

何首烏 물추출물이 LPS로 유발된 RAW 264.7 Cells의 염증인자에 미치는 영향

정성룡^{1#}, 한효상², 이영종^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Effect of Polygoni Multiflori Radix Water Extract on the Proinflammatory Mediators in RAW 264.7 Cells Induced by LPS

Seong-Yong Jeong^{1#}, Hyo-Sang Han², Young-Jong Lee^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

2 : Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University Geumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effects of Polygoni Multiflori Radix Water Extract (PM) on the production of inflammatory mediators in RAW 264.7 mouse macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS).

Method : We examined effect of PM Extract on the cell viability of RAW 264.7 cells. Furthermore, we investigated anti-inflammatory effect of PM Extract by the production of proinflammatory cytokines such as NO, intracellular calcium, interleukin(IL)-1 α , IL-3, IL-1 β , IL-6, interferon inducible protein-10(IP-10), keratinocyte-derived chemokine(KC) and vascular endothelial growth factor(VEGF).

Result : No significant changes have been found in the mouse macrophage cell viability by the PM Extract at the concentration of 25, 50, 100 and 200 μ g/mL. The water extract of PM significantly inhibited the production of NO and intracellular calcium in the LPS-induced macrophages at the concentration of 25, 50, 100 and 200 μ g/mL. The water extract of PM significantly inhibited the production of IL-1 α , IL- β , IL-3, IP-10, KC, VEGF in the LPS-induced macrophages at the concentration of 50, 100, and 200 μ g/mL; IL-6 at the concentration of 100 and 200 μ g/mL ; and IL-17 at 200 μ g/mL.

Conclusion : The water extract of PM significantly inhibited the production of NO, intracellular calcium, IL-1 α , IL-3, IL- β , IP-10, KC, VEGF at the concentration of 50 μ g/mL or higher in the LPS-induced macrophages with no changes in the cell viability of them. These results suggest that water extract of Polygoni Multiflori Radix has anti-inflammatory effect regulating the production of proinflammatory cytokines in the LPS-induced macrophages.

Key words : Polygoni Multiflori Radix, macrophage, anti-inflammatory effect, cytokine, nitric oxide

서론

何首烏는 『日華子本草』¹⁾에 “久服令人有子, 治肚腹宿疾, 一切冷氣及腸風” 라고 처음 收載된 이래 養血滋陰, 潤腸通便, 截癰, 祛風, 解毒의 효능이 있어, 血虛頭暈眩暈, 心悸, 失眠, 肝腎陰虛之腰膝酸軟, 鬚髮早白, 耳鳴, 遺精, 腸燥便秘, 久

瘡體虛, 風疹瘙癢, 瘡癰, 癩癰, 痔瘡 등을 치료하는 약물로 사용되어 왔다²⁾.

何首烏의 기원은 大韓藥典³⁾에 “何首烏 Polygonum multiflorum Thunberg (여뀌과 Polygonaceae)의 덩이뿌리” 라고 收載되어 있다.

何首烏의 성분으로는 根과 根莖에 oxymethylantraquinone

*교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342. 가천대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 031-750-5415 · E-mail : garak@gachon.ac.kr

#제1저자 : 정성룡, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342. 가천대학교 한의과대학 본초학교실
· HP : 010-3323-8293 · E-mail : jsyneoherb@hanmail.net
· 접수 : 2013년 10월 13일 · 수정 : 2013년 11월 22일 · 채택 : 2013년 11월 27일

類가 함유되어 있다. 주로 chrysophanol과 emodin 그 다음은 rhein, 微量의 physcion과 chrysophanol anthrone 등 (불에 쪄서 구우면 rhein은 없어진다), 그밖에 澱粉 45.2%, 粗脂肪 3.1%, lecithin 3.7%등이 있다⁴⁾.

약리작용으로는 콜레스테롤 저하작용, 동맥경화예방작용, 혈당강화작용, 장관운동촉진작용, 강심작용, 뇌세포 보호 작용, 사하작용, 항산화작용, 면역억제작용, 혈관확장작용, 항바이러스작용, 항균작용 등이 있다^{5,6)}.

何首烏의 항염 및 면역작용에 대하여 차 등⁷⁾은 LPS로 자극된 마우스의 복막 대식세포에 대한 何首烏 줄기의 MeOH 추출물의 항염효과에 대해 보고하였고, 이⁸⁾는 비장세포의 증식능, 사이토카인 유도능, 면역억제제 methotrexate(MTX) 처리에 의한 회복능을 보고하였다.

