

## Anti-inflammatory Effect of *Scutellaria baicalensis* Hot Water Extracts Containing Baicalin on Modulation of the Immune System in Raw264.7 Cells

Hye-jung Park<sup>1</sup>, Sang-Min Kim<sup>1</sup>, Hyun-Ju Kwon<sup>2</sup>, Hyun-Tae Lee<sup>2</sup>, Byung-Woo Kim<sup>2</sup>, Tae Hoon Kim<sup>3</sup> and Moon-Moo Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Life Science & Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Herval Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

Received October 23, 2013 / Revised December 6, 2013 / Accepted December 9, 2013

The immune system protects the body from bacterial infection and disease, as well as cancer that develops following the mutation of cells. Aging exerts adverse effects on the immune system, such as chronic inflammation, resulting in rheumatoid arthritis. The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effectiveness of *Scutellaria baicalensis*, which contains baicalin. HPLC analysis showed that *S. baicalensis* hot water extracts (SBWE) contained 42.2 mg/g of baicalin. To evaluate the cytotoxicity of SBWE, an MTT assay was carried out in Raw264.7 cells. No cytotoxicity was observed below 160 µg/ml of SBWE. SBWE at 40 µg/ml reduced the amount of nitric oxide produced by macrophages stimulated with lipopolysaccharide by 40%. In addition, SBWE inhibited phagocytosis stimulated with zymosan. Furthermore, the content of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) produced by the macrophages was decreased in the presence of SBWE in a dose-dependent manner. SBWE also inhibited the production of interleukin-1 beta (IL-1 β) in a time course experiment. Moreover, treatment with 20 µg/ml of SBWE remarkably decreased the expression level of cyclooxygenase-2. The results provide evidence that SBWE may exert an anti-inflammatory effect through modulation of the immune system.

**Key words** : Interleukin-1 beta, macrophage, phagocytosis, *Scutellaria baicalensis*, tumor necrosis factor-alpha

### 서 론

염증은 외부로부터 박테리아나 바이러스와 같은 외부 항원이 체내로 침입하거나 세포나 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상 받았을 때 그 손상에 대한 조직 반응을 일컫는다[15]. 염증세포는 종양의 개시 및 증진에서 DNA 손상을 야기하는 활성 질소 및 산소 종과 같은 다양한 염증전 매개인자를 방출한다[5]. 염증은 크게 급성염증(acute inflammatory)과 만성염증(chronic inflammatory)으로 분류되며, 만성적으로 염증반응이 일어날 경우 염증전 cytokines과 chemokines이 과도하게 방출되어 주변 조직 손상과 더불어 종양세포의 내습, 전이, 이전 그리고 혈관신생을 증진시켜 종양의 성장을 돕는다[5, 12]. 림프구에서 분비되는 interleukin (IL)은 다양한 종류와 기능이 알려져 있으며 특히 Interleukin-1β (IL-1 β)와 -6 (IL-6)

는 급성염증과 만성염증을 매개하는 인자이다. 또한 Interleukin은 대식세포의 식세포작용을 활성화시키고, T cell과 B cell을 활성화시켜 급성염증 혹은 만성염증을 유발한다. 과도하게 방출된 염증매개인자는 인슐린 저항성을 높이고 동맥경화와 같은 다양한 질병을 초래한다. 다양한 자극과 염증전매개인자에 의해 활성화된 macrophage는 다른 염증전매개인자, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-alpha (TNFα), interleukin-1β (IL-1β) 그리고 prostaglandin E2 (PGE2)을 생성하고 다른 면역세포들을 염증부위로 유도한다[13]. 더욱이 염증 과정에서 내피 세포, 호중구 그리고 macrophage에서 발생하는 NO와 superoxide ( $\cdot\text{O}_2$ ) 라디칼은 매우 높은 반응성의 산화제인 Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 생성하여 병리적 조직 (pathophysiological tissue)을 유발한다[4, 6]. 뿐만 아니라 macrophage는 식균작용을 통해 외부 항원을 세포막으로 둘러싸 분해한다. Macrophage의 막이 항원을 완전히 둘러싸게 되면 항원은 phagosome이라는 주머니 상태로 macrophage 안으로 들어가게 되고, 이 주머니가 macrophage 내의 lysosome과 융합되어 phagolysosome을 형성하게 된다[2]. Lysosome의 여러가지 산성가수분해효소나 활성화 산소계 물질 (oxygen radical)의 작용에 의해 항원이 분해되며 이때 superoxide와 같은 활성산소종이 생성된다[1]. 따라서 inducible ni-

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1511, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : mmkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

tric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 유전자는 대표적인 염증 인자로 여겨지며 이들의 발현을 억제하는 물질은 잠재적으로 유용한 항염증제로서의 개발가능성이 크게 평가된다[10, 17].

