

LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 염증반응에서 紫草의 항염증 효과

최선복^{1#}, 배기상², 조일주³, 박경철¹, 서승희³, 김동구³, 신준연³,
곽태신¹, 이정현¹, 이금산¹, 박성주^{1,2,3}, 송호준^{1*}

1 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 원광대학교 한방체액조절연구센터,
3 : 원광대학교 한약자원전문대학원

The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide - induced inflammatory response in RAW 264.7 cells

Sun-Bok Choi^{1#}, Gi-Sang Bae², Il-Joo Jo³, Kyoung-Chel Park¹,
Seung-Hee Seo³, Dong-Goo Kim³, Joon-Yeon Shin³, Tae-Sin Gwak¹, Jung-Hyun Lee¹,
Guem-San Lee¹, Sung-Joo Park^{1,2,3}, Ho-Joon Song^{1*}

1 : Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
2 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University
3 : Dept. of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine Wonkwang University

ABSTRACT

Objective : *Lithospermum Erythrorhizon* (LE) has been used as an anti-bacterial and anti-inflammatory agent. However, it is unclear that LE aqueous extract could show the anti-inflammatory effects in RAW 264.7 cells. The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of aqueous extract from LE on lipopolysaccharide (LPS) - induced inflammatory response.

Methods : To measure out the cytotoxicity of LE, we performed the MTT assay. To evaluate the anti-inflammatory effects of LE, we examined the inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) and pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin, (IL)-1 β and (IL)-6) on RAW 264.7 cells. We also examined molecular mechanisms such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation by western blot.

Results : Aqueous Extract from LE itself did not have any cytotoxic effect in RAW 264.7 cells. Aqueous extract from LE inhibited LPS-induced productions of inflammatory mediators such as NO, PGE₂, and pro-inflammatory cytokines including TNF- α , IL-1 β and IL-6 in RAW 264.7 cells. In addition, LE inhibited the phosphorylation of p38 kinases (p38), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), and NF- κ B activation in RAW 264.7 cells.

Conclusion : LE down-regulated LPS-induced production of inflammatory mediators through the inhibition of p38, JNK and NF- κ B activation. Taken together, these results could provide the evidence for the anti-inflammatory effects of LE. Therefore, LE may be a novel target in the management of inflammation and help to support a potential strategy for prevention and therapy of inflammatory diseases.

Key words : Lipopolysaccharide (LPS), *Lithospermum Erythrorhizon* (LE), Inflammation, mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

* 교신저자 : 송호준, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 063-850-6844 · E-mail : songhj@wonkwang.ac.kr
제1저자 : 최선복, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 063-850-6837 · E-mail : agraesb@lycos.co.kr
· 접수 : 2013년 2월 15일 · 수정 : 2013년 3월 7일 · 채택 : 2013년 3월 21일

서론

염증은 어떤 자극에 대한 생체조직의 방어반응으로 하나로 작용할 뿐만 아니라, 많은 병리 생리학적인 조건에서 중요한 역할을 한다. 염증이 진행되는 동안 대식세포의 활성화가 과도하게 일어나게 되면 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유도함으로써, 류마티스 관절염, 죽상 동맥경화증, 패혈증과 같은 질환을 일으키기도 한다^{1,2)}.

그람 음성균의 외막성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포의 감염초기에 반응하고 숙주 방어에 중추적인 역할을 하나, 과도한 LPS 자극은 대식세포에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)- 1β 및 IL-6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시키며, nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증매개물질을 분비시킨다^{3,4)}. NO는 대식세포가 활성화되면 inducible NO synthase (iNOS)로부터 생산되며 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할도 하지만, 과도한 생성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상을 일으키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 또한, COX-2는 아라키돈산으로부터 PGE₂가 합성되고 조직손상부위에서 합성된 PGE₂는 통증을 유발하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. Cytokine의 분비는 신호전달경로에서 extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), p38 kinases (p38), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases (MARKs)와 nuclear factor kappa B (NF- κ B)에 의해 조절되어 인산화가 활성화가 일어나게 된다. NF- κ B는 활성화 되면 결합해 있던 inhibitory kappa B α (I κ -B α)가 분해되면서 세포질에서 핵 내로 이동하여 cytokine 발현을 촉진시키는 전사인자로서 작용한다^{7,8)}.