이와 같이 何首烏는 항염, 항균, 항산화 및 면역 활성화에 유효한 효과를 보이고 있음을 알고 있지만, 한의학 임상에서 많이 쓰이는 何首烏 물추출물의 항염효능에 관하여는 아직 보고되지 않아, 이에 대한 검증할 필요가 있다고 사료되었다.

이에 저자는 何首烏의 항염효능에 대하여 알아보기 위하여 何首烏를 물추출하여 제조한 시료(PM = Polygoni Multiflori Radix)를 대상으로 mouse macrophage RAW 264.7 cells의 cell viability와 lipopolysaccharide(LPS)로 유발된 nitric oxide(NO), 세포내 칼슘, 그리고 interleukin(IL)-1 α , IL-3, IL-1 β , IL-6, interferon inducible protein-10(IP-10), keratinocyte-derived chemokine(KC), vascular endothelial growth factor(VEGF), interferon-gamma(IFN- γ) 등의 cytokine 생성증가에 대한 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 하수오(Polygoni Multiflori Radix; *Polygonum multiflorum* Thunb의 塊根)은 한국 대구의 음니허브 주식회사로부터 2010년 6월에 구입하였으며, 약재는 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고(No: 2010-0602) 모든 약재는 실험 전에 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 마우스 복강 대식세포(mouse macrophage line)인 Raw 264.7 세포로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 FBS(Sigma, USA), ethyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), penicillin(Sigma, USA), streptomycin(Sigma, USA), DMEM(Sigma, USA), methyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), DMSO(Sigma, USA), 1×PBS(Sigma,

USA), EDTA(Sigma, USA), Trypsin-EDTA(Sigma, USA), MTT assay kit(Sigma, USA), Fluo-4 calcium assay kit(Molecular Probes, USA), NO assay kit(Sigma, USA), Bio-Plex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Nuair, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), research microscope (Becton dickinson, USA), centrifuge (Hanil, Korea), fume hood (Hanil, Korea), clean bench (Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader (Bio-Rad, USA), vortex mixer (Vision Scientific Co, Korea), water bath (Intron Biotech, Korea), ice-maker (Vision Scientific Co, Korea), Bio-Plex 200(Bio-Rad, USA), spectrofluorometer(Dynex, UK) 등이다.

2. 방법

1) 시료의 제조

何首烏 50 g을 정확하게 중량을 측정 후, 1차 증류수 2,000 mL와 함께 환류추출기에 넣은 뒤 탱액이 끓기 시작한 후 2시간 동안 가열하여 추출하였다. 추출액을 filter paper (Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 뒤 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 7.41 g을 얻었으며, 수율은 14.82%였다.

2) 세포 배양

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

3) 세포증식율 검사(cytotoxicity assay)

준비된 시료가 Raw 264.7 세포의 증식율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Mosmann⁹⁾의 방법을 응용하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 세포를 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 (25, 50, 100, 200 μ g/mL)를 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 100 μ l씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 후 2시간 동안 갈

은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μ l 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell Proliferation은 다음 공식으로 계산되었다.

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

AC : absorbance of control
AT : absorbance of tested extract solution.

4) 일산화질소(Nitric oxide) 생성 측정

LPS를 단독처리(1 μ g/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200 μ g/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ Incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 μ l을 채취하여 여기에 그리스 시약(Griess reagent) 100 μ l을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 Microplate Reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 일산화질소(nitric oxide) 생성은 다음 공식으로 계산하였다.

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

AC : absorbance of control
AT : absorbance of tested extract solution.

5) 사이토카인(cytokine) 분비 측정

사이토카인 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Politch 등¹⁰⁾의 방법을 응용하여 Bio-Plex Cytokine Assay를 다음과 같이 시행하였다. 96 well plate에 1 \times 10⁵ cells/mL의 cell을 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ Incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1 \times PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리(1 μ g/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200 μ g/mL)와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액(cell culture supernatant)을 채취하여 filter plate(96 well type)에 미리 준비되어 있던 antibody-conjugated capture beads와 결합시킨다. 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150 μ l의 wash buffer로 세척한다. 세척이 끝난 뒤 각 well에 detection antibody를 추가한 후 30 분간 배양한다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 streptavidin-PE를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30 분간 진동배양한다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 120 μ l의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5 분간 진동배양한 후 bio-plex array reader(Bio-Plex 200)를 이용, 측정코자 하는 사이토카인류(IL-1 α , IL-3, IL-1 β , IL-6 등)의 발현에 대한 시료의 영향을 계산, 비교하였다.

