

梔子が 대식세포의 Cytokine에 미치는 영향

가천대학교 한의과대학 한방부인과학교실
차지혜, 임은미

ABSTRACT

Effects of *Gardeniae Fructus* on Cytokines in Mouse Macrophage

Ji-Hea Cha, Eun-Mee Lim

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Ga-Chon University

Objectives: The purpose of this study was to investigate the effects of *Gardeniae Fructus* Water Extract (GF) on the production of inflammatory mediators in RAW 264.7 cell treated with lipopolysaccharide (LPS).

Methods: *Gardeniae Fructus* was extracted with distilled water (2,000 ml) for 2 hours. In order to evaluate cytotoxicity of GF, 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed. To investigate anti-inflammatory effects, the concentration of nitric oxide (NO) was measured with No assay, calcium (Ca) was measured with Fluo-4 Ca assay, and cytokine was measured by Bio-Plex cytokine assay in RAW 264.7 cell. And when p-value is below 0.05, it is judged to have the significant difference statistically.

Results:

1. GF did not show any cytotoxicity.
2. GF suppressed the production of NO and Ca at the concentration of 25, 50, 100 and 200 µg/ml.
3. GF suppressed the production of interleukin (IL)-1β, IL-10, IL-12p40, macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1β and keratinocyte chemoattractant(KC) at the concentration of 25, 50, 100 and 200 µg/ml.
4. GF suppressed the production of vascular endothelial growth factor (VEGF), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 at the concentration of 25, 50 and 100 µg/ml.
5. GF suppressed the production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) at the concentration of 25 and 50 µg/ml.
6. GF suppressed the production of MIP-2 at the concentration of 50 and 100 µg/ml, and tumor necrosis factor (TNF)-α at the concentration of 50 and 200 µg/ml.

Conclusions: These results suggest that GF has anti-inflammatory effect and immuno-modulating activity.

Key Words: *Gardeniae Fructus*, Macrophage, Anti-inflammation, NO, Cytokine

“이 연구는 2013년도 가천대학교 지원에 의한 결과임”

I. 서론

염증은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로 생체조직이 어떠한 원인에 의하여 손상을 받았을 때, 이 손상을 최소화하고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 초기 조직반응이며, 면역계를 동원하는 생체의 방어기전과 상처의 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐만 아니라 많은 질병의 병리 발생과도 관련되어 있는 중요한 과정이다^{1,2)}.

염증 반응 과정에서 대식세포는 NO와 다양한 cytokine을 생산하여 초기 감염 방어에 중요한 역할을 한다. 그러나 과도한 활성에 의해 이들의 생산이 과잉으로 일어나면 오히려 염증을 심화하고 정상 조직을 손상시켜 염증 질환을 일으킨다³⁾. 따라서 과도한 NO와 cytokine의 생성을 억제하는 등의 염증제어는 만성적인 염증으로 인한 다양한 질환의 예방과 치료에 유의하게 작용할 수 있다.

염증 반응과 관련된 질병들로는 자가면역질환, 다양한 신경질환, 패혈증, 암, 동맥경화 등이 있으며⁴⁾, 최근에는 정확한 기전이 밝혀지지 않았으나 골반통증 및 불임의 주요 원인이 되는 자궁내막증과 자연유산, 임신중독증 등의 산부인과질환의 원인 또한 대식세포의 염증반응과 관련되어 있다는 연구들이 보고되었다^{5,6)}.

梔子是 꼭두서니과에 속한 常綠灌木인 치자나무 *Gardenia jasminoides Ellis* 또는 동속식물의 성숙한 果實로, 淸熱瀉火藥으로 상용되고 있으며⁷⁾, 梔子の 주성분으로는 iridoid glycoside인 geniposide와 gardenoside를 비롯하여 genipin, geniposidic acid, shanzhiside⁸⁾ 및 crocetin derivatives 등이 있다⁹⁾.

최근 梔子和 관련된 연구들로 梔子 추출물과 梔子로부터 분리된 주성분들의 항염작용에 관한 연구들이 보고되고 있는데¹⁰⁻¹³⁾, 이에 저자는 梔子の 항염작용과 관련된 선행연구를 바탕으로 염증매개물질의 발현과 면역조절의 효과를 다양한 cytokine의 생성을 통해 확인해보고자 GF를 대상으로 마우스 대식세포 RAW 264.7 cell의 세포 생존율과 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 및 Ca, 그리고 IL과 chemokine 및 growth factor 등의 cytokine의 생성에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

실험에 사용된 梔子是 한국 대구의 옴니허브로부터 구입(NO. 2012-0601)하였으며, 모든 약재는 ultrasonic cleaner(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 사용하였다.

2) Cell lines

실험에 사용된 세포는 마우스 대식세포 RAW 264.7 cell line으로 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

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), PBS(Sigma, USA), EDTA(Sigma, USA), trypsin-EDTA(Sigma, USA), MTT assay kit(Sigma, USA), Fluo-4 Ca assay kit(Molecular Probes, USA), NO assay kit(Sigma, USA), Bio-Plex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다.