紫草는(생약명 : Lithospermi Radix) 지치과 Boraginaceae에 속하는 다년생 초본인 지치 (Lithospermum erythrorhizon)의 根으로서, 紫根, 紫芝, 紫丹 등의 여러 이름으로 불리어 지고 있다. 《神農本草經》에 “主心腹邪氣, 五疸, 補中益氣, 利九竅, 通水道”라고 처음 기재된 이래, 涼血活血, 解毒透疹 효능으로 血熱毒盛, 斑疹紫黑, 癩疹不遂, 瘡瘍, 濕疹 등을 치료하는데 응용되어 지고 있다^{9,10)}. 현재 紫草에 대한 연구로는 아토피 피부염에 관련 효과^{11,12)}, 항알러지 염증반응에 대한 효과¹³⁾, Galactosamine으로 유도된 간손상에 미치는 보호 효과¹⁴⁾ 등 여러 연구들이 보고되고 있다. 이와 같이 최근 紫草에 대한 다양한 연구가 보고되었으나 紫草 물 추출물이 LPS로 유도한 RAW 264.7 cell에서 항염증반응과 그 기전에 대한 연구는 진행되지 않았다.

이에 본 연구는 紫草의 RAW 264.7 cell에서 항염증작용 및 기전을 밝히고자 자초 물 추출물을 LPS로 유도하여 염증 매개물질인 NO, PGE₂, 전 염증성 cytokine의 발현을 실험하였고, 이에 따른 기전을 조사하기 위해 MAPKs과 NF- κ B의 활성화를 조사하여 염증반응의 억제에 대한 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 紫草는 음니허브(영천, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 紫草 추출물을 얻기 위하여 물 1l에 紫草 100 g을 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 액을 여과한 후 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다. 동결 건조시킨 후 나온 가루는 15.3 g으로 수율은 15.3 %였다.

2) 시약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI Medium 1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 시약 중 Chloroform, TRI-zol, Sodium dodesylsulfate (SDS), Acrylamide, Tris-HCL, LPS 등은 SIGMA (St. Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK는 Cell Signaling (MA, USA)사에서 구입하였고, Anti-I κ -B α 는 Santa Cruz (CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 세포주

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받았다. 세포배양을 위해 10% Fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2. 방법

1) MTT 분석

RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)용액을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 /ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 LE를 처리하였다. 24시간동안 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, spectrophotometer (MD, USA)를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처리도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다. [즉, viability(%) = $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$]

2) 일산화질소(Nitric Oxide) 농도의 측정

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 2×10^5 의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 SC를 처리하였다. LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 μ l의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrophotometer (MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

3) PGE₂ 분석

PGE₂ 수준은 manufacture's protocol (Stressgen Biotechnologies, MI, USA)에 따라 immunoassay kits로 측정되었다.

4) Cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 세포에 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 알아보기 위하여, LPS를 자극하기 전 LE 추출물을 1시간동안 전처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질은 세포 상층액에서 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 정량하였다. ELISA는 BD pharmingen (CA, USA)에서 Mouse ELISA kit for TNF- α , IL-1 β , IL-6를 구입하여 시행하였다.

5) RNA 추출

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

6) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

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

30cycle 반복하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

iNOS : 5'-AGC CCA ACA ATA CAA ATG ACC CTA-3' (forward)
5'-TTC CTG TTG TTT CTA TTT CCT TTGT-3' (reverse)
COX-2 : 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3' (forward)
5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3' (reverse)
 β -actin : 5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3' (forward)
5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3' (reverse)

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

7) 실시간 정량적 역전사 중합 효소 연쇄반응 (Quantitative RT-PCR)

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

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

8) Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 LE (1 mg/ml)를 전처리 하고 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 0, 15, 30, 60 분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 cell을 획득하여 원심분리 (5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + protease inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2 시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 NF- κ B를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

9) 통계처리

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

결 과

1. 紫草 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

LE 추출물이 세포 생존율에 영향을 주는지를 검사하기 위해서 RAW 264.7 세포에 LE 추출물을 처리하여 MTT 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 LE는 0.1–1 mg/ml 농도에서 80% 이상의 생존율을 보이며, 세포 독성에 유의성 있는 영향을 미치지 않았다. 이에 0.1–1mg/ml를 이 연구의 유효 농도로 설정하였다 (Fig. 1).

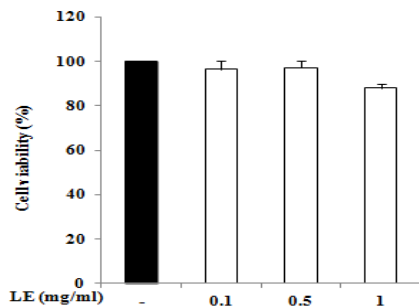


Fig. 1. Effect LE extract on cytotoxicity in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with LE extract as indicated concentration. After 24h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment.

