

黃連 추출물의 항염효능에 관한 연구

이전우^{1#}, 한효상², 이영종^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Anti-inflammatory Effect of Coptidis Rhizoma Extract

Jeon-Woo Lee^{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 : This research has been done to investigate the anti-inflammatory effect of Coptidis Rhizoma extracts.

Method : Coptidis Rhizoma was extracted by 100°C water. The extract (CC : Extract of *Coptis chinensis* rhizome) was used to examine its effects on the cell viability of mouse macrophage Raw 264.7 cell line. Also the production of nitric oxide (NO), the c-jun N-terminal kinase (JNK) activation and the production of cytokines such as (IL)-5 were evaluated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells. After the CC and LPS were applied to Raw 264.7 cells which were cultured for 24 hours, the MTT assay was performed.

Result : The CC extracts didn't affect the viability of macrophage cells. However, the extracts inhibited the NO production and the JNK activation significantly in LPS-stimulated macrophage cells treated with 100 and 200 µg/mL concentrations. The CC extract, also, impeded the production of inflammation-related factors and cytokines such as KC, VEGF, MCP-1, GM-CSF, IL-1α, IL-5, IL-6, and IL-12p40 in LPS-stimulated macrophage cells at the concentration higher than 25 µg/mL. The production of basic-FGF concentration of 50 and 100 µg/mL, the production of IP-10 at 100 µg/mL, and the production of IFN-γ at 25 µg/mL, respectively.

Conclusion : The CC prepared using 100°C water showed the significant anti-inflammatory effect such as the inhibition not only on the production of NO, KC, VEGF, MCP-1, GM-CSF, IL-1α, IL-5, IL-6, and IL-12p40 in LPS-stimulated macrophage cells at or higher than the concentration of 25 µg/mL, but also on the JNK activation at 100 and 200 µg/mL.

Key words : Coptidis Rhizoma, macrophage cells, cytokine, nitric oxide, JNK

서론

黃連은 『神農本草經』¹⁾에 "黃連 味苦寒, 主熱氣, 目痛, 眦傷, 泣出, 明目, 腸澼, 腹痛, 下利, 婦人陰中腫痛. 久服, 令人不忘. 一名王連. 生川谷."이라 처음 收載된 이래 한의학 임상에서 瀉火, 燥濕, 解毒, 殺蟲²⁾의 효능이 있어서 心經實熱, 卒熱心痛, 肝火爲痛, 熱毒血痢, 冷熱諸痢, 小兒疳熱, 陽毒發狂,

骨節積熱, 消渴尿多, 下痢腹痛, 臟毒下血, 酒痔下血, 吐血部止, 眼目諸病, 口舌生瘡등을 치료하는 처방에 사용되고 있다³⁾.

황련의 기원으로 『대한약전』⁴⁾에는 미나리아재비과 (Ranunculaceae)에 속한 황련(日黃連) *Coptis japonica* Makino, 중국황련(中國黃連) *Coptis chinensis* Franchet, 삼각엽황련(三角葉黃連) *Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 또는 운련(雲連) *Coptis teeta* Wallich 으로 되어있다.

*Corresponding author : Young-Jong Lee, Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

· Tel : +82-31-750-5415 · E-mail : garak@gachon.ac.kr

#First author : Jeon-Woo Lee, Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

· Tel : +82-10-7283-9334 · E-mail : ondal7@hanafos.com

· Received : 18 August 2014 · Revised : 13 September 2014 · Accepted : 15 September 2014

성분으로 日黃連 *C. japonica* Makino의 뿌리줄기에는 berberine 5.56%–7.25%, coptisine, epiberberine, berberrubine, palmatine, jatrorrhizine, worenine, magnoflorine, ferulic acid, obakunone, obakulactone 등이 함유되어 있고, 三角葉黃連 *C. deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 뿌리줄기에는 epiberberine, berberine, coptisine, palmatine, worenine, jatrorrhizine, magnoflorine이 있으며, 雲連 *C. teeta* Wallich의 뿌리줄기에는 berberine, palmatine, jatrorrhizine, worenine, magnoflorine, coptisine 등이 함유되어 있다⁵⁾.

