

Original Article / 원저

응담화 에탄올 추출물의 항염증 효과에 관한 연구

최형욱¹ · 인명희² · 리순화³ · 김은주⁴ · 임규상^{1,6} · 우원홍^{5,6*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, ²원광대학교 한의학전문대학원 BK21-plus팀,

³건국대학교 교육대학원 미용교육학과, ⁴열린사이버대학교 뷰티건강디자인학과,

⁵원광대학교 한의과대학 해부학교실, ⁶원광대학교 한국전통의학연구소

Study on Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract of *Gentianae sino-ornata*

Hyung-Wook Choi¹ · Myung-Hee In² · Shun-Hua Lee³ · Eun-Joo Kim⁴ · Kyu-Sang Lim^{1,6} · Won-Hong Woo^{5,6*}

¹Dept of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang

²BK21-plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

³Dept. of Beauty Education, Graduate School of Education, Konkuk University

⁴Dept of Beauty Health Design, Open Cyber University

⁵Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

⁶Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objective : This research has been conducted to comparative analysis of anti-inflammatory effects to suggest a usefulness of ethanol extracts from *Gentianae sino-ornata* (GSO) as a functional material for inflammatory activities.

Methods : Cell viability was measured by neutral red (NR) assay, and nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells was monitored by measuring the nitrite content in culture medium, The expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) was determined by western blot analysis, and Inducible nitric oxide syntase (iNOS) and cytokine were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results : When the GSO extract was added the concentration of 5-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, the viability of cells was maintained 90% or more at all levels. NO production was suppressed by the treatment of GSO in LPS-stimulated RAW264.7 cells. GSO inhibited the expression of iNOS, COX-2, IL-1 β and IL-6 in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conclusions: From this results, we consider that GSO can be a useful therapeutic and preventive approach to various inflammatory diseases as a functional material for inflammatory activities.

Key words : *Gentianae sino-ornata*, LPS; COX-2; iNOS; IL-6

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal 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.

I. 서 론

염증반응이란 체내에 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균감염에 대해 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증 매개 물질을 분비함으로써 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다¹⁾. 이 과정은 Lipopolysaccharide(LPS)와 같은 외부 자극원 또는 arachidonic acid 대사체 같은 내부 자극원들을 주요 매개로 하여 macrophages, granulocytes, fibroblasts와 같은 염증성 세포의 염증부위의 유입과 축적을 주요 특징으로 한다²⁾. 그러나 지속적으로 또는 과도하게 발생된 만성 염증반응은 조직의 손상을 유발하며 이와 관련한 Reactive oxygen species(ROS)와 염증성 cytokine은 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다³⁾. 특히 염증반응은 치매, 심혈관질환, 암, 비만, 대사성 증후군 등의 만성질환의 원인이 되고⁴⁾, 이는 염증반응을 촉진하는 인자들과 신호달경로가 염증반응뿐 아니라 만성질환에도 깊숙이 관여하고 있기 때문이며⁵⁾ 따라서 염증반응을 억제하는 물질은 만성질환을 예방하거나 억제하기 위한 기능성 물질로 사용될 가능성이 높다고 볼 수 있다.

현재 사용하고 있는 대부분의 항염증제들은 장기복용할 경우 출혈성 소화관장애, 신장 기능저하 및 혈압 상승 등의 부작용과 함께 심근경색 및 혈전형성 등의 순환계 질환도 유발할 수 있다는 것이 보고되었으며⁶⁾ 이에 따라 효능과 안전성이 우수한 새로운 항염증제의 개발에 대한 관심이 한층 더 높아졌으며 천연물을 이용한 항염증제 개발을 위한 많은 연구들이 수행되었다⁷⁻¹⁰⁾.