(2) 기 기

실험에 사용된 기기는 ultrasonic cleaner (Branson, USA), centrifuge(Hanil, Korea), filter paper(Advantec No.2, Japan), CO₂ incubator(NUAIRE, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), air compressor (Tamiya, Japan), homogenizer(O-mni, USA), research microscope(Olympus, Japan), fume hood(Hanil, Korea), clean bench (Jeio thec, Korea), deep freezer(Ilshin Lab Co, Korea), microplate reader(Bio-Rad, USA), thermo aluminum bath(Fine PCR, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(In-Tron biotech, Korea), ice-maker(Vision Scientific Co, Korea), Bio-Plex 200(Bio-Rad, USA), spectrofluorometer(Dynex, UK) 등이다.

2. 방 법

1) 시료 제조

梔子 30 g을 정확하게 측정된 뒤, 환류 추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱크가 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 10.30 g을 얻었으며, 수율은 34.22%였다.

2) 세포 배양

RAW 264.7 cell을 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양하였다. 세포들은 75 cm² flask에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 50 ml의 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양되었다.

3) 세포생존율 측정

GF의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 다음과 같이 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/well을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료를 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 농도에서 각각의 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 mg/ml MTT를 100 µl씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µl 처리하고 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정, 세포 생존율을 비교하였다.

4) NO 생성 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 NO₂, nitrite, nitrate로 변한다. 그리스

시약(griess reagent: 0.5%의 sulfanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethyleneamine)은 nitrite와 화학 반응하여 보라색의 azo-dye를 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, azo-dye의 농도로부터 nitrite의 농도를 추정하기 위해 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성정도를 비교하였다. 이를 위해 다음과 같이 실험하였다. LPS 1 µg/ml를 단독 혹은 25, 50, 100 및 200 µg/ml 농도의 시료와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 µl을 채취하여 여기에 그리스 시약 100 µl을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정, NO 생성을 비교하였다.

5) Ca 생성 측정

GF가 마우스 대식세포의 세포내 Ca 방출에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Fluo-4 Ca assay를 다음과 같이 실시하였다. 96 well plate에 2×10⁵ cells/ml의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS 1 µg/ml를 단독 혹은 25, 50, 100 및 200 µg/ml 농도의 시료와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well의 배지를 제거하고 100 ml의 Fluo-4 dye solution을 각 well에 처리한 후, 30분 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양, 상온에서 30분 동안 추가 배양하였다. 배양이 끝난 후, spectrofluorometer(485 nm excitation filter; 535 nm emission

filter)를 이용하여 각 well의 형광강도를 측정, 비교하였다.

6) Cytokine 생성 측정

Cytokine의 분비와 관련된 GF의 영향을 알아보기 위해 Politch 등의 연구를^{14,15)} 참조하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS 1 µg/ml를 단독 혹은 25, 50, 100 및 200 µg/ml 농도의 시료와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액을 채취하여 96 well type의 filter plate에 미리 준비되어 있던 antibody-conjugated capture beads와 결합시켰다. 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150 µl의 wash buffer로 세척하였다. 세척이 끝난 뒤 각 well에 detection antibody를 추가한 후 30분간 배양하였다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 streptavidin-phycoerythrin을 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30분간 진동배양한다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 120 µl의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5분간 진동배양한 후 Bio-Plex array reader를 이용, 측정하고자 하는 cytokine의 양을 조사, 비교하였다.

3. 통계처리

실험에서 얻은 결과에 대해서는 mean ±SD로 나타내었으며, 대조군과 실험군의 평균 차이는 Student's t-test와 ANOVA test로 분석하여 p-value 값이 0.05 미만

일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포생존율의 변화

GF가 대식세포의 세포생존율에 미치는 영향을 측정한 결과 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

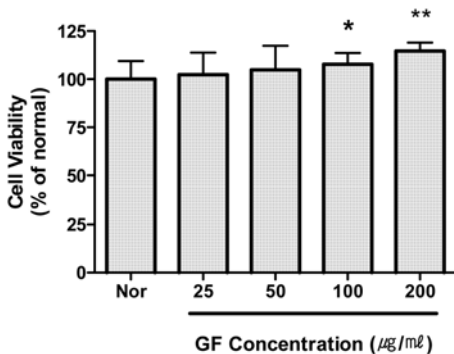


Fig. 1. Effect of GF on Cell Viability in RAW 264.7 Cell.

GF : *Gardeniae Fructus* water extract.
 Nor (Normal) : Treated with media only.
 Cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.
 Results are represented as mean±SD of three independent experiments.
 * : Statistically significant compared with normal (p<0.05)
 ** : Statistically significant compared with normal (p<0.01)

2. NO 생성의 변화

GF는 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 NO의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

3. Ca 생성의 변화

GF는 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 Ca의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 3).

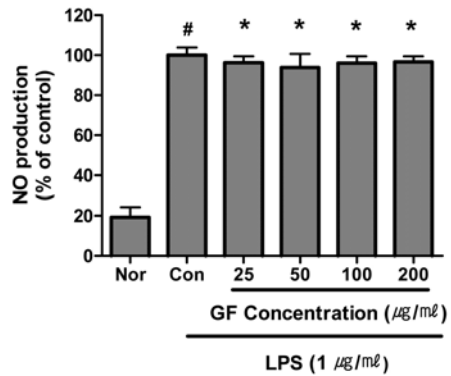


Fig. 2. Effect of GF on NO Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS.