전체적으로 황련의 주요성분으로는 berberine 5.20%–7.69%, coptisine, worenine, palmatine, jatrorrhizine, columbamine 등과 epiberberine, magnoflorine, ferulic acid 등이 있으며 이외에도 상당수의 미량원소인 Fe, Cu, Zn, Mn 등이 보고되어 있다⁶⁾.

약리작용으로 抗菌作用⁷⁾과 心血管系統의 作用⁸⁾, 肝解毒作用⁹⁾, 氣管支平滑筋에 미치는 영향¹⁰⁾, 抗腹瀉作用¹¹⁾, 中樞神經系統作用¹²⁾, 抗癌作用¹³⁾, 및 抗炎作用¹⁴⁾ 등이 보고되었는데, 특히 抗炎作用과 관련하여, 최근에 윤 등¹⁵⁾은 黃連EtOH추출물이 lipopolysaccharide (LPS)로 유발된 마우스대식세포의 interleukin(IL)-1 β , IL-6, TNF- α 생성증가를 억제함에 대하여 보고한 바 있고, Kim 등¹⁶⁾도 黃連EtOH추출물이 LPS로 유발된 마우스대식세포의 IL-1 α , IL-6, GM-CSF, NO 생성증가를 억제함에 대하여 보고한 바 있다. 그러나 아직까지 黃連을 열수추출하여 제조한 시료를 대상으로 LPS로 유발된 대식세포의 IL-5, VEGF, KC, MCP-1 등의 생성증가에 대한 작용을 보고한 연구는 없었다.

본 연구에서는 黃連을 열수 추출하여 제조한 시료 (CC = Rhizome of *C. chinensis*)를 대상으로 mouse macrophage Raw 264.7 cells의 cell viability와 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 nitric oxide (NO) 생성증가, c-jun N-terminal kinase (JNK) activation, 그리고 IL-5, IL-6, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), keratinocyte-derived chemokine (KC) 등의 면역단백질 생성증가에 미치는 영향을 측정하여 유의한 항염 활성 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 黃連 (CC ; Rhizome of *C. chinensis* Franchet)은 중국에서 생산된 수입품으로 2008년 2월에 구입하였으며 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 기원을 감정하고 표본을 보관하였다 (NO; 2008-02-008). 모든 약재는 실험 전에 초음파 세척기 (Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 mouse macrophage (Raw 264.7 cells)이며 한국 세포주 은행 (KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 ethyl alcohol (Samchun Chemical, Korea), DMSO (Sigma, USA), DMEM (Sigma, USA), 1×PBS (Sigma, USA), EDTA (Sigma, USA), MTT (Sigma, USA), isopropanol (Sigma, USA), trypsin-EDTA (Sigma, USA), Bio-Plex Cytokine assay kit (Bio-Rad, USA), Procarta Cytokine assay kit (Panomics, USA), Bio-Plex phosphoprotein and total target assay kit (Panomics, USA), Bio-Plex cell lysis kit (Panomics, USA) 등이 사용되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 air compressor (Tamiya, Japan), CO₂ incubator (Nuair, USA), homogenizer (Omni, USA), high-speed microcentrifuge (Zygro, Korea), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), research microscope (Becton dickinson, USA), refrigerated centrifuge (Hanil, Korea), personal microcentrifuge (Mylab, Korea), fume hood (Hanil, Korea), clean bench (Jeio-tech, Korea), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader 680 (Bio-Rad, USA), vortex mixer (Vision Scientific Co, Korea), multi-channel pipette (Bio-Rad, USA), water bath (Saehan Co, Korea), ice-maker (Vision Scientific Co, Korea), bio-plex 200 (Bio-Rad, USA), vacuum filtration system (Millipore, USA), micromixer mx2 (Finepcr, Korea), thermo Micromixer (Finepcr, Korea), thermo bath (Finepcr, Korea), liquid nitrogen tank (Chart/mve, USA), deep freezer (Ilshin Lab Co, Korea), vacuum freezing drier (Eyela, Japan) 등이다.

