

양제근(*Rumex japonicus* HOUTT.)분획의 항염증 효과

허준영, 조현진, 박기정, 박선동*

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory effect of *Rumex japonicus* HOUTT. in RAW 264.7 cells

Jun-Yong Huh, Hyun-Jin Cho, Ki-jeong Park and Sun-Dong Park*

Dept. of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Dongguk University.

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to authenticate whether fractionated extract of *Rumex japonicus* HOUTT. (RJ) has anti-inflammatory effects in mouse macrophage, RAW264.7 cells.

Methods : Roots of RJ were extracted by methanol for 48hours. The methanol that gained was filtered and freeze dried. The methanol extract was dissolved in water and dichloromethane (DCM). After that, two layers were separated. Ethyl acetate (EA) added to the water layer and separated again. All the layers were filtered and freeze dried and the extracts were tested. Cytotoxic activity of extracts on RAW 264.7 cells was measured using MTS assay. The nitric oxide (NO) production was measured and proinflammatory cytokines and PGE2 were measured by ELISA kit. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), I κ -B- α and nuclear NF- κ B p65 expression were detected by western blot.

Results : Our results indicated that DCM and EA extracts of RJ inhibited the LPS-induced NO, PGE₂ production and iNOS, COX-2 expression accompanied by an attenuation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in RAW 264.7 cells most effectively. DCM and EA extracts also had suppression effects of LPS-induced NF- κ B and MAPKs activation.

Conclusions : This results demonstrate that fractionated extract of RJ has anti-inflammatory effects and among the fractionated extract, dichloromethane and ethyl acetate extract have best anti-inflammatory effects.

Key words : Anti-inflammation, *Rumex japonicus* HOUTT. RAW 264.7 cells

서 론

염증은 생명체의 생老病死의 과정에서 중요한 병리적 요소로 작용하는 기제이다. 급성 염증은 외부 감염이나 손상을 유발하는 화학적 혹은 물리적 자극 등에 대항하는 인체의 방어 기제이며 또한 조직이나 장기의 손상을 회복시키는 기전으로서 중요한 역할을 담당하고 있다. 염증의 과정은 그 자체로는 질병으로 취급받지는 않지만, 장기간 지속되는 염증은 다른 질환을 속발시키는 원인으로 작용하기도 한다. 일례로 Blanca 등¹⁾은 대략 15-20% 정도의 악성종양에서 그 진행과정에서 만성 염증이 관여하는 것으로 추정된 바 있다. 따라서 염증을 치료하는 것은 임상적으로 매우 중요하며, 다양한 종류의 천연물을 포괄하고 있는 한약재 및 한약처방에서 그 염

증 치료 효과를 검증하여 이용하고자 하는 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

양제근(羊蹄根)은 野大黃이나 羊蹄大黃이라고도 하는데 마디풀과(Polygonaceae)에 속한 多年生 草本인 참소리쟁이(*Rumex japonicus* HOUTT.)의 뿌리를 건조한 것이다. 性은 寒하며, 味는 苦하고, 有小毒하다. 歸經은 心, 肝, 大腸經이며, 涼血止血, 殺蟲療癩하는 효능이 있어 衄血, 咯血, 便血, 崩漏 등의 출혈증상과 疥瘡, 頑癬 등의 피부병 증세를 치료하는데 사용되고 있다.²⁾

양제근의 함유 성분에 대해서는 Jang 등이 줄기에 함유되어 있는 24-nor-Ursane type triterpenoids를 보고한 바 있으며³⁾, Jiang 등⁴⁾과 Chen 등⁵⁾은 根部에서 분리한 성분을 보고한 바 있다.

*교신저자 : 박선동, 경기도 고양시 일산 동구 식사동 814-9, 동국대학교 한의과대학 방제학교실
· Tel : 031-961-5825 · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2012년 6월 08일 · 수정 : 2012년 6월 25일 · 채택 : 2012년 6월 27일

성분에 대한 연구와 마찬가지로 양제근은 기존에 연구된 자료가 많지 않은데, 양제근 추출물의 항진균작용에 대하여 연구가 진행된 바 있으며⁶⁾, 항산화 효과에 관하여 연구된 사례도 있었다.⁷⁾ 양제근은 한의학 문헌에서 피부병 증세를 치료한다고 기재되어 있어 아토피성 피부염의 치료효과를 증명하기 위한 실험이 진행된 바 있는데, 안 등⁸⁾은 Balb/c mouse를 대상으로 양제근의 열수추출물의 아토피 피부염 치료효과를 보고하였으며, Lee 등⁹⁾은 NC/Nga mice를 대상으로 아토피 피부염의 진행억제 효과에 관하여 연구하였다. 하지만 양제근의 항염증 효과에 관하여 RAW 264.7 세포를 이용하여 규명한 연구는 보고된 바 없었다.