GF : *Gardeniae Fructus* water extract.
 Nor (Normal) : Treated with media only.
 Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only.
 LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.
 Results are represented as mean±SD of three independent experiments.
 # : Statistically significant compared with normal (p<0.05)
 * : Statistically significant compared with control (p<0.05)
 ** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

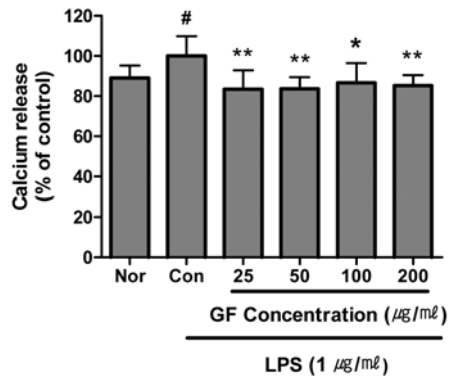


Fig. 3. Effect of GF on Ca Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS.

GF : *Gardeniae Fructus* water extract.
 Nor (Normal) : Treated with media only.
 Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only.
 LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.
 Results are represented as mean±SD of three independent experiments.
 # : Statistically significant compared with normal (p<0.05)
 * : Statistically significant compared with control (p<0.05)
 ** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

4. Cytokine 생성의 변화

1) IL-1 β

GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 IL-1 β 의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 4).

2) IL-10

GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 IL-10의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 5).

3) IL-12p40

GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 IL-12p40의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 6).

4) M-CSF

GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 M-CSF의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 7).

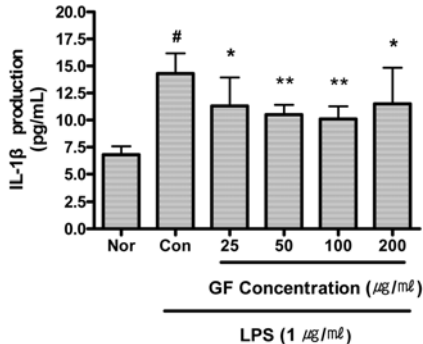


Fig. 4. Effect of GF on IL-1 β Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hrs.

Results are represented as mean \pm SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal ($p < 0.05$)

* : Statistically significant compared with control ($p < 0.05$)

** : Statistically significant compared with control ($p < 0.01$)

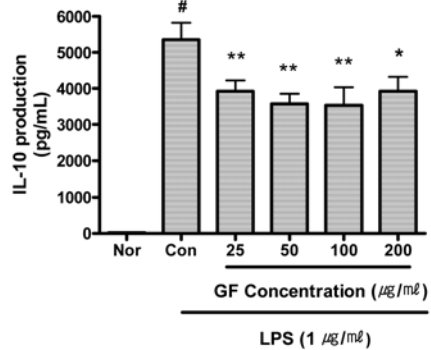


Fig. 5. Effect of GF on IL-10 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS.

GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hrs.

Results are represented as mean \pm SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal ($p < 0.05$)

* : Statistically significant compared with control ($p < 0.05$)

** : Statistically significant compared with control ($p < 0.01$)

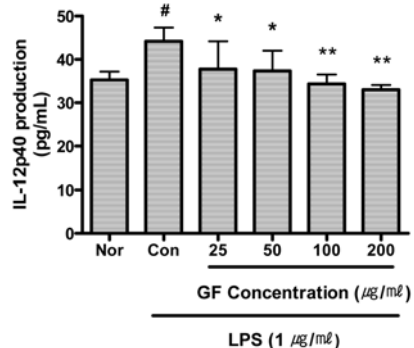


Fig. 6. Effect of GF on IL-12p40 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS.

GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hrs.

Results are represented as mean \pm SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal ($p < 0.05$)

* : Statistically significant compared with control ($p < 0.05$)

** : Statistically significant compared with control ($p < 0.01$)

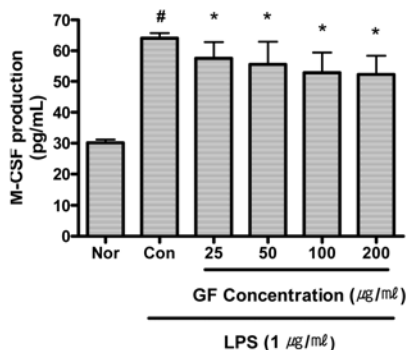


Fig. 7. Effect of GF on M-CSF Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal (p<0.05)

* : Statistically significant compared with control (p<0.05)

** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

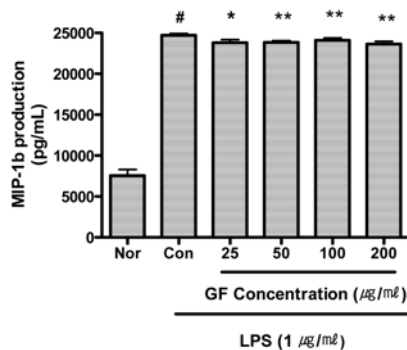


Fig. 8. Effect of GF on MIP-1β production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal (p<0.05)

* : Statistically significant compared with control (p<0.05)

** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

5) MIP-1β

GF는 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 MIP-1β의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 8).