예로부터 황금(*Scutellaria baicalensis*)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 항바이러스, 항균, 항종양, 항고혈압, 배뇨촉진 그리고 지혈에 효과 있어 전통적으로 사용되어오던 동양의 약재이다[7, 19, 21]. 황금의 뿌리는 일반적으로 높은 flavonoids를 함유하고 있으며, 잘 알려진 황금의 대부분의 항산화 효과는 baicalin, baicalein, oroxylin A 그리고 wogonin과 같은 polyhydroxyflavonoids에서 관찰되었다[3, 11]. 따라서 본 연구는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응을 일으켜 활성화된 Raw264.7 세포에서 황금열수추출물의 iNOS, COX-2, interleukin 그리고 TNF $\alpha$ 와 같은 염증전매개인자에 미치는 영향을 조사하여 항염증 효과를 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료의 제조

본 실험에 사용한 황금은 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 자연 건조한 후, 수 차례 물로 세척하여 세척·건조된 상기 황금을 각각 증류수와 1:10의 중량 %비로 혼합하여 진탕기로 100°C에서 3 시간 동안 진탕하여 2회 반복하여 열수 추출하였고, 얻어진 용액을 합하여 회전 진공 농축하여 용매를 증발시켜 추출물을 얻었다. 상기 추출물을 여과한 후, 여과된 여액을 동결건조하여 분말 형태의 황금 열수추출물(*Scutellaria baicalensis* hot water extracts, SBWE)을 얻는다. 분말형태의 황금 열수추출물을 시험농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

### 바이칼린의 정성 및 정량분석

바이칼린의 정성분석은 바이칼린 지표물질과 황금열수추출액 2  $\mu$ l씩을 박층크로마토그래프용 실리카겔을 써서 만든 박층판에 점적한다. 다음에 아세트산에틸·메탄올·물혼합액(100:17:13)을 전개용매로 하여 약 10 cm 전개한 다음 박층판을 바람에 말린다. 여기에 묽은황산시액을 고르게 뿌린 다음 105°C에서 가열하여 밴드를 확인한다. 바이칼린 지표물질을 이용한 검량선 작성 및 함량분석을 위하여 분쇄된 황금열수추출물 10 mg을 10 ml의 dist. MeOH에 용해하여 syringe filter를 통하여 여과한 후 그 여액 10 ml를 HPLC에 injection 하였음. 이동상의 용매로는 1% formic acid (solvent A)와 MeCN (solvent B)를 사용하였음. Column은 YMC gel ODS A 302, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 ml, USA)을 이용하였고, baicalin에 대해서 각각 280 nm에서 10, 25, 50, 100 mg/ml의 농도로 분석하여 크로마토그램을 얻고 이로부터 평균면적을 얻어 검량곡선을 그리고 여기에 삽입하여 바이칼린을 정량한다.

### 세포배양 및 재료

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000  $\mu$ g/ml 및 2,500  $\mu$ g/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland)로 부터 구입하였다. Raw264.7 세포는 American Type of Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로 부터 제공받았다. Raw264.7 세포는 5% CO $_2$  및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100  $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

### MTT assay

Hansen [8]의 방법에 따라 Raw264.7세포에 대한 황금열수추출물의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

### Nitric oxide assay

Raw264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO $_2$ 의 형태로써 측정하였다. Raw264.7 세포를 DMEM배지를 이용하여 1 $\times$ 10 $^5$  cell/well로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 37°C, 5% CO $_2$ 의 습윤배양기에서 배양하였다. 세포에 SBWE 2.5, 5, 10, 20 그리고 40  $\mu$ g/ml 농도를 전처리하고 1시간 뒤 LPS를 1  $\mu$ g/ml 처리한 뒤 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액과 동량의 Griess 시약을 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 그 비를 %값으로 환산하였다.

### Phagocytosis assay

Raw264.7 세포를 분리하여 DMEM배지를 이용하여 24well plate에 24시간 배양하였다. 세포에 황금 열수추출물 2.5, 5, 10, 20 그리고 40  $\mu$ g/ml 농도를 전처리 하고 1시간 후 배양액을 제거하였다. PBS 1 g/100 ml에 녹인 뒤 30분간 가열과정을 거쳐 활성화시킨 zymosan A 10  $\mu$ l와 NBT (nitroblue tetrazolium) 20  $\mu$ l 그리고 PBS 470  $\mu$ l를 처리하였다. 충분히 섞어준 뒤 620 nm에서 흡광도를 측정하고 그 비를 %값으로 환산하였다.

### 형광법을 이용한 Phagocytosis assay

Raw264.7 세포를 분리하여 DMEM배지를 이용하여 24well plate에 24시간 배양하였음. 세포에 황금 열수추출물 2.5, 5, 10, 20, 그리고 40  $\mu$ g/ml 농도를 전처리 하고 1시간 후 배양액을 제거하였다. FITC conjugated zymosan A 10  $\mu$ l와 DMEM 90  $\mu$ l를 처리하였다. 충분히 섞어준 뒤 형광을 측정하고 그 비를 %값으로 환산하였다.