2. 방법

1) 黃連 추출물 제조

黃連 50 g을 정확하게 측정한 뒤 환류추출기에 1 차 증류수 2,000 mL와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper (Advantec No.2, Japan)를 사용하여 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조시켜서 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 12.6 g을 얻었으며, 수율은 25.2%였다.

2) 세포배양

Raw 264.7 cells은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 μ g/mL), streptomycin(100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3 일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈

착된 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 mL culture flask)에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) 세포독성 검사

준비된 시료가 LPS와 함께 처리되었을 때 Raw 264.7 cells의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay¹⁷⁾를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어 주었다. 다음 LPS를 단독처리(1 μg/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200 μg/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 모두 버리고 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 100 μl씩 각 well에 처리하여 알루미늄 호일로 차광시킨 후 2 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μl 처리하고 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Nitric oxide 생성측정

Weissman 등¹⁸⁾의 방법을 참조하여 다음과 같이 실험하였다. LPS를 단독처리(1 μg/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100 μg/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 μl를 채취하여 여기에 그리스 시약 100 μl를 혼합하여 15 분 동안 반응시킨 후 Microplate Reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Phosphoprotein 발현측정

Johnson 등¹⁹⁾을 참조하여 6 well plate에 1×10⁶ cells/well의 농도로 cell을 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리(1 μg/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(50, 100, 200 μg/mL)와 함께 배지에 담아 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 1×PBS 용액으로 2 회 씻어준 뒤, Bio-Plex cell lysis kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질을 추출, cell lysate을 만들었다. 새로운 96 well plate에 특정항체와 결합된 비드(bead)를 분주하고, washing buffer로 세척하였다. 세척 한 후 준비된 cell lysate를 각 well에 분주하고 15~18 시간 동안 배양하고 나서 washing buffer로 세척하였다. 세척 후 탐지항체(Biotin-labeled detection antibody)를 각 well에 분주하고 30 분간 배양한 뒤 washing buffer로 세척하고 나서 형광발색제(Fluorescently labeled streptavidin reporter)를 각 well에 분주해서 10 분간 배양 후 세척한 뒤, reading buffer를 첨가하고 Bio-Plex array reader(Bio-Plex 200)를 이용, JNK의 인산화정도를 조사, 비교하였다.

6) Cytokine 생성측정

면역단백질 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Lee 등²⁰⁾의 방법을 참조하여 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/well의 cell을 100 μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리(1 μg/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(0, 25, 50, 100 μg/mL)와 함께 배지에 담아 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나고 상등액(cell culture supernatant)을 채취하여 filter plate(96 well type)에 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 30 분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 wash buffer로 3 회 세척한 뒤 각 well에 streptavidin-PE를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30 분간 진동배양(shaking)한 후 wash buffer로 3 회 세척한 뒤 각 well에 120 μl의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5 분간 진동배양(shaking)한 후 Bio-Plex array reader (Bio-Plex 200)을 이용, 측정하고자 하는 cytokine의 양을 조사·비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균치 ± 표준오차(mean ± SEM)로 나타내었으며, SPSS 11.0의 ANOVA test 및 Student's *t*-test로 분석하여 *P* < 0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 생존율

CC가 대식세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 비교하였다. 황련 추출물을 LPS(1 μg/mL)와 함께 24 시간 동안 Raw 264.7 Cells에 처리한 결과 25 μg/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 변화는 나타나지 않았다(Fig. 1).

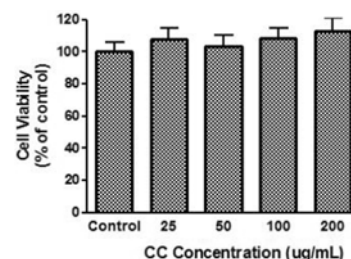


Fig. 1. Effect of CC on cell viability in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean ± SEM of the three independent experiments. Control : Treated with LPS (1 μg/mL) only.

2. NO 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 μg/mL 이상의 모든 농도에

서 LPS에 의한 NO 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 2).