6) 세포내 칼슘방출 측정

RAW 264.7 세포의 세포내 칼슘방출에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 Fluo-4 calcium assay를 다음과 같이 실시하였다. 96 well plate에 2 \times 10⁵ cells/mL의 cell을

100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 배양세포 표면을 1 \times PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS 1 μ g/mL를 단독 혹은 다양한 농도의 시료와 함께 배지에 담아 처리하고 24 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well의 배지를 제거하고 100 mL의 Fluo-4 dye solution을 각 well에 처리한 후, 30 분 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후, spectrofluorometer(485 nm excitation filter ; 535 nm emission filter)를 이용하여 각 well의 fluorescence intensity를 측정, 비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 mean \pm SD로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's *t*-test와 Mann-Whitney test로 분석하여 *p*-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포증식에 대한 효과

PM이 대식세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 세포증식율이 증가하였다(Fig. 1).

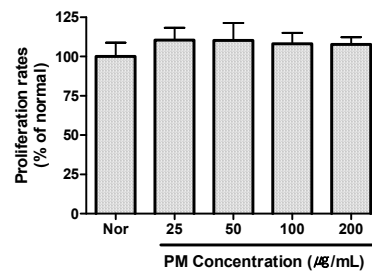


Fig. 1. Effect of PM on Proliferation rate in Raw 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean \pm SD of three independent experiments.

PM : Polygoni Multiflori Radix water extract. Normal (Nor) : Treated with media only.

2. LPS로 유발된 NO 생성증가에 대한 효과

PM이 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성증가에 대한 효과를 알아보기 위하여 LPS(1 μ g/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게($P < 0.01$) 억제하였다(Fig. 2).

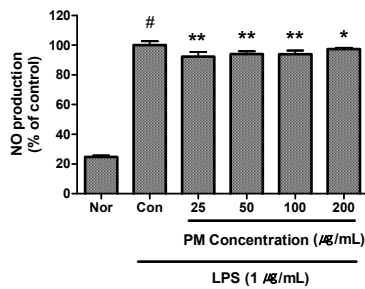


Fig. 2. Effect of PM on the nitric oxide production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean ± SD of three independent experiments.
 PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.
 Normal (Nor) : Treated with media only, Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. ** represents $P < 0.01$ compared to the control.

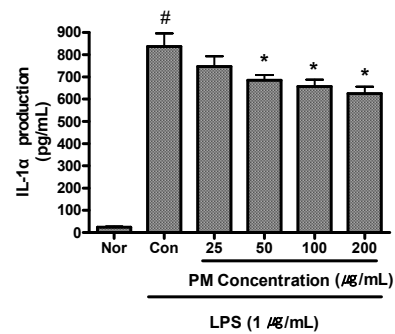


Fig. 4. Effect of PM on the IL-1α production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (1 µg/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean ± SD of three independent experiments.
 PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.
 Normal (Nor) : Treated with media only, Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

3. LPS로 유발된 세포내 칼슘방출증가에 대한 효과

PM이 LPS로 유발된 대식세포의 세포내 칼슘방출증가에 대한 효과를 알아보기 위하여 LPS(1 µg/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 세포내 칼슘방출증가를 유의하게($P < 0.01$) 억제하였다(Fig. 3).

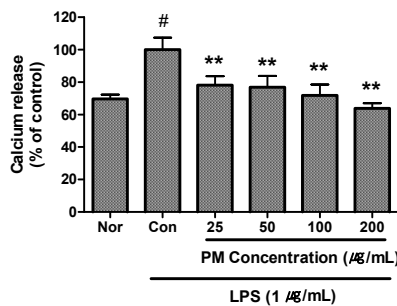


Fig. 3. Effect of PM on Calcium Release in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean ± SD of three independent experiments.
 PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.
 Normal (Nor) : Treated with media only, Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. ** represents $P < 0.01$ compared to the control.

2) IL-3 생성에 대한 효과

PM이 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-3 생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1 µg/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-3 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 5).