**Western blot analysis**

Raw264.7 세포에 용출 완충용액(50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30 min 동안 처리하였다. 10 µg의 세포용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전 처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-iNOS, anti-COX-2, anti-IL-1β, anti-TNFα 그리고 anti-βactin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

**RT-PCR analysis**

실험에 사용된 RNA는 황금열수추출물을 전처리 한 뒤 LPS 로 3시간 동안 자극한 Raw264.7 세포로부터 추출하였다. 추출을 위해 세포는 Trizol®로 분해시키고 25°C, 12,000× g에서 15분 동안 원심분리 한 뒤 chloroform을 첨가하였다. Isopropanol은 상등액에 1:1 비율로 첨가되었고 RNA pellet은 원심분리에 의해 얻어졌다. Ethanol로 씻어낸 뒤, 추출된 RNA는 diethyl pyrocarbonate - treated RNase free waster에 녹이고 GENios® microplate reader (Tecan Austria BmbH)를 이용하여 260 nm에서 정량하였다. 같은 양의 RNA (1 µg)는 42°C에서 1X reverse transcriptase (RT) buffer, 1 mM dNTPs, 500 ng of oligo (dT) 15 primers, 140 U of murine Moloney leukaemia virus (MMLV) reverse transcriptase 그리고 40 U of RNase inhibitor를 포함하는 mastermix에 45분 동안 방치함으로써 역전사 되었다. PCR은 TNFα, iNOS 그리고 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA를 증폭시키기 위해 automatic Whatman thermocycler (Bionmetra, Kent, UK)를 사용하여 수행되었다. 원하는 cDNA를 증폭시키기 위해 사용된 프라이머 시퀀스는 다음을 따른다. TNFα (forward primer: 5-TCTCTCTAATCAGCCCTCTG-3, reverse primer: 5-CCAACTGGT TATCTCTCAGC-3), iNOS (forward primer: 5'-AAGCTGAAATGAATGAGGA-3', reverse primer: 5'-GACCTCAGATAATGCAGAGC-3'), G3PDH (forward primer: 5'-TGA AGGTCGGTGTG AAC GGATTITGGC-3' reverse primer: 5'-CATGTA GGCCATGA GGATCCACCAC-3') PCR 생성물을 2% agarose gel에 전기영동 시킨 뒤 ethidium bromide로 염색하였으며, AlphaEase® gel image-analysis software (alpha Inotech, San Leandro, CA, USA)를 사용하여 정량하였다.

**통계처리**

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's test 한 후 p<0.05 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

**결 과**

**바이칼린의 정성 및 정량분석 결과**

황금열수추출물에 함유되어 있는 바이칼린을 정성하기 위하여 박층크로마토 그래피를 수행한 결과 Fig. 1A에서 보는 바와 같이 황금열수추출물 군에서도 지표물질인 바이칼린과 같은 위치에서 밴드가 검출됨을 확인할 수 있었다. 보다 정확하게 바이칼린을 정성하기 위하여 다음에는 HPLC를 이용하여 분석한 결과 Fig. 1B 및 Table 1에서 보는 바와 같이 12.135 분에서 지표물질 바이칼린군과 황금열수추출물군에서 바이칼린 peak가 검출되었다. 이번에는 황금열수추출물에 함유되어 있는 절대 바이칼린 함량을 정량하기 위하여 HPLC를 이용하여 바이칼린 지표물질 10, 25, 50, 100 mg/ml의 농도로 검량곡선을 Fig. 1C에서와 같이 그리고 황금열수추출물의 결과를 삽입하여 바이칼린의 절대함량을 구한 결과 Table 2에서와 같이 42.2 mg/g 바이칼린이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

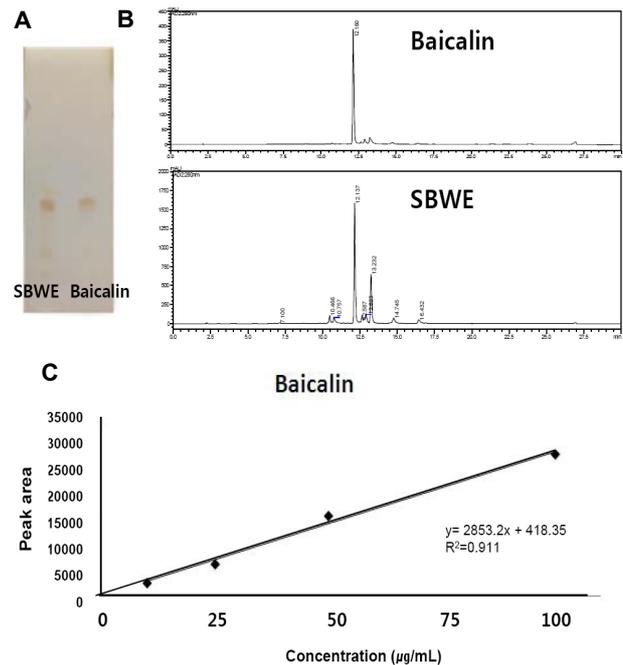


Fig. 1. Qualitative and quantitative analyses of baicalin contained in SBWE. (A) TLC analysis of hot water extract of SBWE and baicalin. (B) HPLC analysis of hot water extract of SBWE and baicalin. (C) Calibration curve of the standard baicalin in the range of 0.005 mg/ml to 0.1 mg/ml.