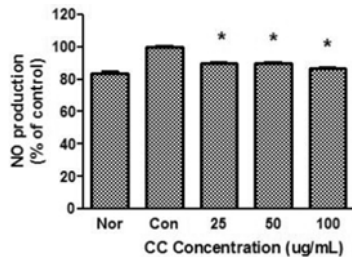


Fig. 2. Effect of CC on NO production in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments, Nor : Not treated with CC, Con : Treated with LPS (1 μ g/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

3. JNK activation에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 JNK activation에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 100, 200 μ g/mL의 농도에서 LPS에 의한 JNK activation을 유의하게 억제시켰다(Fig. 3).

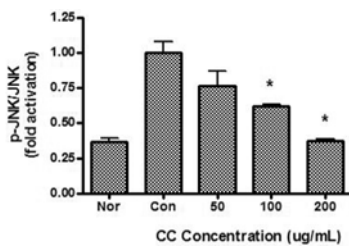


Fig. 3. Effect of CC on JNK activation in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments, Nor : Not treated with CC, Con : Treated with LPS (1 μ g/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

4. Cytokine 생성에 대한 영향

1) IP-10 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IP-10 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 100 μ g/mL의 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 4).

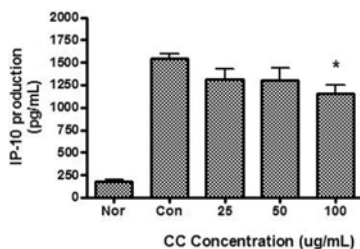


Fig. 4. Effect of CC on IP-10 production in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments, Nor : Normal group not treated with CC, Con : Control group treated with LPS (1 μ g/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

2) KC 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 KC 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 KC 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 5).

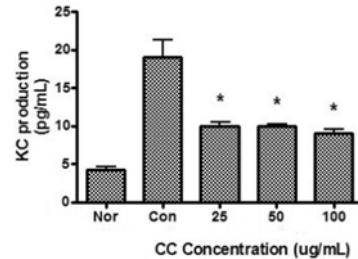


Fig. 5. Effect of CC on KC production in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments, Nor : Normal group not treated with CC, Con : Control group treated with LPS (1 μ g/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

3) VEGF 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 VEGF 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 VEGF 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 6).

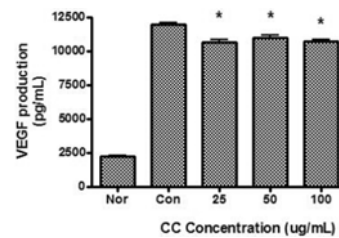


Fig. 6. Effect of CC on VEGF production in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments, Nor : Normal group not treated with CC, Con : Control group treated with LPS (1 μ g/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

4) IFN- γ 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IFN- γ 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 μ g/mL의 농도에서 LPS에 의한 IFN- γ 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 7).

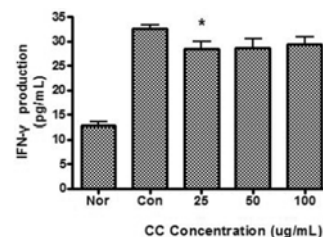


Fig. 7. Effect of CC on IFN- γ production in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments, Nor : Normal group not treated with CC, Con : Control group treated with LPS (1 μ g/mL) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

5) MCP-1 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 MCP-1 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 MCP-1 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 8).

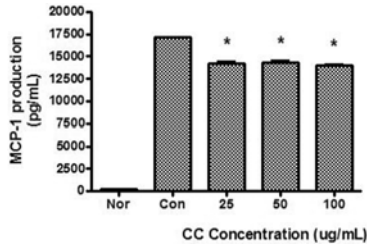


Fig. 8. Effect of CC on MCP-1 production in Raw 264.7 cells, CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Nor : Normal group not treated with CC. Con : Control group treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

6) GM-CSF 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 GM-CSF 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 GM-CSF 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 9).