본 연구에서는 양제근을 메탄올 추출한 후 분획하여 분획별 항염증 활성을 조사하였다. 이를 위하여 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에 Lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 염증을 유도한 이후, 양제근의 분획이 유발된 염증을 효과적으로 억제하였는지를 측정하였다. 이를 측정하기 위하여, 세포 배양액의 nitric oxide와 PGE₂ 수치를 측정하였고, western blot을 실시하여 iNOS, COX-2의 발현을 측정하였으며, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성에 양제근이 미치는 영향을 측정하였다. 또한 그 기전을 규명하기 위하여 NF- κ B와 MAPkinase의 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였다. 양제근 1000 g에 5000 ml의 100% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하여 여과하여 농축하고 동결 건조하여 56.92 g의 메탄올 추출물(수율 5.69%)을 얻었다. 이 메탄올 추출물중 50g을 물 500ml에 용해시킨 다음 dichloromethane(DCM)을 동량으로 가한 후 분별깔대기를 이용하여 DCM의 분획층을 수득하였다. 이를 3번 반복한 후, 수득한 분획층을 여과, 농축, 동결건조하여 양제근의 DCM 분획 4.02g을 얻었다. 이 과정 이후 남은 물 층에 다시 500ml의 ethyl acetate(EA)를 가하여 상술한 과정과 동일한 방법으로 EA분획물 5.14g을 얻었다. 남은 물층 또한 동일과정을 통해 33.2g을 수득하였다.

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide, bis는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고, CAPS, tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis,

USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 iNOS antibody와 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody와 anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서, COX-2, I κ B α , p-I κ B α , NF- κ B, PARP, β -actin antibody는 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사 (Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정을 위한 ELISA kit와 nuclear and cytoplasmic protein extraction reagents는 Pierce Biotechnology사 (Rockford, USA)에서 구입하였으며, PGE₂ assay kit는 R&D사 (Minneapolis, USA)에서 구입하였다. Protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

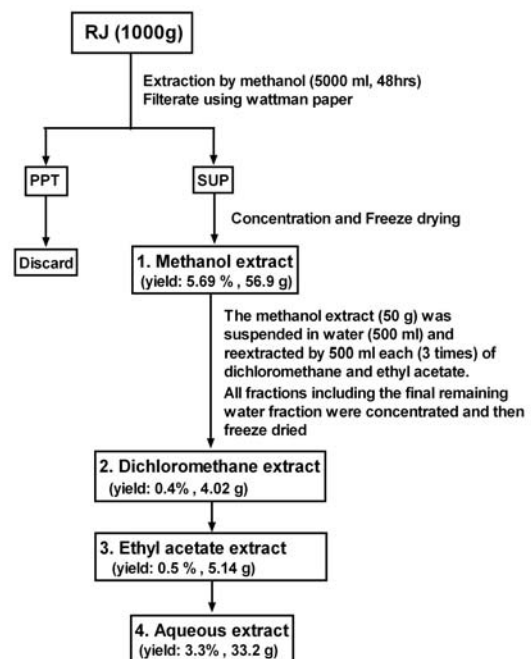


Figure 1. Extraction and fractionation procedures of RJ. PPT: RJ after decoction, SUP: methanol extract before freeze drying.

2. 방법

1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) MTS assay

양제근의 메탄올 (M), 다이클로로메탄 (DCM), 에틸아세테이트 (EA), 물 (A) 분획의 세포에 대한 독성 측정은

5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법¹⁰⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 각각의 약제를 농도별 (0, 10, 100, 300, 500, 700 μ g/ml)로 18 시간 동안 처리하였다. Well당 20 μ l의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도는 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교해서 보정하였다.

3) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System¹¹⁾을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 각각의 분획을 농도별로 전처리하고 1시간 후 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액 50 μ l와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였다.

4) PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit로 실험하였다. 세포에 양제근의 각각의 분획을 농도별로 전처리하고 1 μ g/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 PGE₂ 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 100 μ l씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50 μ l와 PGE₂ conjugate 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 μ l씩 처리하여 10분간 반응시킨 후, 50 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 PBS로 3회 세척한 후, lysis buffer (pH 7.5, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. Nuclear extract의 경우는 nuclear extraction kit를 사용하였다. 이후, 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와

0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

6) 세포 배양액 내의 cytokine 측정

세포 배양액 내의 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 양제근의 각각의 분획을 1시간동안 전처리한 후, 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100 μ l의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 μ l의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxy benzalmalonate (TMB) substrate를 100 μ l씩 처리하여 5~30분간 반응시킨 후 100 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

결과는 means \pm SEM으로 나타내었으며, 통계분석법은 GraphPad Prism 4.0을 이용하여 one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests를 실시한 후, P값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다. Western blot을 통해 얻은 band의 density 분석은 GelDoc-It BioImaging System (UVP, USA)을 사용하여 측정하였다.

실험결과

1. 양제근 분획의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 각각의 분획의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 양제근의 분획을 농도별 (0, 10, 100, 300, 500, 700 μ g/ml)로 18시간 동안 처리한 결과, 100 μ g/ml의 농도까지는 세포의 생존율이 88% 이상이었고, 그 이상의 농도에서는 세포의 생존율을 15% 이상 감소시켰다 (Fig. 2). 그래서 세포 생존율에 영향을 주지 않는 100 μ g/ml 이하의 농도로 다음 실험을 진행하였다.