Table 1. Relative contents of baicalin in contained in SBWE

Rt	Area (%)	Rt	Area (%)
10.461	3.8349	13.231	23.7958
10.754	3.4935	14.743	5.2270
12.135 (Baicalin)	49.9151	16.431	2.8003
12.629	4.3989	Total	31.8231
12.890	6.5345	22.074	3.2020

Table 2. Quantative analysis of baicalin contained in SBWE using calibration curve equations of the standard baicalin

Sample No.	Retention time (min)	Contents	Equation
Baicalin <sup>a</sup>	3.8	42.2 mg/g	$y = 2853.2x + 418.35$ $R^2=0.991$

**황금열수추출물의 세포 독성**

황금열수추출물의 대식세포에 독성을 미치지 않는 농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 황금열수추출물은 농도가 증가함에 따라 세포독성을 나타내었다. 따라서 황금열수추출물은 160 µg/ml 이하의 범위에서는 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다.

**황금열수추출물의 Nitric oxide (NO) 생성억제 효과**

LPS (Lipopolysaccharide)에 의해 Raw264.7 세포로부터 생성되는 NO에 대한 황금 열수추출물의 억제효과를 세포배양액으로부터 Griess assay 방법에 의해 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 황금열수추출물의 2.5, 5, 10, 20, 그리고 40 µg/ml 처리농도에서 NO의 생성억제 효과를 측정할 결과 80

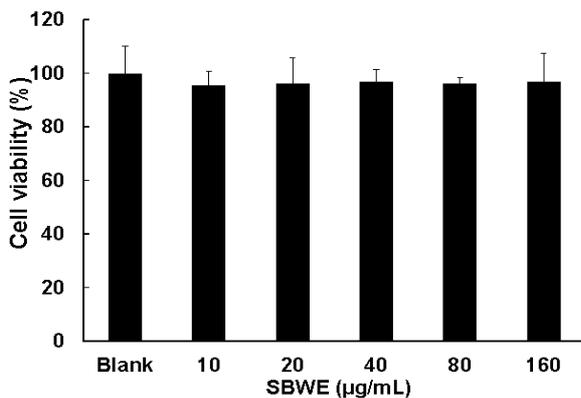


Fig. 2. Effect of SBWE on viability of Raw264.7 cells. The cells were treated with SBWE at the indicated concentration and cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ) using Student's *t* test.

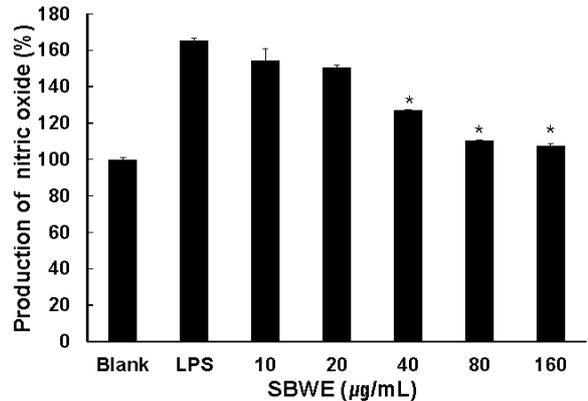


Fig. 3. Effect of SBWE on nitric oxide in Raw264.7 cells. The cells cultured in phenol red and serum-free media were pretreated with different concentrations of SBWE for 1 hr and stimulated with a 1 µg/ml of LPS for 48 hr. Conditioned medium was mixed with an equal amount of the Griess reagent and the absorbance, measured at 550 nm, represented the amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (stable oxidation product of NO) in the medium. The values obtained were compared with those of standard concentrations of sodium nitrite dissolved in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), and the concentrations of nitrite in conditioned media of sample-treated cells were calculated. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (\*,  $p < 0.05$ ) using Student's *t* test.

µg/ml의 농도로 처리한 세포군에서 NO의 생성 함량은 대조군과 비교했을 때 약 50% 정도의 소거능을 보여 공시험군과 비슷한 수준의 NO 생성량을 나타내었다.

**황금열수추출물의 대식세포의 식균작용 억제 효과**

황금열수추출물의 Zymosan A에 의해 활성화된 Raw264.7 세포의 식균작용 억제능을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 NBT 발색법을 이용하여 식균작용 억제능을 조사한 결과 zymosan A 처리 하에서 황금 열수 추출물은 20 µg/ml의 농도 이상에서 약 20% 정도의 식균작용 억제능을 나타내었다.

**황금열수추출물의 대식세포의 식균작용 억제 효과**

황금열수추출물의 Fluoro conjugated-Zymosan A에 의해 활성화된 Raw264.7 세포의 식균작용 억제능을 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 fluoro conjugated-zymosan A 처리 하에서 황금 열수 추출물은 2.5 µg/ml의 농도 이상에서 약 30% 정도의 식균작용 억제능을 나타내었다.