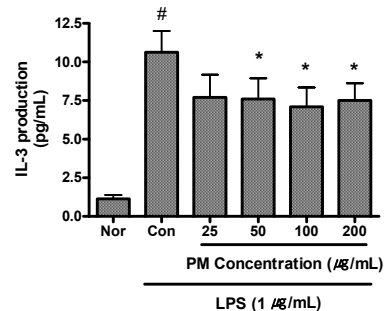


Fig. 5. Effect of PM on the IL-3 production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (1 µg/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean ± SD of three independent experiments.
 PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.
 Normal (Nor) : Treated with media only, Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

4. 면역사이토카인 생성에 대한 효과

1) IL-1α 생성에 대한 효과

PM이 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-1α 생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1 µg/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-1α 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 4).

3) IL-1β 생성에 대한 효과

PM이 LPS로 유발된 대식세포의 IL-1β 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1 µg/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-1β 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 6).

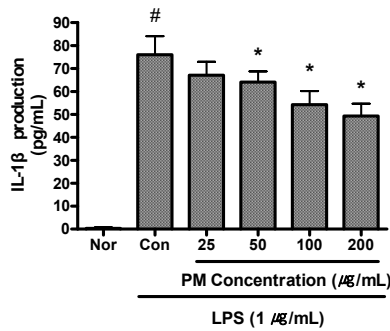


Fig. 6. Effect of PM on the IL-1 β production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (1 μ g/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean \pm SD of three independent experiments.

PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.

Normal (Nor) : Treated with media only. Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

4) IL-6 생성에 대한 효과

PM이 LPS로 유발된 대식세포의 IL-6 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1 μ g/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 100, 200 μ g/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 7).

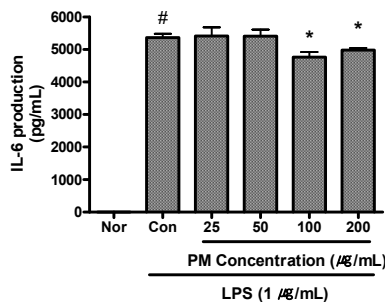


Fig. 7. Effect of PM on the IL-6 production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (1 μ g/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean \pm SD of three independent experiments.

PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.

Normal (Nor) : Treated with media only. Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

5) IP-10 생성에 대한 효과

PM이 LPS로 활성화된 대식세포에서 ICP-10 생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1 μ g/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 8).

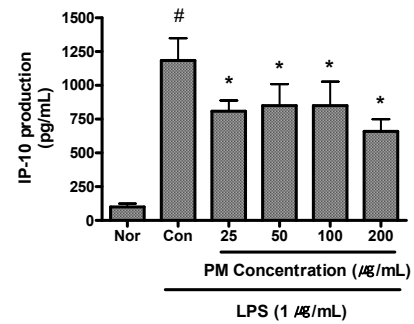


Fig. 8. Effect of PM on the ICP-10 production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (1 μ g/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean \pm SD of three independent experiments.

PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.

Normal (Nor) : Treated with media only. Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

6) KC 생성에 대한 효과

PM이 LPS로 활성화된 대식세포에서 keratinocyte-derived chemokine(KC) 생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1 μ g/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 KC 생성증가를 유의하게($P < 0.01$) 억제하였다(Fig. 9).

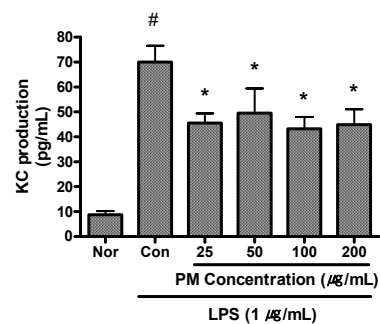


Fig. 9. Effect of PM on KC production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (1 μ g/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean \pm SD of three independent experiments.

PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.

Normal (Nor) : Treated with media only. Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

7) VEGF 생성에 대한 효과

PM이 LPS로 활성화된 대식세포에서 vascular endothelial growth factor(VEGF) 생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1 μ g/mL)와 함께 PM을 24 시간 동안 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게($P < 0.01$) 억제하였다(Fig. 10).

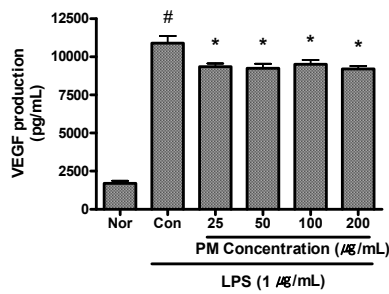


Fig. 10. Effect of PM on VEGF production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (1 µg/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean ± SD of three independent experiments.

PM : Polygoni Multiflori Radix water extract.