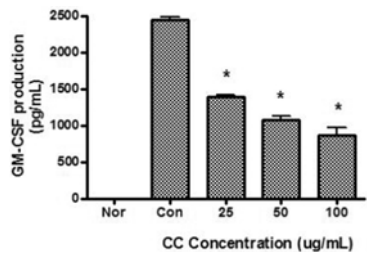


Fig. 9. Effect of CC on GM-CSF production in Raw 264.7 cells, CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Nor : Normal group not treated with CC. Con : Control group treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

7) IL-1 α 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-1 α 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-1 α 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 10).

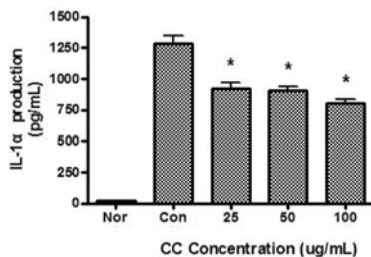


Fig. 10. Effect of CC on IL-1 α production in Raw 264.7 cells, CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Nor : Normal group not treated with CC. Con : Control group treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

8) IL-5 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-5 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-5 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 11).

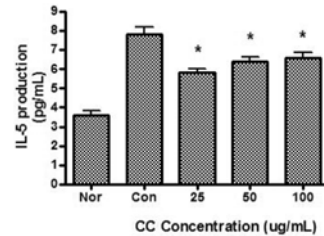


Fig. 11. Effect of CC on IL-5 production in Raw 264.7 cells, CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Nor : Normal group not treated with CC. Con : Control group treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

9) IL-6 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 12).

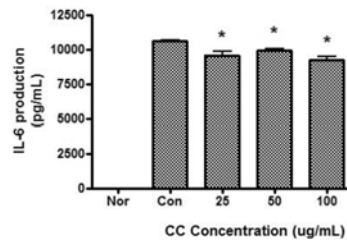


Fig. 12. Effect of CC on IL-6 production in Raw 264.7 cells, CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Nor : Normal group not treated with CC. Con : Control group treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

10) IL-12p40 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-12p40 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-12p40 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 13).

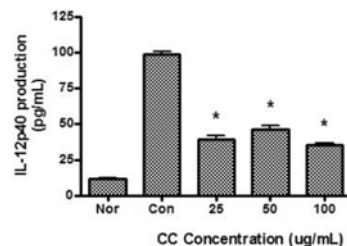


Fig. 13. Effect of CC on IL-12p40 production in Raw 264.7 cells, CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Nor : Normal group not treated with CC. Con : Control group treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

11) basic-FGF 생성에 대한 영향

LPS로 유발된 마우스 대식세포의 basic-FGF 생성에 미치는 CC의 영향을 비교하였다. 그 결과 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS에 의한 basic-FGF 생성을 유의하게 억제시켰다(Fig. 14).

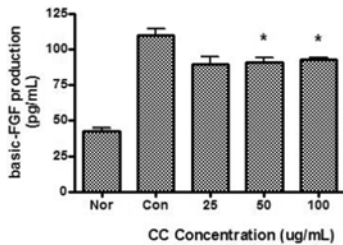


Fig. 14. Effect of CC on basic-FGF production in Raw 264.7 cells. CC : Water extract of *Coptis chinensis* rhizome. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SEM of the three independent experiments. Nor : Normal group not treated with CC. Con : Control group treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

고찰

黃連은 『神農本草經』¹⁾에 "黃連 味苦寒. 主熱氣, 目痛, 眦傷, 泣出, 明目, 腸澼, 腹痛, 下利, 婦人陰中腫痛. 久服, 令人不忘. 一名王連. 生川谷."이라 처음 收載되었다.

황련의 기원으로 『대한약전』⁴⁾에는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 황련 *Coptis japonica* Makino, 중국황련(中國黃連) *C. chinensis* Franchet, 삼각엽황련(三角葉黃連) *C. deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 또는 운련(雲連) *C. teeta* Wallich 으로 되어있다.