**황금열수추출물의 염증관련 cytokine의 단백질 발현 조절 효과**

황금 열수추출물의 염증관련 cytokine의 단백질 수준에서

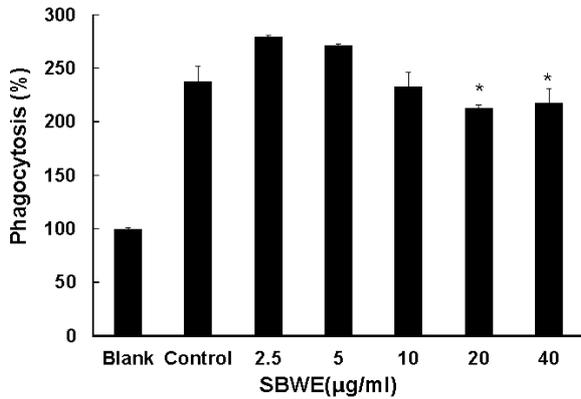


Fig. 4. Inhibition effect of SBWE on phagocytosis induced by zymosan A. Phagocytosis of RAW264.7 cells was evaluated by NBT. Cells cultured were pretreated with different concentrations of SBWE for 1 hr and stimulated with a Zymosan A for 6 hr. Data are given as means of values  $\pm$  SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's *t* test.

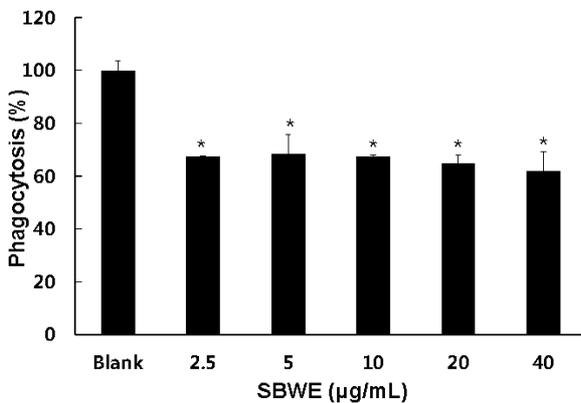


Fig. 5. Inhibition effect of SBWE on phagocytosis induced by fluoro conjugated-zymosan A. Phagocytosis of RAW 264.7 cells was evaluated by fluorescence. Cells cultured were pretreated with different concentrations of SBWE for 1 hr and stimulated with a Zymosan A for 6 hr. Data are given as means of values  $\pm$  SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (\*,  $p < 0.05$ ) using Student's *t* test.

의 발현 억제효과를 조사하였다. 황금열수추출물로 전 처리된 Raw264.7 세포에 LPS로 자극하였고,  $\beta$ -actin으로 단백질의 정량화를 나타내었다. TNF $\alpha$ 는 활성화된 macrophage에서 분비되어 염증반응을 일으키는 cytokine으로, Fig. 6에서 보는 바와 같이 황금열수추출물은 농도의존적으로 TNF $\alpha$ 의 발현을 억제하였다. 또한 iNOS와 COX-2의 단백질 수준에서의 발현 억제효과를 조사한 결과 황금 열수추출물은 20  $\mu$ g/ml의 농도 이상에서 효과적으로 COX-2의 발현을 억제하였다. 또한 황금 열수추출물은 20  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 iNOS의 단백질 발현

수준을 공시험군과 비슷한 수준까지 억제하였다. 다음으로 급성염증과 만성염증을 유발한다고 알려진 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )와 interleukin-6 (IL-6)의 단백질 발현조절 효과를 조사한 결과, 황금열수추출물 처리군에서 IL-6의 단백질 발현 수준에는 변함이 없었으나 IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현 수준은 감소하였다.

#### 황금열수추출물의 시간에 따른 염증관련 cytokine의 단백질 발현 조절 효과

황금 열수추출물의 TNF $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  단백질 발현 조절효과를 시간에 따라 조사하기 위해 황금열수추출물이 전 처리된 Raw264.7 세포에 1, 2, 4, 8 그리고 16 시간 동안 LPS로 자극하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 Raw264.7 cells는 LPS 처리 1시간부터 TNF $\alpha$ 의 단백질 발현 증가 양상을 나타냈으며 양성 대조군인 양성 대조군은 Dexamethasone처리 시간에 따라 TNF $\alpha$ 의 단백질 발현을 억제시켰다. 황금 열수 추출물 역시 처리 시간에 따라 LPS 처리군과 비교하여 TNF $\alpha$ 의 단백질 발현 수준을 억제시켰다.

#### 황금열수추출물의 TNF $\alpha$ 및 iNOS의 유전자발현에 대한 효과

실험에 사용된 RNA는 황금열수추출물을 전처리 한 뒤 LPS로 3시간 동안 자극한 Raw264.7 세포로부터 추출하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 황금열수추출물은 LPS 자극 3시간 만에 iNOS의 발현 억제효과는 나타나지 않았으나, 양성대조군으로 사용된 Dexamethasone은 iNOS의 발현정도를 매우 감소시켰다. 또한 TNF $\alpha$ 의 mRNA 발현정도는 황금열수추출물의 농도가 증가함에 따라 감소되었다.