2. LPS로 유도한 紫草 추출물이 NO 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향

iNOS에 의한 NO의 과도한 생성과 COX-2에 의한 PGE₂의 생성은 염증반응의 특징으로서, LPS로 유도한 LE 추출물이 RAW 264.7 세포에서 염증반응의 지표인 iNOS 및 COX-2 생성에 미치는 영향을 알아보려고 RT-PCR의 방법으로 분석하였다. RAW 264.7 세포에 LE 추출물을 다양한 농도별로 1시간 동안 전 처리한 후 LPS를 자극하였다. LE 추출물을 전 처리한 군에서는 iNOS 발현을 mRNA 수준에서 억제하였으며 (Fig. 2A), Griess 반응을 통한 세포 상층액의 NO 생성을 측정할 결과, iNOS 측정 결과와 일치하게 LE 전 처리군에서 LPS로 유도한 NO 생성을 억제하였다 (Fig. 2B). 또한, LE 전 처리군에서 염증 매개물질인 COX-2의 발현과 PGE₂의 생성을 억제하였다 (Fig. 2C and D).

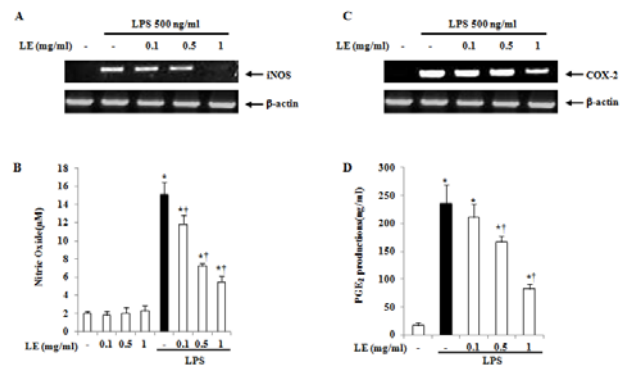


Fig. 2. Effects of LE on LPS-induced inflammatory mediators. The cells were pre-treated with LE extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. The effects of LE on LPS-induced (A) iNOS mRNA expression, (B) NO production, (C) COX-2 mRNA expression, and (D) PGE₂ production were measured. Data are means of three independent experiment. *, P < 0.05 vs. control; †, P < 0.05 vs. LPS treatment alone.

3. LPS로 유도한 紫草 추출물이 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성에 미치는 영향

LPS로 유도한 전염증성 cytokine의 생성에 대한 LE 추출물의 효과를 조사하기 위해, ELISA를 이용하여 측정하였다. LE 추출물을 1시간 전처리 한 후 LPS로 자극하였다. 24시간 후 전염증성 cytokine의 발현을 측정할 결과, LE 처리군은 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성을 억제하였다. (Fig. 3).

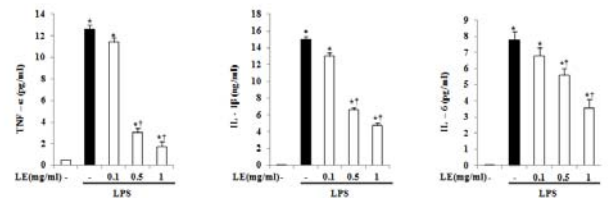


Fig. 3. Effect of LE extract on the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with LE extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. Data are means of three independent experiment. *, P < 0.05 vs. control; †, P < 0.05 vs. LPS treatment alone.

4. 紫草 추출물이 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 수준에서 미치는 영향

LE 물 추출물이 RAW 264.7 세포에서 전 염증성 cytokine들을 단백질 수준에서 억제하였음에 착안하여 (Fig. 3), mRNA 수준에서도 전 염증성 cytokine의 활성을 억제하는지 알아보기 위해 LE를 전처리한 후 LPS로 자극하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA를 정량적 중합효소 반응 방법으로 측정을 하였다. 그 결과 LE 추출물을 전 처리한 군에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현이 억제되었다 (Fig. 4).