Normal (Nor) : Treated with media only. Control (Con) : Treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to the normal. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

고찰

何首烏는 『本草綱目』¹¹⁾에 “何首烏, 白者入氣分, 赤者入血分.” 이라 하여 赤何首烏를 白何首烏와 구별하였는데, 우리나라 임상에서는 *Polygonum multiflorum* Thunberg를 赤何首烏, *Cynanchum wilfordii* Hemsley를 白何首烏라고 하여 기원식물을 구별하고 있다.

何首烏의 성분으로는 anthraquinone계열로 주로 chrysophanol과 emodin이고 그 다음에는 rhein, 미량이 physcion과 그 배당체, stilbene계열로 (E) -2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, 2,4,6,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside-2''-monogalloyl ester, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside-3''-monogalloyl ester, phthalide계열로 cis-6,7-dihydroxyiligustilide, trans-6,7-dihydroxyiligustilide, 기타 lecithin 3.7% 등이 들어 있다^{5,6)}.

何首烏의 약리작용에 대한 최근 연구로는 이 등¹²⁾은 산화적 손상에 의한 혈관내피세포의 생존을 증가효과를 보고하였고, 이 등¹³⁾은 혈중지질저하 효과를, 이 등¹⁴⁾은 뇌세포 보호 작용을, 유 등¹⁵⁾이 세포독성의 방어효과를 보고하였고, Li-Shuang 등¹⁶⁾은 항산화효능을 보고하였다.

그리고 何首烏의 항염 및 면역작용에 대한 선행논문으로는 차 등¹⁷⁾은 LPS로 자극된 마우스의 복막 대식세포에 대한 何首烏 줄기의 MeOH 추출물의 항염효과에 대해 보고하였고, 이¹⁸⁾는 비장세포의 증식능, 사이토카인 유도능, 면역억제제 methotrexate(MTX) 처리에 의한 회복능, S-180 복수암 세포진행억제효과 등으로 생체 면역반응효과를 보고하였다.

이와 같이 何首烏는 항염, 항균, 항산화 및 면역 활성화에 유효한 효과를 보이고 있음을 알고 있지만, 한의학 임상에서 많이 쓰이는 何首烏의 물추출에 의한 何首烏의 항염효능에 관한 연구는 아직 보고되지 않아, 이에 대한 검증을 할 필요가 있다고 사료되었다.

이에 본 연구에서는 何首烏를 물추출하여 얻은 시료(PM)를 대상으로 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cells의 세포생존을

과 LPS로 유발된 NO, 세포내 칼슘, 그리고 IL-1α, IL-3, IP-10, KC, VEGF의 다양한 cytokines의 생성증가에 대한 영향을 측정하였다.

본 연구에서는 마우스의 대식세포 RAW 264.7 cells에 PM을 25, 50, 100 및 200 µg/mL의 농도로 처리한 뒤에 24 시간동안 37°C에서 배양한 후, 세포의 증식을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과 PM은 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 마우스 대식세포에 유의한 독성을 유발하지 않았으며 이는 PM이 대식세포에 유의한 독성을 유발하지 않는 것으로 볼 수 있다.

체내 염증이 발생하였을 경우, 증식한 대식세포가 질소산화물을 과도하게 만들어낸다. 이 때 생성되는 NO는 염증에서 화학적 매개체(chemical mediator)의 역할을 하고 활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하게 된다¹⁹⁾. PM이 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 억제하였다. 이와 같이 PM이 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성증가를 억제하는 것은 PM이 지나친 NO 생성에 의한 염증악화를 억제할 수 있는 효과를 가지고 있음을 의미한다.

세포막에 발현된 Ca²⁺의 통과채널인 TRPM2가 매개하는 Ca²⁺ 유입이 단핵백혈구(monocyte)와 대식세포(macrophage)에서 케모카인(chemokine) 생산을 유도하고 염증을 유발하는 호중구(neutrophil)을 혈액에서 조직으로 침입시킨다²⁰⁾. 다양한 질병원이 되는 입자가 칼슘 유입을 유도하는 것으로 볼 때 세포내 칼슘농도변화가 입자의 염증유발과 관계가 있는 것으로 보고 있다²¹⁾. PM이 LPS로 유발된 대식세포의 세포내 칼슘방출증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 세포내 칼슘방출증가를 유의하게 억제하였다. 이러한 PM의 항염효능작용은 LPS로 유발된 대식세포의 세포내 칼슘증가를 억제하는 기전을 포함하는 것으로 해석된다.