약리학적으로는 黃連의 주성분은 isoquinoline 계열 alkaloid인 berberine이며 기타 coptisine, epiberberlin, feluric acid, magnoflorine, palmatine, worenine 등의 성분을 함유하고 있는데, 특히 黃連의 berberine 성분은 곤충이나 유척추생물에 독소가 있으며 박테리아나 진균 그리고 바이러스의 활동을 저해하는 효과가 있고²¹⁾, 抗炎症, 止血, 血壓下降作用, 抗癌作用 등이 있는 것으로 알려져 있고, 中樞神經抑制作用이나 腎臟炎治療 및 氣管支 平滑筋 擴張에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다⁷⁻¹⁴⁾.

이에 저자는 黃連을 熱水抽出하여 제조한 試料(CC)를 대상으로 mouse macrophage Raw 264.7 cells의 cell viability와 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 NO 생성, JNK activation, 그리고 IL-5, IL-6, GM-CSF, KC 등의 cytokine 생성에 미치는 영향을 측정, 조사하였다.

CC가 대식세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 비교하기 위해 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)와 함께 24 시간 동안 처리한 결과 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 유의한 생존율 감소는 나타나지 않았으며, 이들의 농도에서는 CC가 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 그래서 다음 단계의 염증매개인자 발현 실험을 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였다.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성을 유의

하게 억제시켰으며, CC가 마우스 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 CC만을 24 시간 동안 처리한 결과에서도 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 NO 생성을 유의하게 억제시켰다. 이와 같이 CC에 의해서 LPS에 의해 유발된 macrophage의 NO 생성을 억제한다는 것은 CC가 NO 과잉에 의한 염증 악화를 억제할 수 있는 효능이 있음을 의미한다.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 JNK activation에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS에 의한 JNK activation을 유의하게 억제시켰다. 이는 JNK activation에 의해서 유발되는 대식세포의 proinflammatory mediator의 생성을 CC가 억제할 수 있음을 나타낸다. JNK는 세포의 증식²²⁾, 분화²³⁾에 관여하는 것으로 알려져 있다.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IP-10 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성을 유의하게 억제시켰다. IP-10은 호흡기 염증 반응에서 호중구와 단핵구의 화학 주성에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 급성염증반응의 매개자인 KC²⁵⁾ 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 KC 생성을 유의하게 억제시켰다.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 VEGF 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성을 유의하게 억제시켰다. VEGF는 주요한 성장인자로서 혈관 내피세포에서 발현되는 매우 특이한 유사분열 촉진인자이다²⁶⁾.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IFN- γ 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS에 의한 IFN- γ 생성을 유의하게 억제시켰다.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 MCP-1 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 MCP-1 생성을 유의하게 억제시켰다. MCP-1은 외상이나 감염조직으로 monocyte, memory cell, dendritic cell을 모으는 역할을 한다²⁷⁾.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 GM-CSF 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 GM-CSF 생성을 유의하게 억제시켰다. GM-CSF는 백혈구의 성장과 감염부위에 macrophage가 집락화 되도록 자극하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{28,29)}.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-1 α 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-1 α 생성을 유의하게 억제시켰다. IL-1 α 는 T, B cell 등의 증식과 분화에 관계되며, IL-1 β 는 IL-2 유도, 뼈의 재흡수, 조직의 분해 대사의 작용이 있다^{30,31)}.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-5 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-5 생성을 유의하게 억제시켰다. IL-5가 강력한 eosinophil active

cytokine 임이 알려지면서 알레르기 염증반응을 이해하는 데 중요한 연구 대상이 되어 왔다³²⁾.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성을 유의하게 억제시켰다. 감염이나 손상 등에 의한 급성반응을 보이며 면역에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여 한다³³⁾.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-12p40 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-12p40 생성을 유의하게 억제시켰다.

CC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 basic-FGF 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 24 시간 동안 처리한 결과에서는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 LPS에 의한 basic-FGF 생성을 유의하게 억제시켰다.

이와 같이 CC가 LPS에 의해 유발된 Macrophage의 각종 cytokine 생성을 유의하게 억제하는 것은 CC가 대식세포의 cytokine 과잉생성으로 인하여 유발될 수 있는 각종의 급만성 염증성 질환발생과 염증현상의 악화를 완화할 수 있는 항염효능이 있음을 의미하며, 특히 대식세포의 염증활성능과 관련된 세포내 JNK activation을 억제하는 기전까지 포함한 항염작용이라고 할 수 있다.