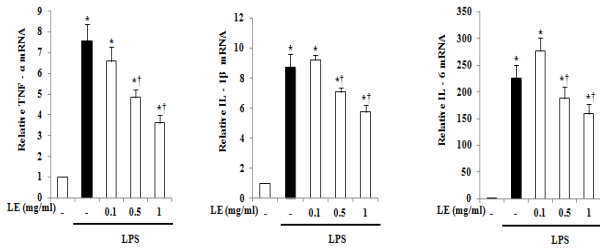


Fig. 4. Effect of LE extract on the mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 on RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with LE extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA transcription level was measured by real time RT-PCR. Data are means of three independent experiment. *, P < 0.05 vs. control; †, P < 0.05 vs. LPS treatment alone.

5. 紫草 추출물이 MAPKs 및 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포들은 다양한 신호전달물질에 의해 cytokine들을 분비하게 되는데, 대표적인 경로로 MAPKs와 NF- κ B가 있다. LE 추출물 1 mg/ml의 농도로 전 처리한 후 LPS를 시간대별로 자극하였다. 이를 분석한 결과 LE 추출물은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 p38, JNK가 인산화 되었고, ERK1/2는 인산화를 억제하지 못하였다. 그리고 NF- κ B의 활성화 지표인 I κ -B α 의 분해를 조사한 결과, LE 추출물이 LPS에 의한 I κ -B α 의 분해를 억제할 수 있었다 (Fig. 5).

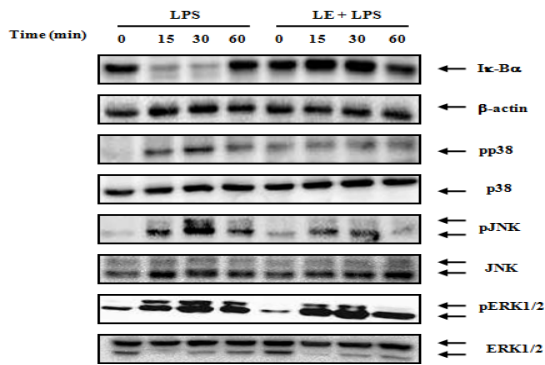


Fig. 5. Effect of LE extract on MAPKs activation and I κ -B α degradation in LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. The cell were pretreated with LE (1 mg/ml) for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods. Representative western blots of at least three separate experiments are shown.

고찰

紫草는 《名醫別錄》¹⁵⁾에 “療腹腫脹滿痛”以閤膏, 療小兒瘡及面皸.”이라고 수록되어 있고, 《本草綱目》¹⁶⁾에서는 “其功長于涼血活血, 利大腸, 故痘疹欲出未出, 血熱毒盛, 大便閉澀者宜用治之, 已出而紫黑便閉者也可用.”라고 하였다. 이러한 紫草는 性은 寒하고, 味는 甘하며 淸熱涼血, 活血,

解毒透疹의 효능이 있어 溫病血熱毒盛, 瘡瘍, 濕疹, 癩疹不透 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다. 이미 여러 연구에서 紫草의 효능이 소염, 항암 등 촉진효과가 보고되어 있다^{17,18)}. 이상의 선행연구를 살펴본 바 紫草가 염증성 면역반응에서도 유효한 효과를 나타낼 것으로 사료되어 본 실험의 약물로 선택하였다. 紫草에 관한 문헌적, 약리학적으로 여러 연구들이 진행되었을 뿐만 아니라, 최근에는 紫草 메탄올 추출물의 항염증 효과에 대한 연구가 보고 되어졌다¹⁹⁾. 그러나 紫草 물 추출물의 항염증 효과에 대해서는 아직 알려진 바가 없어 이에 본 연구에서는 紫草 물 추출물을 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 염증매개물질들의 생성증가에 미치는 영향을 조사하고, 그의 다른 기전을 밝혀냄으로써 자초의 항염증 효과를 살펴 보고자 하였다.

염증 반응이 일어나게 되면 과량의 NO, PGE₂ 등의 염증매개인자들이 생성된다. NO는 NO 합성효소에 의해 L-아르기닌으로부터 NO를 생산한다²⁰⁾. LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 과량의 NO를 생성하게 되어 대식세포의 종양, 박테리아 파괴능력과 같은 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다^{21,22)}. 또한 COX-2에 의해 형성된 PGE₂는 염증반응에 중요한 역할을 하며, 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다²³⁾. 이러한 염증매개인자들은 다양한 염증질환들을 포함하는 병리학적 상태에 관여하는데 이상의 결과들은 紫草 물 추출물이 iNOS발현을 억제함으로써 NO생성을 억제한다는 것을 설명한다. 또한 紫草 메탄올 추출물¹⁹⁾ 결과에서도 iNOS발현을 100 μ g/ml에서 유의성 있게 억제하였으나, 물 추출물에서 메탄올 추출물 보다 농도인 1 mg/kg에서 유의성 있게 억제함을 보여주고 있다. 이는 메탄올 추출물에서 다양한 항염효과를 나타내는 성분이 많이 추출되는 것으로 생각된다. 하지만, 자초는 일반적으로 처방에 배합되어 열수로 추출하여 복용하기 때문에 메탄올 추출물보다 물 추출물이 더 의미 있다고 생각된다. 또한, COX-2발현을 억제함으로써 PGE₂생성을 억제함을 설명한다.