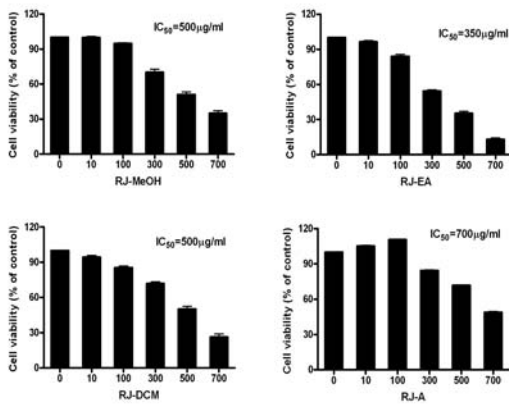


Figure 2. Effect of RJ extracts on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 10, 100, 300, 500, 700 μ g/ml) of RJ extracts for 18 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in materials and methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

2. RAW 264.7 세포에서 NO와 PGE₂의 생성량에 미치는 영향

Griess Reagent를 사용하여 양제근 분획별로 NO의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, LPS에 의해 증가되는 NO의 생성량이 각각의 분획에서 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). LPS에 의해 생성되는 NO에 대한 IC₅₀ 값은 M, DCM, EA, A 분획에서 각각 9.7 μ g/ml, 8.8 μ g/ml, 5.2 μ g/ml, 58.7 μ g/ml로 측정되었다 (Fig. 3B). 또 LPS에 의해 유도되는 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 4에서 보듯이, 각각의 분획에서 처리 농도가 증가함에 따라 PGE₂의 생성량이 감소되는 것으로 나타났다. M, DCM, EA, A 분획의 100 μ g/ml의 농도에서 각각 11.4%, 51.6%, 19.6%, 3.5% 감소되었다. NO와 PGE₂의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, DCM과 EA 분획의 저해 활성이 탁월함을 알 수 있었다.

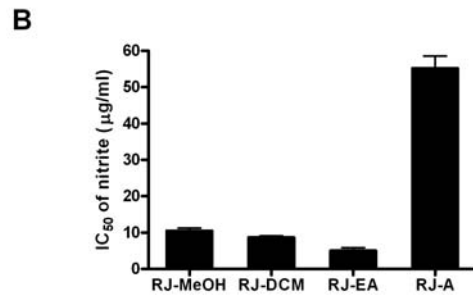
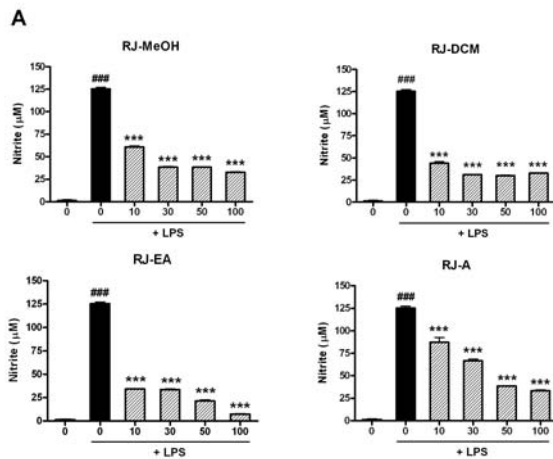


Figure 3. Effect of RJ on LPS-induced NO production. RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 30, 50, 100 μ g/ml of RJ fractionated extracts (M, DCM, EA, A) for 1 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18 hr. The NO production was measured by Griess Reagent System as described in materials and methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); ###, *** : $P < 0.001$.

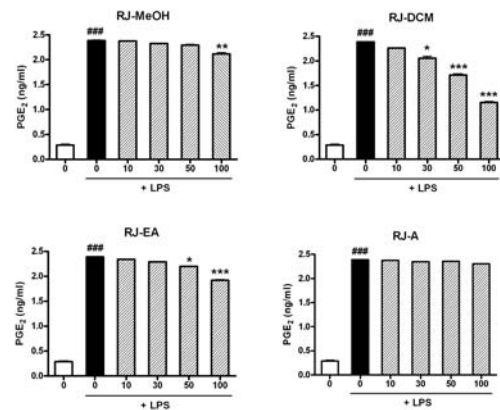


Figure 4. Effect of RJ on LPS-induced PGE₂ production. RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 30, 50, 100 μ g/ml of RJ fractionated extracts (M, DCM, EA, A) for 1 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18 hr. The PGE₂ production was measured by ELISA kit as described in materials and methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; ###, *** : $P < 0.001$.

3. RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

염증에 관여하는 NO는 iNOS에 의해서, PGE₂는 COX-2에 의해서 만들어진다. 그래서 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 양제근 분획의 영향을 조사하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 각각의 분획을 100 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 1 μ g/ml LPS를 18시간 동안 처리하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서 iNOS와 COX-2의 발현이 증가하였고, 양제근 분획을 함께 처리한 경우에는 iNOS와 COX-2의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

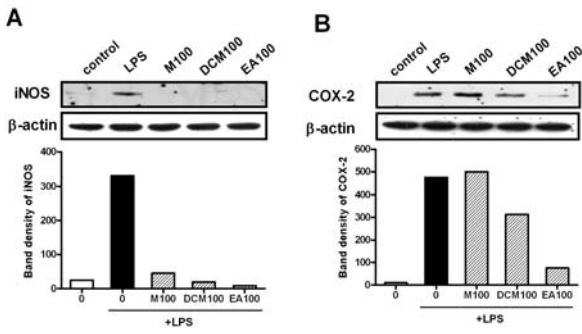
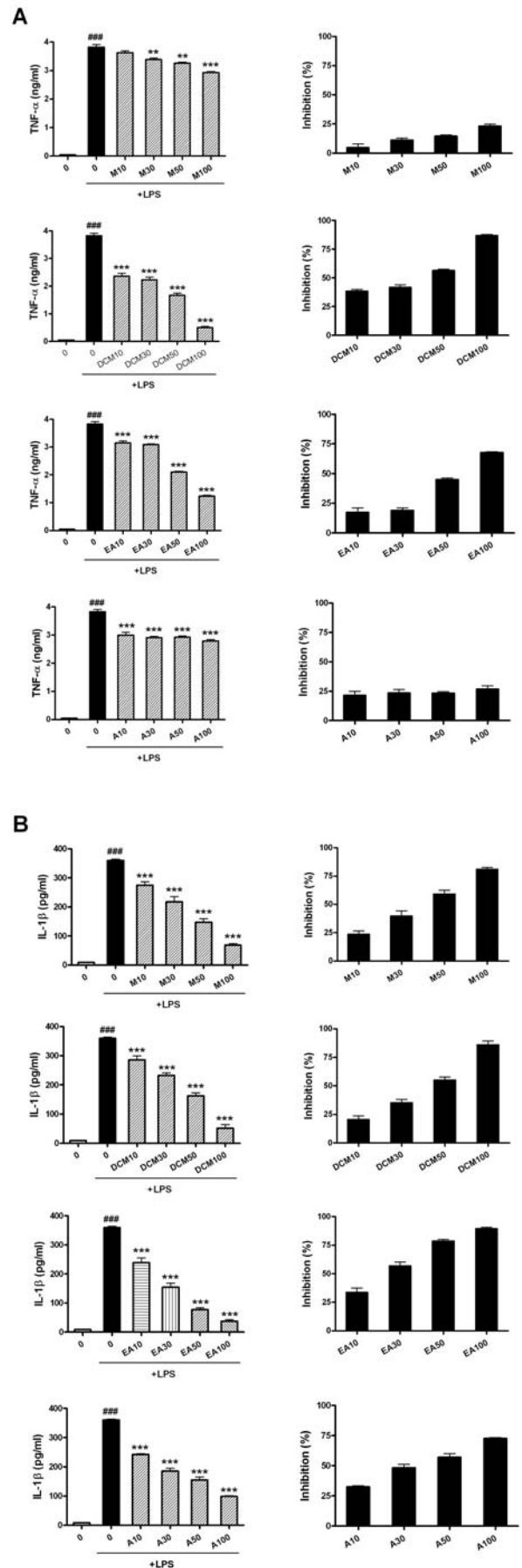


Figure 5. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by RJ extracts. RAW 264.7 cells were preincubated with 100 μ g/ml of RJ extracts for 1 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blotting as described in materials and methods and the density of band was calculated by GelDoc-it Biomaging System. β -actin was used as internal marker for loading variation.

4. LPS로 유도된 염증성 cytokine의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)은 염증을 나타내는 중요한 지표이다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 양제근 분획 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향을 알아보았다. RAW 264.7 세포에 각각의 분획을 농도별로 1시간 동안 전 처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 cytokine의 생성량을 조사한 결과, 각각의 분획의 농도에 의존적으로 생성 억제 효과를 나타내었고, 그 중 DCM과 EA 분획의 효과가 탁월한 것으로 나타났다. TNF- α 의 경우, M, DCM, EA, A 분획의 100 ng/ml의 농도에서 각각 23.2%, 86.8%, 67.7%, 26.7%의 생성억제효과를 보였다 (Fig. 6A). IL-1 β 의 경우에는 M과 DCM 분획의 100 μ g/ml의 농도에서 80.9%, 85.9%의 감소효과를 보였고, EA 분획의 50 μ g/ml의 농도와 100 μ g/ml의 농도에서 78.5%, 89.6%, A 분획의 100 μ g/ml의 농도에서 72.5%의 감소효과를 나타내었다 (Fig. 6B). IL-6는 DCM과 EA 분획에서 우수한 생성억제 효과가 나타났다. 100 μ g/ml의 농도에서 각각 78.3%, 49.1%의 감소효과를 보였다 (Fig. 6C).

이상의 결과로 보아 각각의 양제근 분획층이 유의성 있게 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성을 억제하고, 전체적으로 DCM과 EA 분획의 효과가 탁월함을 확인할 수 있었다.