IL-1α는 인간의 면역반응에 있어서 중심적인 역할을 하며 대사적, 생리적, 조절기능 등 다양한 활동을 한다²²⁾. 일반적으로 IL-1α는 염증의 원인이 될 뿐 아니라 발열과 패혈증을 조장한다²³⁾. PM이 LPS로 유발된 대식세포의 IL-1α 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-1α 생성증가를 유의하게 억제하였다.

IL-3는 다양한 혈액 세포의 생성과 기능적 활동을 자극하는 조절성장인자이며²⁴⁾, 염증, 면역, 조절작용과 관계된 내피세포의 반응을 조절하므로 항암치료이후의 골수재구성(reconstitution)에 임상적으로 중요하게 쓰인다²⁵⁾. PM이 LPS로 유발된 대식세포의 IL-3 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-3 생성증가를 유의하게 억제하였다.

IL-1β는 proprotein으로 활성화된 대식세포에 의해서 생산되며, 생물학적으로 활성화된 분비형 단백질을 생성하는

IL-1 β 전환효소(IL-1 β converting enzyme, ICE)라 불리는 단백질 분해효소에 의해 분해된다.²⁶⁾ 중추신경계(CNS)에서 IL-1 β 에 의한 COX2의 분비는 염증에서의 과민성 통증의 원인이 된다.²⁷⁾ PM이 LPS로 유발된 대식세포의 IL-1 β 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 50, 100, 200 μ g/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-1 β 생성증가를 유의하게 억제하였다.

원래 B cell 분화인자로 알려진 IL-6는 면역반응, 조혈작용, 급성기 염증 반응을 조절하는 물질이다. IL-6는 독특한 수용체계를 가지고 있어서 IL-6R과 gp130의 두 분자를 통해서 다양한 생물학적 효과를 나타낸다. IL-6는 몇몇 염증성 질병(류마티스 관절염, Castleman's disease, 전신형 소아기 류마티스 관절염(systemic type, juvenile idiopathic arthritis: JIA))에서 상승됨이 관찰되며 자가면역 질환의 발병에 다양한 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.²⁸⁾ PM이 LPS로 유발된 대식세포의 IL-6 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 100, 200 μ g/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의하게 억제하였다.

IP-10 또는 CXCL10으로 불리는 IFN- γ -inducible protein 10은 LPS와 type I and II IFN에 의해 자극되는 세포에 의해 분비되며, 활성화된 T cell의 화학유인물질(chemoattractant)이다. 많은 Th1-type 염증성 질환에서 IP-10이 발현되며, IP-10은 T cell의 생성과 활성화된 T cell을 염증조직으로 유인하는데 중요한 역할을 한다.²⁵⁾ 또한 IP-10/CXCL10은 CXCR3에 결합하는 다른 chemokine인 Mig/CXCL9과 더불어 Grave's disease에서 염증관련 cell의 유인과 염증의 증폭에 중요한 역할을 한다.²⁹⁾ PM이 LPS로 유발된 대식세포의 IP-10 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성증가를 유의하게 억제하였다.

KC(Keratinocyte-derived chemokine)는 CXC family에 속하는 케모카인(chemokine)으로 혈관신생과 만성 섬유증성 질병과 연관성이 있고 IL-8과 생물학적 기능과 발현양상에서 유사성을 보이며 murine의 급성 염증과 호중성구 chemotaxis(화학주성작용)의 중요한 매개체이다.³⁰⁾ PM이 LPS로 유발된 대식세포의 KC 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 KC 생성증가를 유의하게 억제하였다.

VEGF(vascular endothelial growth factor)는 혈관신생과 혈관형성의 중심 조절자이다.³¹⁾ VEGF는 내피세포에 특이적인 유사분열촉진인자로서, 저산소혈증에 의해서 발현이 유도되어 혈관투과성을 촉진시킨다.³²⁾ 또한 VEGF는 내피세포의 증식과 화학주성을 조래하며, 세포 외 기질의 재형성, 혈관신생형성에 관여한다.³³⁾ PM이 LPS로 유발된 대식세포의 VEGF 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 PM을 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성증가를 유의하게 억제하였다.

이와 같이 PM이 마우스 대식세포의 세포생존율을 감소시

키지 않으면서도 LPS로 인해 유발된 대식세포의 각종 염증매개물질들(inflammatory mediators) 생성증가를 유의하게 억제하는 것은 PM이 대식세포의 염증매개물질 과다배출로 인한 다양한 염증질환을 완화하거나 억제할 수 있는 항염효능이 있음을 의미하는 것이다.