염증을 나타내는 중요한 지표인 전염증성 사이토카인으로 알려진 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성은 또 다른 다양한 염증매개체들의 유도, 면역반응의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. 紫草 물 추출물을 전처리한 후 LPS를 처리한 군에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 단백질 단계 및 mRNA 수준에서 유의성 있게 억제하는 효과를 보였다. 메탄올 추출물 경우¹⁹⁾, 모두 사이토카인 생성을 억제하였다. 그러나 TNF- α 의 경우 물 추출물에서 보다 억제함을 보여주었고, IL-1 β 및 IL-6의 경우에는 메탄올 추출물에서 사이토카인 생성을 보다 억제함을 확인하였다.

LPS와 같은 자극으로 인해 염증반응이 시작되면 세포내 신호전달에 관여하는 MAPKs는 활성화가 일어나 핵 안으로 이동하여 활성인자를 인산화하고 cytokine 생성에 관여한다²⁴⁾. 현재까지 잘 알려진 MAPK로는 ERK 1/2, p38, JNK이 있다^{25,26)}. NF- κ B는 염증 반응, 면역 반응 등에 다양한 유전자 발현에 관여하는 전사 인자이다. 정상적으로는 NF- κ B는 세포질에서 inhibitory kappaB (I κ B) 단백질과 결합되어 있다. NF- κ B가 LPS에 의해 자극을 받게 되면, I κ -B α 가 인산화 되고, NF- κ B와 분해가 되면서 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 COX-2, iNOS, cytokine 등 여러 염증성 매개체의 유전자 발현을 유도한다²⁷⁾. 그리하여 NF- κ B 활성화는

I κ -B α 의 분해를 통해 알아낼 수 있다. 따라서, LPS를 통해 염증 반응이 일어나면 I κ -B α 의 분해가 시작되고 I κ -B α 의 분해를 막으면 NF- κ B의 활성도 억제된다고 볼 수 있다. 紫草 물 추출물은 본 연구에서 LPS로 유도된 p38, JNK의 인산화와 I κ -B α 의 분해를 억제 하였다. 그러나 ERK1/2의 인산화는 억제하지 못하였다. 메탄올 추출물에서도¹⁹⁾, 이와 같은 기전을 억제 하였다. 따라서 紫草는 이 MAPK family인 p38과 JNK의 신호전달 억제와 I κ -B α 분해를 억제하여 대식세포에서 항염증 작용을 한다고 생각된다. 또한 MAPKs이나 NF- κ B의 활성 조절이 될 경우 급, 만성 염증질환의 치료에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 紫草는 p38, JNK의 인산화를 억제하고 NF- κ B의 활성 억제를 통해 NO와 전염증성 cytokine의 생산을 억제함을 확인 할 수 있었다. 또한, 紫草의 추출 용매에 따라 이전 연구와 그 효능을 비교한 바, 모두 항염증 효과를 보여주었다. 최근에는 실험 연구에서 메탄올 추출법으로 유효성분을 많이 추출하여 항염증, 항암 등의 연구로 많이 사용되고 있으나, 본 연구에서는 물 추출물에서도 항염증의 효과를 보였다. 지금까지도 거의 대부분의 한약재는 물로 전탕한 액을 복용을 하였으므로 한의학적으로 물 추출물에 대한 연구는 의의가 있다고 사료된다. 결론적으로, 紫草의 항염증효과는 염증성 질환의 예방과 치료에 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 앞으로 紫草의 in vivo 실험 및 추출 방법에 따른 성분 분석에 대하여 추가적인 실험들도 함께 이루어져 항염증 작용에 이해를 도울 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 紫草 물 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 紫草 추출물은 세포독성을 거의 나타내지 않았다.
2. 紫草 추출물은 농도 의존적으로 NO 및 PGE₂ 생성을 억제하였다.
3. 紫草 추출물은 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 cytokine의 생성을 단백질 수준과 mRNA 수준에서 억제하였다.
4. 紫草 추출물은 p38, JNK의 인산화를 억제하였고, 또한 I κ -B α 의 분해를 억제하였다.