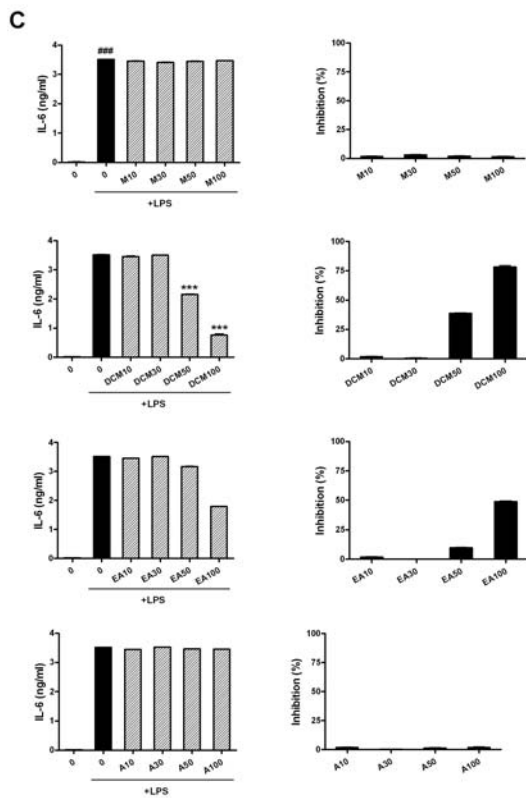


Figure 6. Inhibition of LPS-induced TNF- α , IL-1 β and IL-6 by RJ extracts. RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 30, 50, 100 μ g/ml of RJ extracts for 1 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18 hr. The TNF- α , IL-1 β and IL-6 production was measured by ELISA as described in materials and methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); * : $P < 0.05$; ###, *** : $P < 0.001$.

5. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향

NF- κ B의 핵으로의 translocation은 I κ B- α 의 phosphorylation, ubiquitination과 degradation에 의해서 일어나게 된다¹²⁾. LPS에 의해서 활성화되면 NF- κ B의 subunit중 하나인 p65 단백질이 세포질에서 핵으로 이동하여 전사인자로서 작용하게 된다. 따라서, western blot을 수행하여 양제근 분획이 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향과 I κ B- α 의 phosphorylation에 미치는 영향을 확인해 보았다. RAW 264.7 세포에 양제근 분획을 100 μ g/ml의 농도로 18시간 동안 처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 1시간 동안 처리하여 NF- κ B p65의 핵으로의 translocation에 미치는 영향을 nuclear extract를 이용하여 관찰한 결과, LPS 처리에 의해 translocation이 유도되었고, 이는 양제근 분획 중 DCM과 EA 분획에 의해 저해효과가 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 7A). Cytosol extract에서 I κ B- α 의 phosphorylation에 미치는 영향을 확인해 본 결과, LPS에 의해서 유도되는 p-I κ B- α 가 DCM과 EA 분획에 의해 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7B). 이러한 결과로 보아 양제근 분획 중 DCM과 EA 분획에 의해 NF- κ B의 활성화가 효과적으로 조절됨을 알 수 있었다.

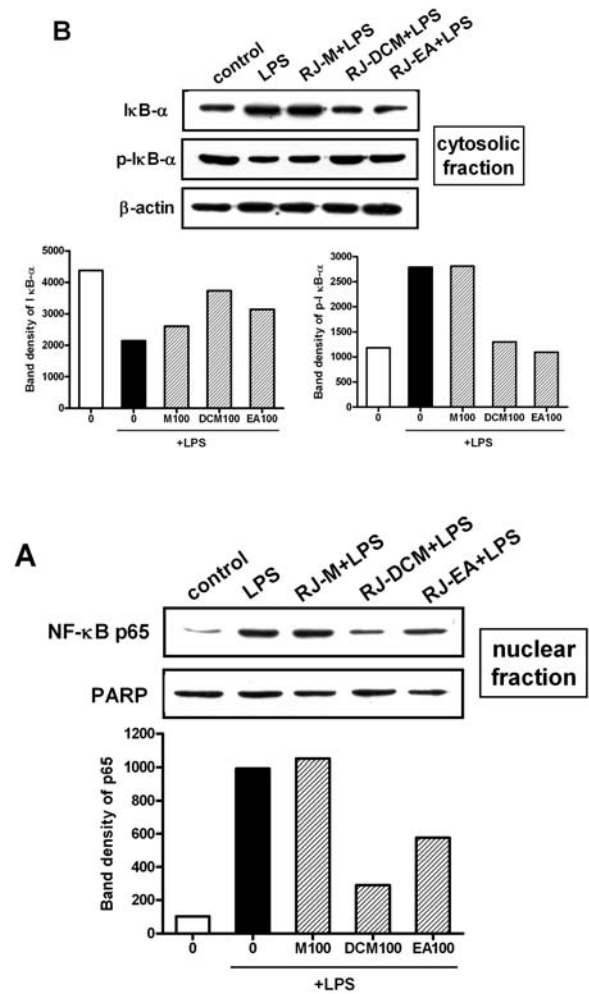


Figure 7. Effect of RJ extracts on LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B p65 and on the phosphorylation of I κ B- α . RAW 264.7 cells were preincubated with 100 μ g/ml of RJ extracts for 18 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 1 hr. The expression levels of NF- κ B p65, I κ B- α and p-I κ B- α were determined by western blotting using nuclear extracts and cytosol extract, respectively. The density of band was calculated by GelDoc-It Bioluminescence Imaging System. PARP and β -actin were used as internal markers for loading variation.