### 고 찰

염증반응은 외부 항원의 체내로의 침입과 손상된 세포 및 조직의 제거를 위해 필수적인 과정이지만, 과도한 염증반응은 주변 조직손상과 질병의 악화를 초래하고 종양의 성장을 돕는다[6]. 또한 염증반응에서 생성되는 NO 혹은 superoxide와 같은 활성 질소, 산소종에 의해 체내 세포 및 조직 손상이 일어나고 이것이 다시 염증의 원인이 되어 끊임없이 염증반응이 일어나게 된다[18]. 따라서 정상적인 수준의 염증반응을 유지하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서 황금열수추출물은 LPS로 자극된 Raw264.7 세포에서 농도가 증가함에 따라 macrophage의 식균작용과 NO 생성을 유의성 있게 억제하였다. 이전의 연구는 황금열수추출물이 macrophage의 NO 생성을 억제한다고 보고했으며 우리의 연구결과와도 일치한다[11, 20]. 이는 황금열수추출물이 과도하게 진행되는 염증반응을 유익적으로 억제하는 결과라고 사료된다. 염증반응에서 NO는 활성화된 대식세포에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성된다. 황금열수추출물은 LPS 자극된 Raw264.7

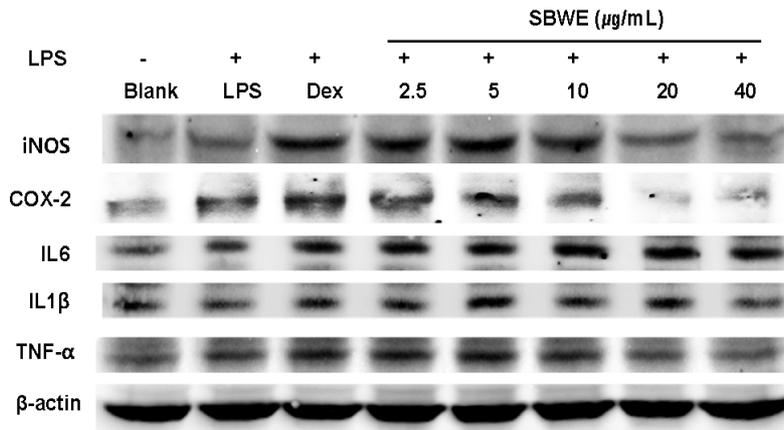


Fig. 6. Effect of SBWE on protein expressions of TNF $\alpha$ , iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$  and in Raw 264.7 cells. The cells were treated with SBWE at 2.5, 5, 10, 20 and 40  $\mu$ g/ml prior to stimulation of cells with LPS at 1  $\mu$ g/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated.

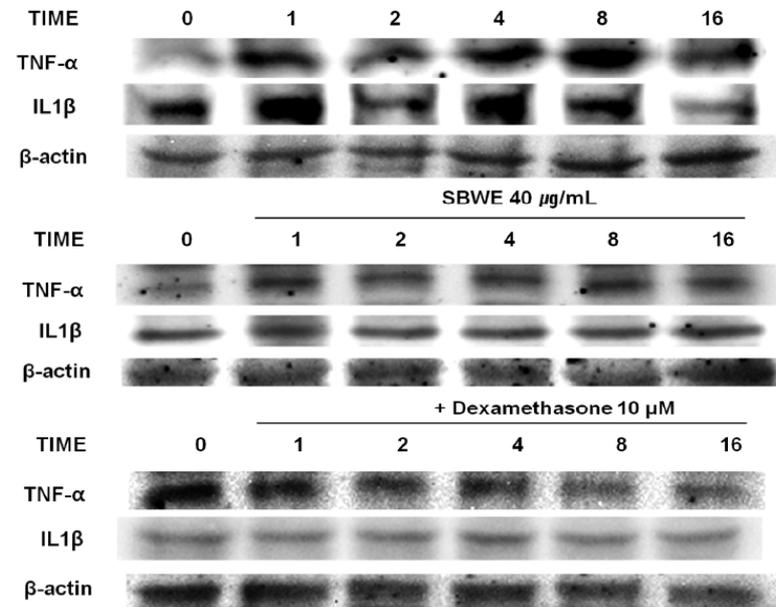


Fig. 7. Effect of SBWE on protein expressions of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in Raw264.7 cells with time. The cells were treated with SBWE at 40  $\mu$ g/ml prior to stimulation of cells with LPS at 1  $\mu$ g/ml for 1, 2, 4, 8 and 16 hr. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated.