이상의 결과, 何首烏 물추출물 PM은 대식세포에 유의한 세포가 증식되었으며 LPS로 유발된 대식세포의 NO, 세포내 칼슘, IL-1 α , IL-3, IL-1 β , IP-10, KC, VEGF, IL-1 β 의 생성증가를 50 μ g/mL 이상의 농도에서 유의하게 억제시키는 등 대식세포와 관련된 염증반응을 조절할 수 있는 항염효능이 있는 것으로 판단된다. 향후 何首烏를 이용한 염증질환치료제 개발을 위하여 보다 세심한 연구가 요구되어지는 바이다.

결론

본 연구에서는 何首烏 물추출물(PM)을 대상으로 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cells의 세포생존율과 LPS로 유발된 NO, 세포내 칼슘, 그리고 IL-1 α , IL-3, IL-1 β , IL-6, IP-10, KC, VEGF의 다양한 사이토카인의 생성증가에 대한 효과를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 何首烏 물추출물 PM은 25, 50, 100 및 200 μ g/mL의 모든 농도에서 마우스 대식세포에 세포생존율을 유발하지 않았다.
2. 何首烏 물추출물 PM은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 NO 생성증가를 25, 50, 100 및 200 μ g/mL의 모든 농도에서 유의하게 억제시켰다.
3. 何首烏 물추출물 PM은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 세포내 칼슘방출증가를 25, 50, 100 및 200 μ g/mL의 모든 농도에서 유의하게 억제시켰다.
4. 何首烏 물추출물 PM은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 IL-1 α , IL-3, IP-10, KC, VEGF 생성증가를 25, 50, 100 및 200 μ g/mL의 모든 농도에서 유의하게 억제시켰다.
5. 何首烏 물추출물 PM은 LPS에 의해서 생성이 증가된 대식세포의 IL-1 β 를 50, 100 및 200 μ g/mL의 농도에서 유의하게 억제시켰으며, IL-6는 100 및 200 μ g/mL의 농도에서 유의하게 억제시켰다.

이상의 결과, 何首烏 물추출물 PM은 대식세포에 유의한 세포가 증식되었으며 LPS로 유발된 대식세포의 NO, 세포내 칼슘, IL-1 α , IL-3, IL-1 β , IP-10, KC, VEGF의 생성증가를 50 μ g/mL 이상의 농도에서 유의하게 억제시켰다. 이러한 결과는 PM이 대식세포와 관련된 과잉염증반응을 조절할 수 있는 항염효능이 있음을 의미한다.