6. Mitogen activated-protein kinases의 활성화에 미치는 영향

양제근 분획이 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 통해 ERK, JNK, p38의 변화를 살펴 보았다. RAW 264.7 세포에 양제근 분획을 100 μ g/ml 농도로 1시간동안 전처리하고 1 μ g/ml의 LPS를 18시간동안 처리한 후 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 8에서 보듯이, LPS 처리에 의해 ERK, JNK, p38의 phosphorylation이 현저히 증가하였던 것이 양제근 분획에 의해 효과적으로 활성화저해 효과가 나타났다. 특히 DCM과 EA 분획에서 탁월한 저해 효과가 확인되었다.

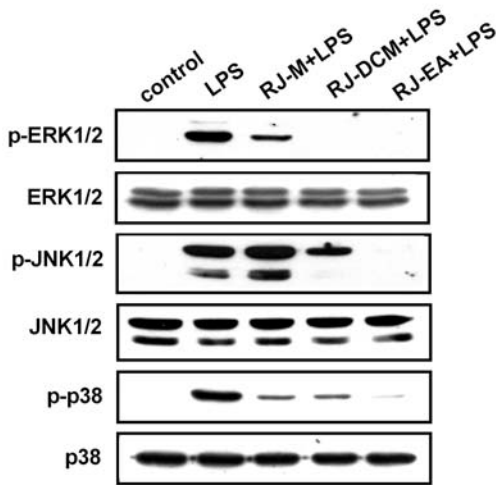


Figure 8. Effect of RJ extracts on LPS-activated MAPKs. RAW 264.7 cells were preincubated with 100 μ g/ml of RJ extracts for 1 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18hr. MAPKs were determined by western blotting.

고찰

염증은 서론에서 언급하였듯이 다양한 질병에 관여하는데, 염증과정에는 산화적 스트레스가 중요한 역할을 담당한다는 사실이 보고되고 있는데, 항산화 효과가 있는 천연물이 염증에도 효과적이라고 보고된 사례가 많다.¹³⁾ 양제근의 경우 항산화 효과가 있음이 보고된 바 있으며⁷⁾ 한의학적으로 보아 苦味, 寒性을 지니는 本草로서 동일 性味를 지니는 다수의 한약재들이 항염증효과가 있다는 사실¹⁴⁻¹⁶⁾로 추정하였을 때 항염증효과가 있을 것이라 기대되었다. 또한 양제근은 chrysophanic acid, emodin, nepodin이 포함되어 있다고 알려져 있는데, emodin의 경우 항염증 효과가 있다고 규명된 바 있어¹⁷⁾ 이를 포함하고 있다고 알려진 한약재 또한 항염증 효과를 가지고 있을 것이라 추정되었다. 따라서 본 연구로 양제근의 항염증효과를 규명하고자 하였다.

대식세포는 선천 면역에서 중요한 역할을 담당하는 세포로서, lipopolysaccharide (LPS), chemical mediator, cytokine 등의 신호를 받으면 활성화되어 tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), chemoattractant protein-1 (MCP-1) 과 같은 각종 inflammatory cytokine들과 chemokine등을 생성하며, 또한 ROS (reactive oxygen species)와 RNS(reactive nitrogen species)를 생성하기도 한다.^{18,19)} 따라서 본 연구에서는 양제근의 항염증 효과를 규명하기 위해 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포를 대상으로 연구를 진행하기로 결정하였다.

연구를 진행하기 위하여 선별한 양제근 1000 g을 재료 및 방법에서 서술한 바대로 분획하였다 (Fig. 1). 이후 각각의 분획물들을 모두 동결건조하여 실험에 시료로 사용하였다.

먼저 각 분획이 RAW 264.7 세포에 나타내는 독성을 측정하기 위하여 MTS assay를 실시한 결과, 모든 분획층에서 100 μ g/ml의 농도에서 80% 이상의 생존률을 나타냈다. 따라서 이후 진행되는 실험은 해당 농도 이하로 진행하였다.

上述한 바와 같이 대식세포는 염증이 유발되었을 때, RNS인 Nitric oxide (NO)를 생성한다. ROS와 RNS는 낮은 농도에서는 세포내에서 세포간 전달에 필수적인 매개체의 역할을 하며, 외부 미생물이 침입할 때는 면역세포인 대식세포나 호중구, 림프구 등에서 ROS, RNS를 고농도로 생성하여 미생물을 파괴하는 효과를 나타낸다. 하지만 이러한 긍정적인 효과에도 불구하고, 과생성된 ROS와 RNS는 또한 세포의 DNA, 단백질, 지질 등에 손상을 일으켜 각종 질병의 원인이 된다.²⁰⁾ 특히 NO는 단백질, 핵산과 반응하여 대식세포의 apoptosis를 유발한다는 보고도 있다.²¹⁾ 따라서 염증이 일어난 상태에서 특정 약물을 투여하여 대식세포의 NO생성을 억제할 수 있다면 염증의 증상을 경감시킬 수 있다. 양제근이 해당 능력이 있는지를 평가하기 위하여 Griess Reagent를 사용하여 실험을 실시하였다. 염증을 유발시키기 위해서 LPS를 사용하였는데, LPS는 그람 음성균의 세포벽에 존재하는 성분으로써, 대식세포의 toll-like receptor 4 (TLR4)와 상호작용하는데, 해당 receptor를 거친 signal은 NF- κ B pathway를 거쳐 염증반응을 일으키는 인자들인 inflammatory cytokine과 COX-2, iNOS 등의 gene expression을 일으키게 된다.²²⁾ 실험결과, 양제근의 각 분획은 LPS로 유발된 Nitric oxide를 효과적으로 억제하였으며, 그 억제능력은 EA층에서 가장 탁월함이 판명되었다.