6) KC

GF는 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 KC의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 9).

7) VEGF

GF는 25, 50 및 100 µg/ml의 농도에서 VEGF의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 10).

8) G-CSF

GF는 25, 50 및 100 µg/ml의 농도에서 G-CSF의 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 11).

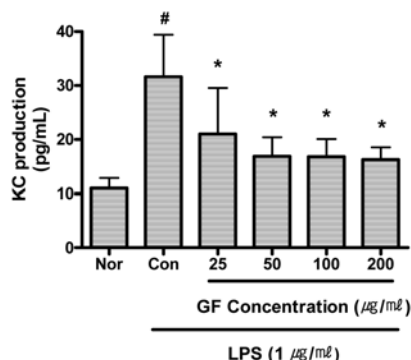


Fig. 9. Effect of GF on KC Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal (p<0.05)

* : Statistically significant compared with control (p<0.05)

** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

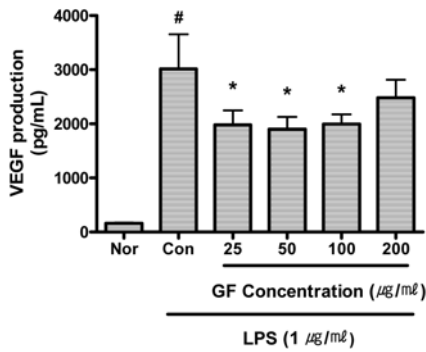


Fig. 10. Effect of GF on VEGF Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs. Results are represented as mean±SD of three independent experiments. # : Statistically significant compared with normal (p<0.05) * : Statistically significant compared with control (p<0.05) ** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

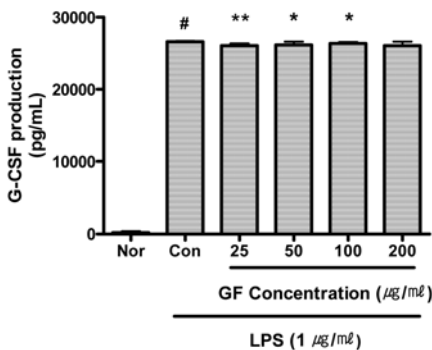


Fig. 11. Effect of GF on G-CSF Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs. Results are represented as mean±SD of three independent experiments. # : Statistically significant compared with normal (p<0.05) * : Statistically significant compared with control (p<0.05) ** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

control (p<0.01)

9) MCP-1

GF는 25, 50 및 100 µg/ml의 농도에서 MCP-1의 생성을 유의하게 억제하였다 (Fig. 12).

10) GM-CSF

GF는 25 및 50 µg/ml의 농도에서 GM-CSF의 생성을 유의하게 억제하였다 (Fig. 13).

11) RANTES

GF는 25 및 50 µg/ml의 농도에서 RANTES의 생성을 유의하게 억제하였다 (Fig. 14).

12) MIP-2

GF는 50 및 100 µg/ml의 농도에서 MIP-2의 생성을 유의하게 억제하였다 (Fig. 15).

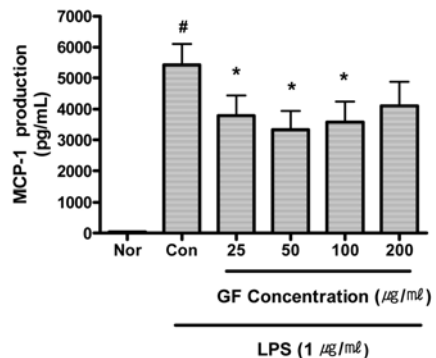


Fig. 12. Effect of GF on MCP-1 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs. Results are represented as mean±SD of three independent experiments. # : Statistically significant compared with normal (p<0.05) * : Statistically significant compared with control (p<0.05) ** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

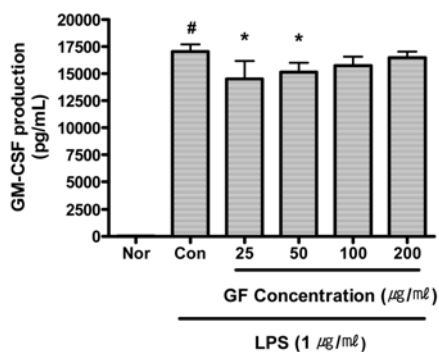


Fig. 13. Effect of GF on GM-CSF Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal (p<0.05)

* : Statistically significant compared with control (p<0.05)

** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

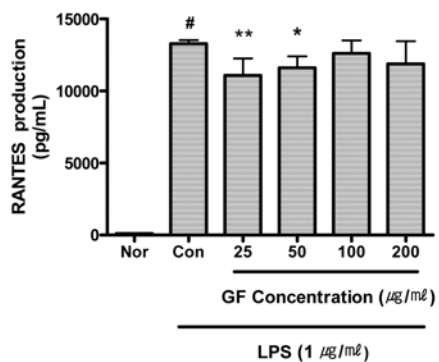


Fig. 14. Effect of GF on RANTES Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract.

Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs. Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal (p<0.05)

* : Statistically significant compared with control (p<0.05)

** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

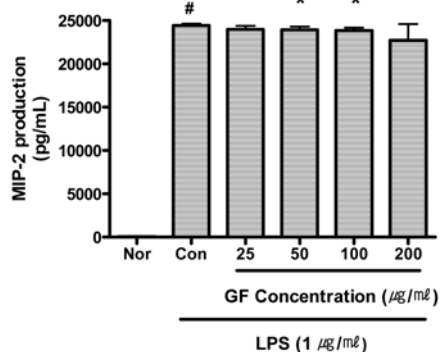


Fig. 15. Effect of GF on MIP-2 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract.

Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal (p<0.05)

* : Statistically significant compared with control (p<0.05)

** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

13) TNF-α

GF는 50 및 200 µg/ml의 농도에서 TNF-α의 생성을 유의하게 억제하였다 (Fig. 16).

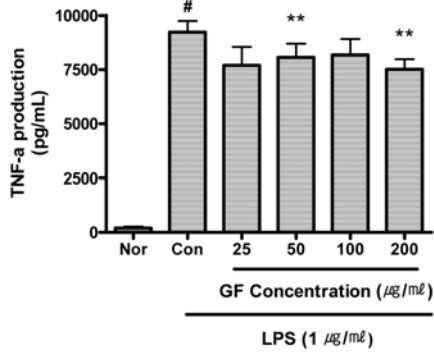


Fig. 16. Effect of GF on TNF- α Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. GF : *Gardeniae Fructus* water extract. Nor (Normal) : Treated with media only. Con (Control) : Treated with LPS (1 μ g/ml) only. LPS-induced cells were incubated with GF at the concentration of 25, 50, 100, 200 μ g/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean \pm SD of three independent experiments.

: Statistically significant compared with normal (p<0.05)

** : Statistically significant compared with control (p<0.01)

IV. 고찰

세포손상을 일으키는 자극은 생체에서 염증이라는 반응을 일으키는데, 여기서 염증이란 세포손상의 원인을 제거하거나 회색하기 위한 방어기전이며 혈관을 가진 결합조직에서 볼 수 있는 복합적 반응으로, 손상된 조직을 회복시킨다²⁾.

그러나 이러한 염증반응이 과도할 경우에는 오히려 해로운 결과를 초래하기도 하는데, 따라서 염증반응은 그 정도가 매우 중요하다. 불충분한 반응은 면역 결핍상태로 감염 및 암 등으로 발전될 수 있고, 과도한 염증 반응은 류마티스관절염, 크론병, 다발성경화 등의 다양한 자가면역질환을 비롯하여 동맥경화, 당뇨병, 알츠하이머질환, 뇌경색 및 심근

경색과 같은 질병을 발생시키고 질병의 이환률 및 사망률을 증가시킨다. 그러므로 개체의 건강 및 항상성을 유지하기 위해서는 염증에 대한 항염증반응의 효과적인 조절이 필요하다¹⁶⁾.

대식세포는 외부에서 세균이나 바이러스와 같은 병원체가 침범했을 때, 다양한 염증매개물질을 왕성하게 분비하는데¹⁷⁾, 이들은 혈관확장과 발열, 동통 등의 광범위한 작용을 나타낸다¹⁸⁾. 또한, LPS의 자극에 의해 NO와 Ca, 그리고 IL, chemokine 및 growth factor 등의 cytokine을 분비하기도 한다. 염증매개물질은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하기도 하지만, 적절히 조절되지 못하고 과도하게 분비될 때에는 오히려 급·만성염증질환을 유발한다. 따라서 이 대사과정을 억제하는 약물이 항염증약으로 개발되어 사용되고 있다¹⁹⁾.

梔子は 上中下 三焦의 火熱을 瀉하고 絞하여 淸肝, 涼血止血調經하는 약재로²⁰⁾ 淸熱瀉火藥으로 분류되고 性味는 寒 苦하다⁷⁾. 또한 임상적으로는 간질환을 비롯하여 충혈, 출혈, 그리고 진정 및 소염 등의 치료 목적으로 사용되어 왔다²¹⁾.

梔子は 항염작용과 관련된 많은 연구 이외에도 항산화작용²²⁾을 비롯한 항균 및 항바이러스²³⁾, 항불안²⁴⁾ 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 梔子の 주성분인 crocetin과 crocin, genipin, geneposide 등의 효과에 대해서도 활발히 연구되고 있다^{25,26)}. 그리고 부인과영역에서는 산욕기 감염 유발 인자인 *P. vulgaris* 세균의 생육억제 효과와 관련된 연구가 있었다²⁰⁾. 이처럼 梔子は 다양한 질환의 치료제로 활용되고 있으며, 이와 관련된 연구들이 여러 분야에서 진행되고 있다.