References

1. Ri HZ, Rihuazibencao, Hefei : Anhuikexuejishuchubanshe, 2005 : 98.
2. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China, ZHONHUABENCAO, Vol. 2, Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 671-7.
3. Korea Food and Drug Administration, The Korean Herbal Pharmacopoeia, Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2012 : 116, 1177.
4. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY, Boncho-Hak, Seoul : Young-Lim Press, 2007 : 583-4.
5. Jiangsuxinyixueyuan, Zhongyaodacidian, Shanghai : Shanghai Kexuejishuchubanshe, 1977 : 1135-8.
6. Saengyakhakgyojaebyeonchanwiwonhoe, Saengyakhak, Paju : Dongmyeongsa, 2008 : 205-8.
7. Cha DS, Jeon H, Anti-inflammatory Effect of MeOH Extracts of the Stem of Polygonum multiflorum in LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages, Nat Prod Sci, 2009 ; 15(2) : 83-9.
8. Lee GH, Kang SS, An WG, Lee YS, Kwon YK, Shin SW, Comparison of Immune Promotion Effects of Water-extracted Angelicae gigantis, Rehmanniae Radix, Paeoniae japonica and Polygoni multiflori Radix, Kor J Orient Physiol Pathol, 2006 ; 20(6) : 1507-15.
9. Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods, 1983 ; 65(1-2) : 55-63.
10. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ, Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men, Hum Reprod, 2007 ; 22(11) : 2928-35.
11. Li SZ, Bencaogangmutongshi, Beijing : Xueyuanchubanshe, 1992 : 1076-82.
12. Lee YS, Kim HS, Son YW, Yoo KS, Lee JH, Lee KC, Choi KC, Shin HC, Park ST, Effect of Radix Polygoni Multiflori on Cultured Vascular Endothelial Cells Damaged by Xanthine Oxidase and Hypoxanthine, Kor J Orient Physiol Pathol, 2002 ; 16(4) : 720-3.
13. Lee YJ, Son YJ, The Effects of Polygoni multiflori Radix and Cynanachi wilfordii Radix on the Blood Lipids and Enzymes of Hypercholesterolic Rats, Kor J Herbology, 1999 ; 14(1) : 69-77.
14. Lee YH, Lee WC, Effects of Polygoni Multiflori Radix on Cerebral Ischemia of Hyperlipidemic Rats, J Kor Oriental Med, 2005 ; 26(3) : 146-61.
15. Yoo KS, Lee YS, Son YW, Hong GH, Study on the Effect of Radix polygoni Multiflori on Cultured Mouse Cerebral Neurons Damaged by Organic Mercury, Kor J Orient Physiol Pathol, 2002 ; 16(6) : 1134-7.
16. Lv LS, Gu X, Tang J, Ho CT, Antioxidant activity of stilbene glycoside from polygonum multiflorum Thunb in vivo, Food Chemistry, 2007 ; 104 : 1678-81.
17. Cha DS, Jeon H, Anti-inflammatory Effect of MeOH Extracts of the Stem of Polygonum multiflorum in LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages, Nat Prod Sci, 2009 ; 15(2) : 83-9.
18. Lee GH, Kang SS, An WG, Lee YS, Kwon YK, Shin SW, Comparison of Immune Promotion Effects of Water-extracted Angelicae gigantis, Rehmanniae Radix, Paeoniae japonica and Polygoni multiflori Radix, Korean J Orient Physiol Pathol, 2006 ; 20(6) : 1507-15.
19. Yoon WJ, Ham YM, Kim SS, Yoo BS, Moon JY, Baik JS, Lee NH, Hyun CG, Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae Sargassum micracanthum in RAW 264.7 macrophages, EurAsia J BioSci, 2009 ; 3 : 130-43.
20. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y, Roles of TRPM2 in oxidative stress, Cell Calcium, 2011 ; 50(3) : 279-87.
21. Weissman BA, Gross SS, Measurement of NO and NO synthase, Curr Protoc Neurosci, 2001 ; 7(7) : 13.
22. Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ, Interleukin-1 signal transduction, Life Sci, 1996 ; 59(2) : 61-83.
23. Hillenbrand A, Knippschild U, Weiss M, Schrezenmeier H, Henne-Bruns D, Huber-Lang M, Wolf AM, Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients, BMC Surq, 2010 ; 10 : 26.
24. Korpelainen EI, Gamble JR, Vadas MA, Lopez AF, IL-3 receptor expression, regulation and function in cells of the Vasculature, Immuno Cell Biol, 1996 ; 74(1) : 1-7.
25. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD, IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking, J Immunol, 2002 ; 168(7) : 3195-204.
26. Miller BE, Krasney PA, Gauvin DM, Holbrook KB, Koonz DJ, Abruzzese RV, Miller RE, Pagani KA, Dolle RE, Ator MA, et al, Inhibition of mature IL-1 beta production in murine macrophages and a murine model of inflammation by WIN 67694, an inhibitor of IL-1 beta converting enzyme, J Immunol, 1995 ; 154(3) : 1331-8.

27. Shi L, Smolders I, Umbrain V, Lauwers MH, Sarre S, Michotte Y, Zizi M, Camu F. Peripheral inflammation modifies the effect of intrathecal IL-1beta on spinal PGE2 production mainly through cyclooxygenase-2 activity. A spinal microdialysis study in freely moving rats. *Pain*. 2006 ; 120(3) : 307-14.
28. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci*. 2012 ; 122(4) : 143-59.
29. Romagnani P, Rotondi M, Lazzeri E, Lasagni L, Francalanci M, Buonamano A, Milani S, Vitti P, Chiovato L, Tonacchera M, Bellastella A, Serio M. Expression of IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 in the thyroid and increased levels of IP-10/CXCL10 in the serum of patients with recent-onset Graves' disease. *Am J Pathol*. 2002 ; 161(1) : 195-206.
30. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000 ; 68(1) : 1-8.
31. Ortega N, Hutchings H, Plouët J. Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci*. 1999 ; 4 : D141-52.
32. Park JY, Kim JH, Hong SH, Lee YJ, Hong SH, Kwon HE, Kim SH, Chae HD, Kang BM. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor mRNA in Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues of Patients with Endometriosis. *Kor J Obstet Gynecol*. 2004 ; 47(3) : 515-22.
33. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 ; 280(6) : C1358-66.