용담초(*Gentiana scabra* Bunge)는 다년생 초본으로 용담의 꽃을 용담화(*Gentiana sino-ornata*)라고 한

다. 한방에서 사용되는 뿌리의 성미(性味)는 고한(苦寒)으로 간담(肝膽)의 실화(實火)를 사(瀉)하고 청열(淸熱), 조습(燥濕), 하초(下焦)의 습열(濕熱)을 제거하는 효능이 있어 두통, 협통(脇痛), 습진, 피부 및 음낭 소양(搔痒), 황달, 만성 위장 질환에 사용하며¹¹⁾, 대장간균, 백선균, 피부 진균에 대하여 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

용담은 secoridoid 배당체를 함유하고 있는 식물로서, 용담이 가지는 항염증 효과에 관한 것으로는 *Gentiana scabra* Bunge에서 분리된 5-(hydroxymethyl)-2-furfural 가 LPS로 활성화시킨 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 NO생성을 저하시킨다는 것을 확인하였으며 gentiopicroside가 carrageenin으로 유발시킨 흰쥐 족적 부종시험에 있어서 항염증 효과가 있고^{13,14)} 한방에서는 용담이 가지는 차가운 성질로 인하여 열을 내리고 염증을 억제하는 작용이 있으며, 위와 장의 운동기능을 항진시키고 소화액의 분비를 촉진하는 성질이 있는 것¹⁵⁾으로 보고되었다.

본 연구에서는 항염증 효과가 우수한 제품을 개발하기 위한 기초 연구의 일환으로 용담화 추출물을 처리한 RAW264.7 세포에 LPS를 처리한 후 COX 2와 iNOS 발현 및 전염증성 cytokines들의 생산량을 조사하여 *in vitro*에서 용담화 추출물의 항염증 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재

본 연구에서 실험에 사용된 용담화 (*Gentiana sino-ornata*)는 중국 티벳 중앙점(西藏拉萨市藏源中药材公司)에서 구입하여 사용하였다.

Corresponding author : Won Hong Woo, Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea(Tel : +82-63-850-6845, E-mail : whwoo@wku.ac.kr)

• Recieved 2015/9/24 • Revised 2015/10/26 • Accepted 2015/11/4

2) 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, phosphate buffered saline solution (PBS), lipopolysaccharide (LPS), formaldehyde, Tween 20, Blocking buffer (BSA), Griess reagent, p-Nitrophenylphosphate (pNPP), diethyl pyrocarbonate (DEPC)는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을, trizol reagent는 Invitrogen사 (USA) 제품을, chloroform, isopropanol는 Biopure사 (Canada) 제품을, iNOS, IL-1 β , IL-6 primer는 Bioneer사 (Korea) 제품을, trizol reagent는 iNtRON사 (Biotechnology, Korea) 제품을, western blotting detection reagent는 Thermo사 (USA) 제품을 M-MLV reverse transcriptase (Enzynomics, Korea), Acco Power Hot Start PCR premix은 Bioneer사 (Korea) 제품을, super signal west pico solution은 Pierce사 (USA) 제품을, protease inhibitor cocktail은 Roche사 (Switzerland) 제품을, anti-COX-2 primary antibody는 Cell signaling Tech사 (Beverly, Ma, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

3) 사용기기

원심분리기는 Hanil사 (Science Industrial, Korea) 제품을, clean bench는 동의과학사 (Korea) 제품을, CO₂ incubator는 Samyo사 (Japan) 제품을, microplate reader는 Synergy-HT사 (BIO-TEK instruments, USA) 제품을, 감압농축기는 Eyela사 (Japan) 제품을, iCycler Q system은 Bio-Rad사 (USA) 제품을, Nanodrop은 Nanodrop사 (USA) 제품을, ultraviolet transilluminator는 Htech사 (Korea) 제품을, 자동현상기는 QX-130II사 (Konica) 제품을 사용하였다.

