroid therapy in autoimmune diseases: the role of GILZ. *Discov Med*. 2012 ; 13(69) : 123-33.
16. Musu M, Finco G, Antonucci R, Polati E, Sanna D, Evangelista M, Ribuffo D, Schweiger V, Fanos V. Acute nephrotoxicity of NSAID from the foetus to the adult. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011 ; 15(12) : 1461-72.

17. Krötz F, Struthmann L. A Review on the risk of myocardial infarction associated with the NSAID diclofenac. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2010 ; 10(1) : 53-65.
18. Park SM, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Kim SC. Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide - activated RAW 264,7 cells. *Korean J Herbol*. 2012 ; 27(3) : 31-8.
19. Nam JB, Lee MH, Choi HY, Sohn NW, Kang H. Effect of Forsythiae Fructus ethanol extract on inflammatory cytokine production and cellular signaling pathways in mouse macrophages. *Korean J Herbol*. 2012 ; 27(1) : 59-64.
20. Jo IJ, Choi MO, Park MC, Song HJ, Park SJ. Anti-Inflammatory Effect of Aqueous Extract of Scolopendrae Corpus in RAW 264,7 Cells. *Korean J Herbol*. 2011 ; 26(3) : 23-9.
21. Yoon SB, Han HS, Lee YJ. Effect of Scutellariae Radix Extract on the Proinflammatory Mediators in Raw 264,7 Cells Induced by LPS. *Korean J Herbol*. 2011 ; 26(2) : 75-81.
22. Min JY, Park YK. Effect of Dipsaci Radix Water Extract on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264,7 Mouse Macrophages. *Korean J Herbol*. 2009 ; 24(4) : 189-95.
23. Bae GS, Park HJ, Kim DY, Seo SW, Park KB, Kim BJ, Song JM, Lee KY, Na C, Shin BC, Park SJ, Song HJ, Hwang SY. Inhibitory effect of extract of Teucrium veronicoides on the production of inflammatory cytokines. *Korean J Herbol*. 2008 ; 23(3) : 119-25.
24. Kim YH, Kim DH, Lim H, Baek DY, Shin HK, Kim JK. The anti-inflammatory effects of methylsulfonylmethane on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2009 ; 32(4) : 651-6.
25. Amirshahrokhi K, Bohlooli S, Chinifroush MM. The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 ; 253(3) : 197-202.
26. Lim EJ, Hong DY, Park JH, Joung YH, Darvin P, Kim SY, Na YM, Hwang TS, Ye SK, Moon ES, Cho BW, Do Park K, Lee HK, Park T, Yang YM. Methylsulfonylmethane suppresses breast cancer growth by down-regulating STAT3 and STAT5b pathways. *PLoS One*. 2012 ; 7(4) : e33361.
27. Barmaki S, Bohlooli S, Khoshkharesh F, Nakhostin-Roohi B. Effect of methylsulfonylmethane supplementation on exercise - Induced muscle damage and total antioxidant capacity. *J Sports Med Phys Fitness*. 2012 ; 52(2) : 170-4.
28. Debbi EM, Agar G, Fichman G, Ziv YB, Kardosh R, Halperin N, Elbaz A, Beer Y, Debi R. Efficacy of methylsulfonylmethane supplementation on osteoarthritis of the knee: a randomized controlled study. *BMC Complement Altern Med*. 2011 ; 11 : 50.
29. Chung SW, Liu X, Macias AA, Baron RM, Perrella MA. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *J Clin Invest*. 2008 ; 118(1) : 239-47.
30. Kung CW, Lee YM, Cheng PY, Peng YJ, Yen MH. Ethyl pyruvate reduces acute lung injury via regulation of iNOS and HO-1 expression in endotoxemic rats. *J Surg Res*. 2011 ; 167(2) : e323-31.
31. Waltz P, Carchman EH, Young AC, Rao J, Rosengart MR, Kaczorowski D, Zuckerbraun BS. Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway. *Autophagy*. 2011 ; 7(3) : 315-20.
32. Torgersen KM, Aandahl EM, Taskén K. Molecular architecture of signal complexes regulating immune cell function. *Handb Exp Pharmacol*. 2008 ; 186 : 327-63.
33. Sigala I, Zacharatos P, Toumpanakis D, Michailidou T, Noussia O, Theocharis S, Roussos C, Papapetropoulos A, Vassilakopoulos T. MAPKs and NF- $\kappa$ B 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.