이상의 결과, 黃連을 열수 추출하여 제조한 시료 CC는 대식세포에 LPS로 유발된 대식세포의 NO, KC, VEGF, MCP-1, GM-CSF, IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-12p40의 생성을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제하고, JNK activation을 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 억제하는 등 유의한 항염효능을 가지고 있는 것으로 나타났다. 앞으로 黃連 물추출물을 이용한 대식세포 관련 염증질환에 대한 치료제의 개발에 매우 긍정적인 결과이며 더욱 집중적이고도 많은 연구를 할 가치가 있을 것으로 사료된다.

결론

黃連을 열수 추출하여 제조한 시료(CC)를 대상으로 mouse macrophage Raw 264.7 cells의 cell viability와 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 NO 생성, JNK activation, 그리고 IL-5 등의 cytokine 생성에 미치는 영향을 측정, 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃連 물추출물을 LPS와 함께 24 시간 동안 배양한 후 MTT assay를 수행한 결과 黃連 물추출물은 대식세포의 생존율에 유의한 변화를 나타내지 않았다.
2. 黃連 물추출물은 24 시간의 배양에서 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성을 유의하게 억제시켰다.
3. 黃連 물추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 KC, VEGF, MCP-1, GM-CSF, IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-12p40의 생성을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제시켰다.

4. 黃連 물추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 basic-FGF의 생성을 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서, IP-10의 생성은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서, IFN- γ 의 생성은 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의하게 억제시켰다.

5. 黃連 물추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 JNK activation을 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의하게 억제하였다.

이상의 결과, 黃連을 열수 추출하여 제조한 시료 CC는 대식세포에 LPS로 유발된 대식세포의 NO, KC, VEGF, MCP-1, GM-CSF, IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-12p40의 생성을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의하게 억제하고, JNK activation을 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 억제하는 등 유의한 항염효능을 가지고 있는 것으로 나타났다.

References

1. Wu B. Shennongbencaojing. Beijing : Kexuejishuwenxian publisher, 1996 : 24.
2. Jiangsuxinyixueyuan, Zhongyaodacidian, Shanghai : Shanghai kexuejishuchubanshe, 1977 : 2022-30.
3. Li SZ. Bencaogangmu. Seoul : Komoonasa, 1975 : 447-52.
4. Korea Food and Drug Administration, The Korean Pharmacopoeia Tenth Edition, Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2007 : 995-6.
5. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China, Zhonghuabencao, Vol. 4, Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 213-23.
6. Xiao PG. Xibianzhongyaozhi, Vol 3, Beijing : Huaxuegongye publisher, 2002 : 894-901.
7. Doh ES. Antifungal Activity of *Coptis japonica* Root-stem Extract and Identification of Antifungal Substances, Korean J Plant Resources, 1999 ; 12(4) : 260-8.
8. Huang WM, Yan H, Jin JM, Yu C, Zhang H. Beneficial effects of berberine on hemodynamics during acute ischemic left ventricular failure in dogs. Beneficial effects of berberine on hemodynamics during acute ischemic left ventricular failure in dogs. Chin Med J (Engl). 1992 ; 105(12) : 1014-9.
9. Yoon SH, Ha H, Seo MJ. Effect of *Coptis Rhizoma* on Benzo (a) pyrene-Induced Hepatotoxicity. Kor J Environ Toxicol. 1993 ; 8(1-2) : 31-5.
10. Lee DU, Chang KC. Bronchodilatory Effects of *Coptidis Rhizomas* in Isolated Rat Trachea. J Pharm Soc Korea. 1997 ; 41(6) : 797-801.
11. Yamamoto K, Takase H, Abe K, Saito Y, Suzuki A. Pharmacological studies on antidiarrheal effects of a preparation containing Berberine and *Geranii Herba*.