Prostaglandin E₂(PGE₂)의 과생성은 염증, Alzheimer's disease, 고혈압, 심혈관질환, 암의 형성의 병리적 기전에 관여한다는 보고가 있다.²³⁾ 따라서 항염증 작용이 있는 신약 및 천연물을 연구할 시 PGE₂의 생성을 억제하는 효과를 검증할 필요가 있다. 양제근의 각 분획을 대상으로 PGE₂를 억제하는 효과를 실험한 결과 DCM 분획층에서 유효하게 감소하는 결과를 얻을 수 있었다.

iNOS와 COX-2는 LPS의 자극에 의해 대식세포에서 발현되면 각각 NO와 PGE₂를 생성한다고 보고되어 있다.²⁴⁾ 따라서 양제근의 항염증효과를 규명하기 위해 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 효과를 western blot을 이용하여 조사하였다 (Fig. 5). 그 결과 iNOS의 경우 모든 층에서 통계적으로 유효하게 감소되는 결과를 보였고, COX-2의 경우 메탄올 분획층에서는 발현이 효과적으로 감소되지 못했고 DCM과 EA층에서는 유의적으로 감소하는 결과를 나타냈다. 이러한 결과로 추정해볼 때, 양제근은 iNOS의 발현과 NO의 생성을 감소시켜 염증을 줄이는 경향성이 크다고 생각된다. 또한 inflammatory cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6도 효과적으로 감소하는 결과를 나타냈다.

이러한 결과를 토대로 양제근이 항염증 효과를 나타내는 기전을 연구하기 위하여 NF- κ B와 MAPKs의 발현을 western blot으로 실험하였다. NF- κ B와 MAPKs는 세포내에서 다양한 기전에 관여하는데, NF- κ B의 경우 transcription factor로서 염증과정에서 cytokine이나 COX, iNOS의 발현을 조절하는 역할을 하며²⁵⁻²⁷⁾ Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 세포의 증식, 분화, 발생, 세포사멸 등 다양한 생물학적 반응에 관여하는 효소로서 중요한 기능을 한다.^{28,29)} 양제근은 cytosol의 I κ B- α 의 phosphorylation을 효과적으로 억제하였으며, degradation을 감소시켰다. 특히 DCM층과 EA층의 효과가 뛰어났다. MAPKs의 경우에도 ERK, JNK, p38을 효과적으

로 억제하였다.

상술한 실험결과로 미루어 볼 때, 양제근의 추출물은 항염증 효과를 가지고 있음을 알 수 있었으며, 그 기전은 NF- κ B와 MAPKs과 관계가 있음을 증명하였다. 특히 DCM과 EA 분획층에서 가장 뛰어난 항염증 효과를 나타내어 향후 연구와 신약개발에는 양제근의 해당 분획층을 사용함이 효과적일 것으로 생각되며, 심화된 연구를 통하여 양제근 분획층의 염증 치료제로서의 가능성을 탐색하는 것이 필요하다고 사료된다.

결론

마우스 대식세포에서 양제근 methanol, dichloromethane, ethyl acetate 분획의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도되는 염증인자인 NO, PGE₂와 iNOS, COX-2의 발현과 염증성 cytokines의 생성에 대하여 양제근 분획이 해당 염증인자와 cytokine을 현저히 감소시켰다.

2. 양제근 분획이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 확인해 본 결과, DCM과 EA 분획이 I κ B- α 의 phosphorylation을 억제하는 기전을 통해서 NF- κ B 활성을 저해한다는 사실을 알 수 있었다.

3. 양제근 분획이 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, LPS 처리에 의해 활성화되는 ERK, JNK, p38이 DCM과 EA 분획에 의해 효과적으로 저해되었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 양제근 추출물은 뛰어난 항염증 효과를 가지고 있으며, 특히 DCM과 EA 분획층에서 탁월한 효과를 보였다. 향후 심화된 연구를 통하여 양제근 분획층의 염증 치료제로서의 가능성을 탐색하는 것이 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2012년 동국대학교 논문 게재 장려금 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

- Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 ; 390(3) : 803-8.
- College of Korean medicine, Professors of Herbology, collaborator. *Herbology*. Younglimsa,