이상의 결과는 紫草 물 추출물이 RAW 264.7 세포에 작용하여 NO 및 PGE₂의 생성, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생산을 억제하였으며, MAPKs 중 p38, JNK의 인산화와 I κ -B α 의 분해를 억제하였다. 따라서 청열해독의 효과를 가진 紫草는 항염증 치료에 응용할 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행 되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Behrens, EM, Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? *Autoimmunity Reviews*, 2008 ; 305-8.
2. Lopez-Bojorquez LN, Dehesa AZ, Reyes-Teran G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Arch Med Res*, 2004 ; 35 : 465-79.
3. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996 ; 211 : 32-24.
4. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Antiinflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Kor J Herbol*, 2009 ; 24 : 47-39.
5. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide : physiology pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*, 1991 ; 21 : 361-74.
6. Rocca, B, FitzGerald, GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol*, 2002 ; 2 : 603-30.
7. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol*, 2004 ; 7 : 25-32.
8. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*, 2004 ; 382 : 393-409.
9. Cho MH, Park YS, Hahn TR. Propionylshikonin from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* cultivated in Korea. *J Agric Food Chem*, 1999 ; 47 : 4117-20.
10. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy*. seoul : yonglin publisher, 2010 : 402-3.
11. Ju JH, Cho HH, Lee YS. Progress on Phytochemical and Atopic Dermatitis related Study of the Root of *Lithospermum erythrorhizon*. *Korean J Pharmacogn*, 2010 ; 41(2) : 73-88.
12. Kim YR, Cho SY, Seo DB, Kim SH, Lee SJ, Cho YH. Effects of Oral Intake of Gromwell Water Fraction on Ceramides Content and the Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *korean j. food sci, technol*, 2009 ; 41(5) : 547-51.
13. Kim SH, Lee JY, Kim DK. Effects of *Mori Folium*, *Arctii Fructus*, *Lithospermum Erythrorhizon* on the Anti-allergic Response. *J Kyung Hee Univ Med Cent*, 2005 ; 21(1) : 71-9.
14. Lee HH, Yoon JS, Song SY. Protective Effect of

- Lithospermum erythrorhizon oh Galactosamine Induced Liver Injury. Korean J. Microscopy. 2010 ; 40(1) : 29-35.
15. Chinese Treditional medicine management agency 《chinese herbal medicine》. commission. 1th edition vol 6. shanghai : Chinese Treditional medicine management agency 《chinese herbal medicine》 commission, 1999 : 525-31.
 16. Gao XM. Chinese traditional medicine. 1st rev. ed, beijing : China Press of Traditional Chinese Medicine, 2002 : 171-2.
 17. Seetharaman R, Park DJ, Park C, Park SJ, Park YH, Kim ST, Choi YH, Choi YW. In vitro and in vivo anticancer effects of Lithospermum erythrorhizon extract on B16F10 murine melanoma. J Ethnopharmacol, 2012 ; 144 : 335-45.
 18. Lee JH, Jung KM, Bae IH, Cho SY, Seo DB, Lee SJ, Park YH, Lim KM. Anti - inflammatory and barrier protecting effect of Lithospermum erythrorhizon extracts in chronic oxazolone-induced murine atopic dermatitis. JDS. 2009 ; 56 : 58-73.
 19. Han KY, Kwon TH, Lee TH, Lee SJ, Kim SH, Kim JY. Suppressive effects of Lithospermum erythrorhizon extracts on lipopolysacchride-induced activation of AP-1 and NF- κ B via mitogen-activated protein kinase pathways in mouse macrophage cells. BMB reports, 2008 : 328-33.
 20. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. J Infect Dis, 1999 ; 179 : 939-44.
 21. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991 ; 43 : 109-42.
 22. MaCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JI, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. J Exp Med, 1993 ; 178 : 749-54.
 23. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Michell A. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. J Environ Pathol Tox Oncol, 2002 ; 21 : 93-101.
 24. Oh CH translation. simple immunology. 3nd rev. ed, seoul : Medical korea, 2006 : 161-200.
 25. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. Trends Biochem Sci, 2000 ; 25 : 7-9.
 26. Celec P. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine the nest generation. Biomed Pharmacother, 2004 ; 58 : 365-71.
 27. Gang A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. Leukemia, 2002 ; 16(6) : 1053-68.