이번 연구에서는 항염작용이 있는 것으로 알려져 있는 梔子の 효과를 확인하기 위하여 梔子が LPS의 자극으로 인한 마우스 대식세포의 NO 및 Ca의 생성과 cytokine의 생성에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 梔子の 항염작용과 관련된 기존 연구에서는 구체적인 염증매개물질의 발현과 면역조절에 대해서는 상세히 연구된 바가 없었다. 이에 저자는 梔子が 염증매개물질, 즉 chemokine을 비롯한 growth factor, 그리고 IL 등의 다양한 종류의 cytokine 발현에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

GF의 항염효과를 확인하기 이전, 梔子の 임상활용을 위해서 GF의 세포독성 여부를 확인하였다. GF의 세포생존율을 측정된 결과 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

NO는 혈관에서 강력한 혈관확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 호중구나 혈소판이 혈관내피세포에 부착하는 것을 막는 역할을 하지만²⁷⁾, 염증상태의 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개물질의 합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 이 연구에서 GF를 RAW 264.7 cell에 처리한 결과 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 NO 생성증가를 유의하게 억제하였다.

Ca는 Toll-like receptor 신호전달체계의 활성화로 증가하게 되고, 대식세포 내의 생성이 증가되면 다양한 염증매개물질의 생성을 촉진한다²⁹⁾. 이번 연구에서 GF를 RAW 264.7 cell에 처리한 결과 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 Ca 생성증가를 유의하게 억제하였다.

Cytokine이란 면역담당세포 이외의 다른 세포들이 분비하는 다양한 면역조절물질 및 생리활성물질을 총칭하는 것으로³⁰⁾, 특이적인 세포 수용체에 결합하여 면역세포의 활성화와 성장을 조절하고 정상 혹은 병적인 염증반응과 면역반응을 매개한다³¹⁾.

IL-1β는 단핵구와 대식세포에 의해 생산되는 cytokine으로 Th cell을 활성화시키고, T cell에서 분비되는 IL-2와 같은 cytokine의 활성을 증진시키는 등 면역반응의 방아쇠 기능을 함으로서 cytokine network에 중요한 역할을 한다^{30,32)}. 이번 연구에서 GF는 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 IL-1β 생성증가를 유의하게 억제하였다.

IL-10은 T cell, B cell, 단핵구 및 대식세포에서 생성되는 anti-inflammatory cytokine으로, 면역과 염증반응을 억제하는 작용을 한다. IL-12는 heterodimeric cytokine으로 p35와 p40 subunit으로 이루어져 있으며, IL-12는 proinflammatory cytokine으로 대식세포와 호중구 및 다른 antigen-presenting cell에 의해 생성된다. 이와 같은 IL-10과 IL-12는 Th1 cell과 Th2 cell 사이에서 균형을 조절한다³³⁾. 이번 연구에서 GF는 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 IL-10과 IL-12p40의 생성증가를 유의하게 억제하였다.

M-CSF는 조골세포나 간엽줄기세포에서 생성되고, 파골세포의 생성에 관여하며, 골수에서의 단핵구 생성을 자극함과 동시에 세포의 외부물질과 이물질의 탐식·살균작용을 활성화 한다³⁴⁾. 이 연구에서 GF는 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 M-CSF 생성증가를 유의하게 억제하였다.

MIP-1 β 는 C-C chemokine의 하나로서 면역반응과 염증반응에 작용하며, 특히 단핵구와 T cell 및 호산구 등에 대한 화학주성작용을 갖고 있다³⁵⁾. 이 연구에서 GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 MIP-1 β 생성증가를 유의하게 억제하였다.

KC는 주로 내피세포와 섬유아세포 등의 조직세포와 거핵세포 및 활성화된 단핵구에 의해 생성되고, 급성 염증 반응의 매개자로서 다른 chemokine보다 먼저 나타나 우선적으로 호중구에 작용하는데, 이는 사람의 경우 IL-8에 해당한다³⁶⁾. 이 연구에서 GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 KC 생성증가를 유의하게 억제하였다.

VEGF는 혈관의 형성과 증식에 관여하는 인자로서 악성종양의 급속한 성장과 전이에 영향을 주어 악성도와 상관관계가 있는 것으로 알려져 있는데³⁷⁾ 이 연구에서 GF는 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 VEGF 생성증가를 유의하게 억제하였다.

G-CSF는 혈액분화과정의 말기에 작용하여 과립구의 증식을 촉진하는데, 과립구 중 호중구의 분화, 증식, 활성화 과정에만 특이하게 작용하는 것으로 암화학요법 후에 수반되는 호중구 감소증의 치료약으로 널리 이용되며, 특히 골수간세포나 내독소 TNF- α , interferon 등에 의해 활성화된 대식세포와 내피세포 등에서 생성된다³⁸⁾. 이 연구에서 GF는 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 G-CSF 생성증가를 유의하게 억제하였다.

MCP-1은 백혈구에서 처음 분리되었고, 혈관내피세포, 평활근세포, 단핵구 및 대식세포 등에서 IL-1, IL-4, TNF- α 등

의 염증성 cytokine에 반응하여 발현된다³⁹⁾. 혈관내벽에 감염으로 인한 염증이 발생하면 MCP-1의 발현이 증가하게 되는데, 이때 그 수용체인 chemokine receptor 2를 발현하는 세포들이 염증부위로 이동하여 활성화되고 혈관벽으로 침투하게 된다⁴⁰⁾. 이 연구에서 GF는 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MCP-1 생성증가를 유의하게 억제하였다.