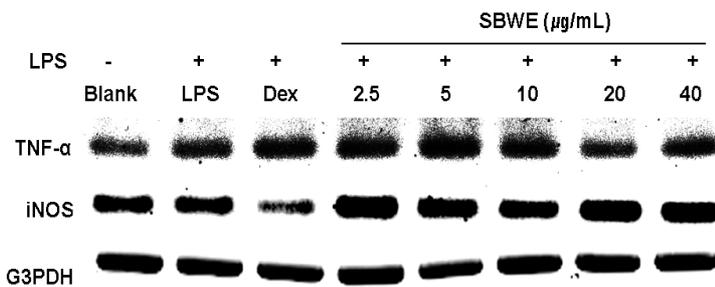


Fig. 8. Analyses of gene expression of TNF $\alpha$  and iNOS in Raw264.7 cells treated with SBWE. Cells were stimulated with LPS and their gene expressions were analyzed using RT-PCR. Respective G3PDH mRNA expression levels were used to confirm the equal amounts of RNA used for cDNA synthesis.

세포에서 iNOS의 단백질 발현수준을 유의성 있게 감소시켰다. 뿐만 아니라 황금열수추출물은 다양한 초기의 염증단계에서 중요한 역할을 하는 pro-inflammatory cytokine인 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 활성화된 macrophage에서 분비되어 염증반응을 일으키는 tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ )의 단백질 발현 수준을 하향 조절했다. 따라서 황금은 염증반응의 대표적인 cytokine인 iNOS, COX-2 그리고 TNF- $\alpha$ 를 억제

함으로써 외부 침입을 알리고 염증을 진행시키는 신호전달 분자를 차단하여 염증을 억제하는 것으로 사료된다. 또한 황금열수추출물의 급성염증과 만성염증을 유발한다고 알려진 [9] interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )와 interleukin-6 (IL-6)의 단백질 발현조절 효과를 조사한 결과, 황금열수추출물 처리군에서 IL-6의 단백질 발현 수준에는 변함이 없었으나 IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현 수준은 감소하였다. 체내 면역계가 외부항원을 발견하면

시간에 따라 순차적으로 다양한 cytokine이 분비된다. 따라서 LPS 자극 후 Raw264.7 세포의 시간에 따른 단백질 발현수준의 변화와 경향을 관찰하는 것은 매우 중요하다. Raw264.7 세포에 LPS 처리 1시간부터 TNF $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현수준은 급격히 증가하며, 높은 상태를 유지하였다. 반면 양성 대조군으로 염증치료제로 이용되고 있는 dexamethasone을 시간에 따라 처리한 결과, dexamethasone 처리 군은 LPS 처리 후 시간이 증가함에 따라 TNF $\alpha$ 의 단백질 발현수준을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한 IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현 역시 dexamethasone에 의해 낮게 조절되어 높은 발현 수준을 유지하고 있는 대조군과 비교하였을 때 일정한 수준을 유지하였다. 황금열수추출물은 LPS 처리 전과 비교하여 LPS 처리 후 TNF $\alpha$ 의 단백질 발현 수준이 약간 높지만 대조군과 비교하였을 때 TNF $\alpha$ 의 단백질 발현 수준이 낮게 조절되었음을 확인하였다. IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현 수준 역시 대조군과 비교하여 낮게 조절되었음을 확인하였다. 이는 황금열수추출물이 염증을 진행시키는 초기 염증 cytokine을 일정한 수준으로 유지시켜, 과도한 염증의 진행 및 만성염증으로의 진행을 막고, 과도한 억제효과를 나타내지 않아 체내의 적절한 면역수준을 유지시키는 것으로 사료된다. 따라서 황금열수추출물은 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 억제함으로써 macrophage에서의 NO 생성을 억제하여 염증의 진행을 막고 macrophage의 식균 작용을 억제하여 phagolysosome에서 생성되는 유해 활성 산소종의 체내 축적을 막아, 주변 조직 및 세포 손상으로부터 보호효과를 나타낸다. 나이가 들어감에 따라 만성염증이 많이 생기고 이에 따른 류마티스 관절염, 동맥경화와 같은 다양한 노인성 질환이 빈번하게 발생한다[14, 16]. 그 결과 눈에 띄는 억제효과는 나타나지 않았으나 황금열수추출물의 농도가 증가함에 따라 염색된 세포수가 줄어든 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 황금열수추출물이 외부 자극으로부터 세포를 보호하고 체내에 과도한 염증반응을 억제하여 노화의 진행을 억제한다고 나타낸다. 따라서 황금열수추출물이 외부 스트레스로부터 몸을 보호하고 과도한 염증을 막음으로써 적절한 면역수준을 유지하여 신체를 젊고 건강하게 하는 건강식품으로의 개발이 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 및 한국산업기술진흥원의 산업 기술연구기반구축사업 일환으로 수행하였음. (항노화산업 지원을 위한 인프라구축 및 제품개발, # N0000697)