- Nihon Yakurigaku Zasshi, 1993 ; 101(3) : 169-75.
12. Jung HW, Park YK. Effects of subfractions of *Coptidis Rhizoma* extract on the nitric oxide production in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *Kor J Herbology*. 2007 ; 22(2) : 73-8.
 13. Kim JH, Lee SJ, Han YB, Kim JB. Identification of Active Component Isolated from *Croton tiglium* and *Coptis Japonica* Aqueous Mixture (CP2) and Studies of Its Cytotoxic Effect. *J Pharm Soc Korea*. 1994 ; 38(1) : 31-7.
 14. Song KB, Kong YH, You HK, Shin HS. Effects of *Rhizoma Coptidis* on Cellular Activity and IL-6 Production of LPS-treated Periodontal Ligament Cells. *J Periodontal Implant Sci*. 1996 ; 26(3) : 641-54.
 15. Yoon KR, Kim YJ, Lee E, Lee JM. Anti-inflammatory Effect of *Coptidis Rhizoma*. *Kor J Herbology*. 2009 ; 24(3) : 79-86.
 16. Kim JM, Jung HA, Choi JS, Lee NG. Identification of anti-inflammatory target genes of *Rhizoma coptidis* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 murine macrophage-like cells. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 130(2) : 354-62.
 17. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MITT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*. 1990 ; 131(2) : 165-72.
 18. Weissman BA, Gross SS. Measurement of NO and NO synthase. *Curr Protoc Neurosci*. 2001 ; 7 : 13.
 19. Johnson FM, Saigal B, Tran H, Donato NJ. Abrogation of signal transducer and activator of transcription 3 reactivation after Src kinase inhibition results in synergistic antitumor effects. *Clin Cancer Res*. 2007 ; 13(14) : 4233-44.
 20. Lee KS, Chung JH, Lee KH, Shin MJ, Oh BH, Hong CH. Bioplex analysis of plasma cytokines in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Immunol Lett*. 2008 ; 121(2) : 105-9.
 21. Schmeller T, Latz-Bruning B, Wink M. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*. 1997 ; 44(2) : 257-66.
 22. Bost F, McKay R, Bost M, Potapova O, Dean NM, Mercola D. The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 1999 ; 19(3) : 1938-49.
 23. Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, Hashimoto K. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2001 ; 276(2) : 999-1004.
 24. Zeng X, Moore TA, Newstead MW, Deng JC, Lukacs NW, Standiford TJ. IP-10 mediates selective mononuclear cell accumulation and activation in response to intrapulmonary transgenic expression and during adenovirus-induced pulmonary inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 ; 25(2) : 103-12.
 25. Conti P, Pang X, Boucher W. Monocyte chemotactic protein-1 is a proinflammatory chemokine in rat skin injection sites and chemoattracts basophilic granular cells. *Int Immunol*. 1997 ; 9(10) : 1563-70.
 26. Van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren CM, Ferrara N. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest*. 1999 ; 104(11) : 1613-20.
 27. Bidzhekov K, Zerneck A, Weber C. MCP-1 induces a novel transcription factor with proapoptotic activity. *Circ Res*. 2006 ; 98(9) : 1107-9.
 28. Geijsen N, Koenderman L, Coffey PJ. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001 ; 12(1) : 19-25.
 29. Doyle SE, Gasson JC. Characterization of the role of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit in the activation of JAK2 and STAT5. *Blood*. 1998 ; 92(3) : 867-76.
 30. Phun KH. Molecular Immunological Aspects of Cytokines (Interleukins). *Korean J Nephrol*. 1992 ; 11(6) : 19-32.
 31. Nazarenko I, Marhaba R, Reich E, Voronov E, Vitacolonna M, Hildebrand D, Elter E, Rajasagi M, Apte RN, Zöller M. Tumorigenicity of IL-1alpha- and IL-1beta-deficient fibrosarcoma cells. *Neoplasia*. 2008 ; 10(6) : 549-62.
 32. Lampinen M, Carlson M, Sangfelt P. IL-5 and TNF- α Participate in Recruitment of Eosinophils to Intestinal Mucosa in Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*. 2001 ; 46(9) : 2004-9.
 33. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*. 1992 ; 258(5082) : 593-7.