GM-CSF는 CD116으로 불리며, 비만세포와 대식세포 및 T cell 등에서 분비되고, 혈액분화과정의 초기 및 말기에 작용하여 호중구와 호염구 및 호산구 등의 과립구와 대식세포의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁴¹⁾. 이 연구에서 GF는 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 GM-CSF 생성증가를 유의하게 억제하였다.

RANTES는 C-C chemokine의 하나로서 염증반응에 관여하는데, 주로 활성화된 T cell과 일부 혈소판에서 분비되고 memory type CD-4 T cell과 호산구 및 염기구의 화학주성⁴²⁾, 그리고 호산구의 과립분비와 염기구에서의 히스타민 분비에 관여한다⁴³⁾. 이 연구에서 GF는 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 RANTES 생성증가를 유의하게 억제하였다.

MIP-2는 호중구의 증가와 활성화에 관여하는 C-X-C chemokine으로, 호중구의 화학주성을 가지며, 사람의 경우에는 IL-8에 해당되고⁴⁴⁾ TNF- α 와 IL-1 β 는 폐에서의 MIP-2 생성을 자극하는 것으로 알려져 있다⁴⁵⁾. 이 연구에서 GF는 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MIP-2 생성증가를 유의하게 억제하였다.

TNF- α 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되는데, 종양세포에서는 세포 독

작용을 하고 염증세포에서는 IL-1과 유사한 염증유발작용을 하며 세포의 증식과 분화를 조절한다⁴⁶⁾. 또한, 호중구를 자극하여 탐식작용과 탈과립작용을 증가시킴으로써 염증반응에서 중요한 역할을 하는데, 최근에는 TNF- α 를 차단하는 약물들이 염증치료제로 연구되고 있다⁴⁷⁾. 이 연구에서 GF는 50 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TNF- α 생성증가를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과, GF는 세포독성을 나타내지 않았고, LPS의 자극으로 유의하게 증가된 마우스 대식세포 RAW 264.7 cell의 NO와 Ca 생성증가를 모든 농도에서 억제하였으며, IL-1 β , IL-10, IL-12p40, M-CSF, MIP-1 β , KC, VEGF, G-CSF, MCP-1, GM-CSF, RANTES, MIP-2 및 TNF- α 등 다양한 종류의 cytokine의 생성증가 또한 유의하게 억제함으로써 세포내의 항염반응의 증진과 면역반응의 안정을 도모하는 효과가 있었다. 즉, 梔子는 대식세포의 염증매개물질의 생성을 억제함으로써 과잉염증반응을 조절할 수 있으며, 이로써 과잉염증반응으로 인해 나타나게 되는 많은 질병의 치료와 예방에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

GF를 대상으로 마우스 대식세포 RAW 264.7 cell의 세포생존율과 LPS로 유발된 NO와 Ca 생성, 그리고 IL-1 β , IL-10, IL-12p40, M-CSF, MIP-1 β , KC, VEGF, G-CSF, MCP-1, GM-CSF, RANTES, MIP-2, TNF- α 등의 다양한 cytokine의

생성증가에 대한 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. GF는 세포독성을 나타내지 않았다.
2. GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 NO 및 Ca의 생성을 유의하게 억제하였다.
3. GF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 IL-1 β , IL-10, IL-12p40, M-CSF, MIP-1 β 및 KC의 생성을 유의하게 억제하였다.
4. GF는 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 VEGF, G-CSF 및 MCP-1의 생성을 유의하게 억제하였다.
5. GF는 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 GM-CSF 및 RANTES의 생성을 유의하게 억제하였다.
6. GF는 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MIP-2의 생성을, 50 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TNF- α 의 생성을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과는 梔子が 대식세포의 염증매개물질의 생성을 억제함으로써 과잉염증반응을 조절할 수 있는 항염효과가 있음을 의미한다.

- 투 고 일 : 2013년 10월 21일
- 심 사 일 : 2014년 2월 4일
- 게재확정일 : 2014년 2월 10일

참고문헌

1. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420:846-52.
2. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1998:

- 65-6, 68-9.
3. Higuchi M, et al. Cytolytic mechanisms of activated macrophage. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol*. 1990;144(4):1425-31.
 4. 박철영, 유형준. 염증과 비만. *대한내분비학회지*. 2004;19(2):97-108.
 5. Capobianco A, Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front Immunol*. 2013;4:9.
 6. Hutter S, et al. Macrophages: Are they involved in endometriosis, abortion and preeclampsia and how? *J Nippon Med*. 2013;80(2):97-103.
 7. 한의과대학 본초학 편저위원회. *본초학*. 서울:영림사. 2004:210.
 8. Bergonzi MC, et al. Identification and quantification of constituents of *Gardenia jasminoides* Ellis (Zhizi) by HPLC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry*. 2012;134(2):1199-204.
 9. Yu Y, et al. Chemical constituents from the fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Fitoterapia*. 2012;83(3):563-7.
 10. Fu Y, et al. Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models. *International Immunopharmacology*. 2012;14:792-8.
 11. Koo HJ, et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol*. 2004;495:201-8.
 12. Koo HJ, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J Ethnopharmacol*. 2006;103(3):496-500.
 13. Nam KN, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *Eur J Pharmacol*. 2010;648:110-6.
 14. Politch JA, et al. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Human Reproduction*. 2007;22(11):2928-35.
 15. Lee KS, et al. Bioplex analysis of plasma cytokines in alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Immunology Letters*. 2008;121(2):105-9.
 16. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*. 2002;113(Suppl1A):5-13.
 17. 박완수. Gallic acid가 Lipopolysaccharide로 활성화된 마우스 대식세포의 케모카인과 성장인자 생성에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2010;24(4):586-91.
 18. 김재은 등. 마우스 대식세포(RAW 264.7 cell)에 대한 小陷胸湯의 항염증효과. *동의생리병리학회지*. 2010;24(1):61-6.
 19. 김범준 등. Macrophage RAW 264.7 cell 세포와 아토피성 피부염이 유도된 NC/Nga Mice에서 AF-343에 의한 염증 억제 효과와 피부 보습 효과에 관한 연구. *대한의진균학회지*. 2010;15(2):61-76.
 20. 임은미. 여성본초학. 부천:전국의학사. 2005:260-2.
 21. 민동훈 등. 화상 및 창상에 대한 자근·치자 복합제제의 경피 흡수 및 치료

- 효과. 약제학회지. 2005;35(4):255-63.
22. Debnath T, et al. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. *Food Chemistry*. 2011;128(3):697-703.
 23. Lin YJ, et al. Inhibition of enterovirus 71 infections and viral IRES activity by *Fructus gardeniae* and geniposide. *Eur J Med Chem*. 2013;62:206-13.
 24. Toriizuka K, et al. Anxiolytic effect of *Gardeniae fructus*-extract containing active ingredient from kamishoyosan (KSS), a Japanese traditional kampo medicine. *Life Sciences*. 2005;77(24):3010-20.
 25. Kuratsune H, et al. Effect of crocetin from *Gardenia jasminoides* Ellis on sleep: A pilot study. *Phytomedicine*. 2010;17(11):840-3.
 26. Zheng X, et al. Identification of a new anti-LPS agent, geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, and its ability of direct binding and neutralization of lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *International Immunopharmacology*. 2010;10:1209-19.
 27. 지병철, 문신용. Nitric oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시에 미치는 영향. *대한산부회지*. 2002;45(5):766-73.
 28. Ryu JH, et al. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytotherapy Research*. 2003;17:485-9.
 29. Lehnardt S, Massillon L, Follett P. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8514-9.
 30. 이귀녕, 권오협. 임상병리파일. 서울:의학문화사. 2003:717-8, 721, 754.
 31. 대한내과학회. HARRISON'S 내과학(2). 서울:MIP. 2004:1861.
 32. 대한진단검사의학회. 진단검사의학. 서울:고려의학. 2001:429-31, 433.
 33. 강재성. 세포분자면역학. 서울:범문사. 2004:255, 261, 337, 494.
 34. Osdoby P, et al. Osteoclast development the cell surface and the bone environment. *Ciba Foundation Symposium*. 1988:136:108-24.
 35. Baek SI, et al. The cholesterol-binding antibiotic nystatin induces expression of macrophage inflammatory protein-1 in macrophage. *Biomolecules and Therapeutics*. 2013;21(1):42-8.
 36. Bischoff SC, et al. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med*. 1992;175(5):1271-5.
 37. Guidi AJ, et al. Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(16):1237-45.
 38. Glaspy JA, Goldie DW. Granulocyte colony stimulation factor(G-CSF): preclinical and clinical studies. *Seminars in Oncology*. 1992;19:386.
 39. Rollins BJ, Pober JS. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion

- of MCP-1/JE by human endothelial cells. *American Journal of Pathology*. 1991;138:1315-9.
40. 임준희, 권태규. Luteolin의 IL-1 β 에 의한 MCP1 단백질 발현 증가에 미치는 영향. *생명과학회지*. 2009;19(4):514-9.
41. Geijsen N, Koenderman L, Coffers PJ. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cytokine & Growth Factor Review*. 2001;12(1):19-25.
42. Schall TJ, et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990;347:669.
43. 이양근, 김재현, 이용철. 기관지 천식 환자에서 기관지 특이항원 유발검사 후 RANTES 농도의 변화. 결핵 및 호흡기 질환. 1996;43(2):182-9.
44. Xu WB, et al. Induction of macrophage inflammatory protein 2 gene expression by interleukin 1 β in rat lung. *Thorax*. 1995;50:1136-40.
45. Heidemann SM, Glibetic M. Comparison of the systemic and pulmonary inflammatory response to endotoxin of neutropenic and non-neutropenic rats. *Journal of Inflammation*. 2007;30(4):7.
46. Pierce BT, et al. The effect of fetal acidemia on fetal-placental vascular tone and production of inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *AJOG*. 2002;187(4):894-7.
47. Landen CN, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *AJOG*. 2003;188(5):1174-6.