4) 세포주

실험에 사용된 세포주인 RAW264.7 macrophage

는 한국 세포주 은행 (Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 시료 추출

용담화는 각 시료 중량에 10배의 95% 에탄올을 가하여 상온에서 72시간 방치하고 그 추출액을 9,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 여과지 (Whatman No. 2)로 여과한 후 필터링한 다음 감압농축하여 3일 동결 건조한 후 그 분말을 본 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

분양받은 RAW264.7 macrophage 세포는 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3) 세포 생존율 측정

실험에서 사용된 시료의 세포 독성을 나타내는 농도 범위는 neutral red (NR) assay를 이용하여 확인하였다¹⁶⁾. 연구에 사용한 세포주는 RAW264.7 세포를 사용하였으며, 96 well plate에 well 당 3×10⁴ 세포로 분주하여 24시간 동안 전 배양하였다. 세포가 well plate에 충분히 부착된 것을 확인한 후 무혈청 배지를 이용하여 용담화를 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 농도별로 첨가하고 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포는 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무혈청 배지로 교환하여 3시간 배양한 다음 현미경으로 NR의 결정화 유무를 확인하였다. Formaldehyde 용액 10%가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 μl 로 20분 처리하여 세포를 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 μl 분주하여 세포내의 NR을 추출하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생

존율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{시료무첨가군 흡광도}} \times 100$$

4) Nitric oxide (NO) 생성 저해능 측정

용담화 추출물이 RAW264.7 세포 배양에서 NO 생성에 미치는 영향을 측정하기 위해 Green 등의 방법¹⁷⁾에 따라 세포배양액 내 NO 양을 nitrite (NO₂)와 nitrate (NO₃) 형태로 측정하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 5×10⁴ /well로 분주하고 24시간 동안 전배양 후 배지를 제거하고 LPS가 1 μg/ml이 포함된 무혈청 배지에 용담화를 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg/ml의 농도별로 가하여 48시간 동안 후배양하였다. 새로운 96 well plate에 배양된 세포 배양 상층액 100 ml와 Griess reagent 100 ml을 첨가하여 차광된 상태에서 10분간 반응시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 LPS 처리군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{NO 생성 저해능(\%)} = 100 -$$

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

5) 역전사 중합 효소 연쇄반응

(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

용담화 추출물이 RAW264.7 세포 내의 염증 사이토카인인 iNOS, IL-1β, IL-6의 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

① RNA 추출 단계

LPS 1 μg/ml와 용담 추출물 5, 20 μg/ml로 처리된 RAW264.7 세포를 수거한 후 phenol 성분이 첨가된 trizol reagent를 이용하여 RNA를 추출하였다. 수거한 RAW264.7 세포가 들어있는 tube에 1 ml trizol reagent를 넣고 현탁한

후 상온에 5분간 반응시켜 세포를 용해하였다. 여기에 0.2 ml chloroform (Biopure, Canada)을 첨가하고 강하게 15초간 흔들어 준 뒤 3분간 상온에서 반응시킨 후 12,000 rpm, 4℃의 조건에서 20분간 원심분리를 실시하여 단백질을 포함하는 하단부의 phenol층과 RNA를 포함하는 상단부의 수용성층으로 분리하였다. 상단부의 수용성층만 수거하여 0.5 ml isopropanol (Biopure, Canada)을 첨가하고 상온에 10분간 반응시킨 후 12,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리를 실시하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 75% ethanol로 세척한 후 ethanol 성분을 제거하고 상온에서 건조하였다. 건조된 RNA는 DEPC water로 녹여 실험에 사용하였으며 추출된 RNA는 순도 확인을 위해 Nanodrop (Nanodrop, USA)을 이용하여 260/280 nm의 파장에서 흡광도를 측정 후 260/280 nm의 ratio를 확인하여 사용하였다. 비율이 1.8 이상이면 단백질이 함유되지 않은 것이기 때문에 비율 1.8 이상의 RNA만을 실험에 사용하였다.