- Seoul. 2000 ; 398-9
- Jang DS, Kim JM, Kim JH, Kim JS. 24-nor-Ursane type triterpenoids from the stems of *Rumex japonicus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2005 ; 53(12) : 1594-6.
- Jiang L, Zhang S, Xuan L. Oxanthrone C-glycosides and epoxynaphthoquinol from the roots of *Rumex japonicus*. *Phytochemistry*. 2007 ; 68(19) : 2444-9.
- Chen M, Wang D, Feng Y, Yang W. A new anthraquinone from roots of *Rumex japonicus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009 ; 34(17) : 2194-6.
- Cho KH, Kim HS. A Study of Antifungal Activity with *Rumex japonicus* Houttuyn. *The Korean Journal of dermaology*. 1980 ; 18(5) : 383-90.
- Park YK. Studies on the Anti-oxidative effects of *Rumexis Radix*. *Kor J Herbology*. 2003 ; 18(4) : 269-77.
- Ahn JY, Im LR, Kim JH, Park JH, Kim DK, Lee YM. Effects of *Rumecis Radix* Water Extract on Development of Atopic Dermatitis in BALB/c Mice. *Kor J Pharmacogn*. 2009 ; 40(3) : 218-23.
- Lee HS, Kim SK, Han JB, Choi HM, Park JH, Kim EC, Choi MS, An HJ, Um JY, Kim HM, Min BI. Inhibitory effects of *Rumex japonicus* Houtt. on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Br J Dermatol*. 2006 ; 155(1) : 33-8.
- Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci*. 2008 ; 97(7) : 2745-56.
- Wang S, Chen Y, He D, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol*. 2007 ; 114(3) : 458-62.
- Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci*. 2005 ; 118(Pt 20) : 4589-92.
- Kim MM, Kim SK. Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. *Food Chem Toxicol*. 2010 ; 48(10) : 2925-33.
- Park EK, Rhee HI, Jung HS, Ju SM, Lee YA, Lee SH, Hong SJ, Yang HI, Yoo MC, Kim KS. Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis* in animal models of inflammation. *Phytother Res*. 2007 ; 21(8) : 746-50.
- Kim EH, Shim B, Kang S, Jeong G, Lee JS, Yu

- YB, Chun M. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J Ethnopharmacol*. 2009 ; 126(2) : 320-31.
16. Hwang SM, Lee YJ, Yoon JJ, Lee SM, Kang DG, Lee HS. *Gardenia jasminoides* inhibits tumor necrosis factor- α -induced vascular inflammation in endothelial cells. *Phytother Res*. 2010 ; 24(2) : 214-9.
 17. Gao Q, Wang F, Guo S, Li J, Zhu B, Cheng J, Jin Y, Li B, Wang H, Shi S, Gao Q, Zhang Z, Cao W, Tian Y. Sonodynamic effect of an anti-inflammatory agent-emodin on macrophages. *Ultrasound Med Biol*. 2011 ; 37(9) : 1478-85.
 18. Abdelwahab SI, Hassan LE, Sirat HM, Yagi SM, Koko WS, Mohan S, Taha MM, Ahmad S, Chuen CS, Narrima P, Rais MM, Hadi AH. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia*. 2011 ; 82(8) : 1190-7.
 19. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 ; 23(4) : 656-60.
 20. Sporn MB, Liby KT, Yore MM, Fu L, Lopchuk JM, Gribble GW. New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J Nat Prod*. 2011 ; 74(3) : 537-45.
 21. Lee KC, Chang HH, Chung YH, Lee TY. Andrographolide acts as an anti-inflammatory agent in LPS-stimulated RAW264,7 macrophages by inhibiting STAT3-mediated suppression of the NF- κ B pathway. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 135(3) : 678-84.
 22. Jedinak A, Dudhgaonkar S, Wu QL, Simon J, Sliva D. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF- κ B and AP-1 signaling. *Nutr J*. 2011 ; 10 : 52.
 23. Lim C, Lee M, Park EJ, Cho R, Park HJ, Lee SJ, Cho H, Lee SK, Kim S. Sulfonamide derivatives of styrylheterocycles as a potent inhibitor of COX-2-mediated prostaglandin E2 production. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 ; 20(23) : 6938-41.
 24. Himaya SW, Ryu B, Qian ZJ, Kim SK. Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010 ; 30(1) : 68-75.
 25. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004 ; 25(6) : 280-8.
 26. Hosoda H, Tamura H, Kida S, Nagaoka I. Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264,7 macrophage-like cells. *Life Sci*. 2011 ; 89(3-4) : 115-22.
 27. Cho YC, Lee SH, Yoon G, Kim HS, Na JY, Choi HJ, Cho CW, Cheon SH, Kang BY. Licochalcone E reduces chronic allergic contact dermatitis and inhibits IL-12p40 production through down-regulation of NF- κ B. *Int Immunopharmacol*. 2010 ; 10(9) : 1119-26.
 28. Chen SR, Xu XZ, Wang YH, Chen JW, Xu SW, Gu LQ, Liu PQ. Icariin derivative inhibits inflammation through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B pathways. *Biol Pharm Bull*. 2010 ; 33(8) : 1307-13.
 29. Tang S, Shen XY, Huang HQ, Xu SW, Yu Y, Zhou CH, Chen SR, Le K, Wang YH, Liu PQ. Cryptotanshinone suppressed inflammatory cytokines secretion in RAW264,7 macrophages through inhibition of the NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Inflammation*. 2011 ; 34(2) : 111-8.