### References

- Aderem, A. and Underhill, D. M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623.
- Alvarez, M. and Casadevall, A. 2006. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* **16**, 2161-2165.
- Bonham, M., Posakony, J., Coleman, I., Montgomery, B., Simon, J. and Nelson, P. S. 2005. Characterization of chemical constituents in *Scutellaria baicalensis* with anti-androgenic and growth-inhibitory activities toward prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**, 3905-3914.
- Calcerrada, P., Peluffo, G. and Radi, R. 2011. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* **17**, 3905-3932.
- Coussens, L. M. and Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
- Esposito, K., Nappo, F., Marfella, R., Giugliano, G., Giugliano, F., Ciotola, M., Quagliari, L., Ceriello, A. and Giugliano, D. 2002. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans role of oxidative stress. *Circulation* **106**, 2067-2072.
- Gao, Z., Huang, K., Yang, X. and Xu, H. 1999. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta* **1472**, 643-650.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-210.
- Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M. and Iwakura, Y. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 313-320.
- Hseu, Y. C., Wu, F. Y., Wu, J. J., Chen, J. Y., Chang, W. H., Lu, F. J., Lai, Y. C. and Yang, H. L. 2005. Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- $\kappa$ B pathway. *Inter Immunopharmacol* **5**, 1914-1925.
- Huang, W. H., Lee, A. R. and Yang, C. H. 2006. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* GEORGI. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 2371-2380.
- Kang, J. H., Sung, M. K., Kawada, T., Yoo, H., Kim, Y. K., Kim, J. S. and Yu, R. 2005. Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer Lett* **230**, 219-227.
- Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee, S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation in cultured murine macrophages. *Biol Pharm Bull* **27**, 617-620.
- McGEER, P. L. and McGEER, E. G. 2004. Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* **1035**, 104-116.
- Olefsky, J. M. and Glass, C. K. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* **72**,

- 219-246.
16. Roche, S. L. and Silversides, C. K. 2013. Hypertension, obesity, and coronary artery disease in the survivors of congenital heart disease. *Can J Cardiol* **29**, 841-848.
  17. Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat Res* **480**, 243-268.
  18. Yao, H. and Rahman, I. 2011. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol* **254**, 72-85.
  19. Ye, F., Xui, L., Yi, J., Zhang, W. and Zhang, D. Y. 2002. Anticancer activity of *Scutellaria baicalensis* and its potential mechanism. *J Alter Comp Med* **8**, 567-572.
  20. Yoon, S. B., Lee, Y. J., Park, S. K., Kim, H. C., Bae, H., Kim, H. M., Ko, S. G., Choi, H. Y., Oh, M. S. and Park, W. 2009. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* **125**, 286-290.
  21. Zhang, D. Y., Wu, J., Ye, F., Xue, L., Jiang, S., Yi, J., Zhang, W., Wei, H., Sung, M. and Wang, W. 2003. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res* **63**, 4037-4043.

### 초록 : Raw264.7 cells에서 바이칼린 함유 황금열수 추출물의 면역계 조절을 통한 항염증 효과

박혜정<sup>1</sup> · 김상민<sup>1</sup> · 권현주<sup>2</sup> · 이현태<sup>2</sup> · 김병우<sup>2</sup> · 김태훈<sup>3</sup> · 김문무<sup>1\*</sup>

(동의대학교 <sup>1</sup>화학과, <sup>2</sup>생명응용학과, <sup>3</sup>대구한의대학교 한약재 약리학과)

체내 면역시스템은 내부의 돌연변이 세포에 의하여 발생된 암 뿐만 아니라 세균감염에 의하여 기인된 여러 질환으로 부터 우리의 몸을 보호한다. 하지만 노화됨에 따라 비정상적인 면역시스템은 류머티스 관절염과 같은 만성염증을 유발시킨다. 그러므로, 본 연구의 목적은 효능성분으로 바이칼린을 함유한 황금의 항염증 효과를 조사한 것이다. 먼저 HPLC 분석에서 SBWE는 42.2 mg/g의 바이칼린을 함유하고 있는 것으로 관찰되었다. Raw264.7 세포에서 황금열수추출물(SBWE)의 세포독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. SBWE는 160  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 세포에 대한 독성이 없는 것으로 나타났다. 또한 lipopolysaccharide로 자극된 대식세포에서 발생하는 nitric oxide 소거능 효과를 조사해 본 결과 40  $\mu$ g/ml의 농도에서 SBWE는 40%의 억제효과를 나타내었다. 뿐만 아니라 SBWE는 zymosan으로 자극된 대식세포의 식세포작용도 억제 하였다. 더욱이 SBWE는 농도에 비례하여 대식세포에서 생성되는 TNF $\alpha$ 함량을 감소시켰다. SBWE는 또한 시간경과 실험에서 인터류킨 베타(IL-1 $\beta$ )의 생성을 억제하였다. 더욱이 cyclooxygenase-2의 발현수준은 20  $\mu$ g/ml의 SBWE 처리에 의하여 현저하게 감소되었다. 그러므로 이상의 연구결과는 황금 열수 추출물이 면역조절을 통해 항염증을 효능을 발휘할 수 있다는 하나의 증거를 제공한다.