② cDNA 합성 및 polymerase chain reaction 단계
cDNA는 1 μg의 RNA를 대상으로 M-MLV reverse transcriptase (Enzynomics, Korea)을 사용하여 제조하였다. 1 μg RNA와 0.5 μg oligo dT 18 μg에 DEPC water를 첨가한 10 μl의 용액을 70℃에서 10분간 반응시켜 RNA를 denaturation 시킨 후 여기에 buffer, 10 mM dNTP, 200 unit/μl reverse transcriptase를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 제조하여 실험에 사용하였다.

확보한 cDNA는 Acco Power Hot Start PCR premix (Bioneer, Korea)와 iNOS, IL-1β, IL-6 primer를 혼합하여 총 volume이 20 μl가 되도록 DEPC 처리된 water로 조정된 후 실행하였다. PCR은 iCycler Q system (Bio-Rad,

USA)로 수행하였고 PCR products는 ethidium bromide (EtBr)이 포함된 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행한 후 ultraviolet transilluminator (Htech, Korea)로 확인하였다. 본 연구에 사용한 primer는 housekeeping 유전자인 β -Action 유전자를 사용하였다(Table 1).

6) Western blot 분석

용담화 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot 방법을 이용하여 단백질 발현양을 측정하였다. LPS 처리에 의하여 활성화된 RAW264.7 세포에 용담화 추출물을 5, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 처리하고 3시간 배양한 세포를 수거하여 PBS로 세척 후 RIPA buffer (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, proteaseinhibitor cocktail (Roche, Switzerland))로 30분간 용해시킨 후 12,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심 분리하여 상등 액을 회수하였다. 회수된 상등 액은 SDS sample buffer (60 mM Tris (pH 6.8), 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromo-phenol blue)를 첨가하고 100°C에서 5분간 denaturation 시킨 후 단백질을 SDS-PAGE로 분자량별로 분리하였다. 분리된 단백질은 100 V의 조건에서 1시간 동안 nitrocellulose membrane (Whatman, UK)으로 전이

시키고 0.1% BSA 용액으로 blocking 시킨 후 membrane을 anti-COX-2 primary antibody 용액에 담가 4°C에서 18시간 반응시켰다. TBS/T (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20)로 5분씩 3회 세척하였다. 세척된 membrane을 화학적 형광을 낼 수 있는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합 되어 있는 anti-mouse IgG antibody 용액에 담가 상온에서 2시간 처리 후 다시 TBS/T로 5분씩 3회 세척하였다. 이차항체가 처리된 membrane은 super signal west pico solution (Pierce, USA)을 처리하고 암실에서 실험용 필름 (Konica, Japan)으로 덮어 필름에 감광을 유도한 후 자동현상기 (QX-130II, Konica)를 이용하여 현상하였다. 현상된 필름 상에 있는 단백질 band는 densitometer program인 Image J (NIH, USA)를 이용하여 band 크기의 변화를 측정하였다.

7) 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 분석 수치는 Mean \pm S,D로 표시하였고SPSS (Statistical Package for the Social Science) WIN 17.0 프로그램을 이용하였으며 통계분석은 ANOVA Test에 의해 분석하였다. 통계적 유의성은 *p < 0.01, **(##)p < 0.001로 표기하여 유의성의 차이가 있는 것으로 판단하였다.

Table 1. Lists of Primers Used in This Study

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>iNOS</i>	CCCTTCGGAAGTTTCTGGCAGCAGC	GGCTGTCAGAGCCTCGTGG CTTTGG
<i>IL-1β</i>	CAGGATGAGGACATGAGC	CTCTGCAGACTCAAACCTCCA
	ACC	C
<i>IL-6</i>	GTACTCCAGAAGACCAGA	TGCTGGTGACAACCACGGCC
	GG	
β -Actin	GTGGGCCGCCCTAGGCACC	GGAGGAAGAGGATGCGGCAG
	AG	T

III. 실험 결과

1. Neutral Red (NR)에 의한 세포 생존율 측정

1) RAW264,7 세포에서 세포 생존율

RAW264.7 세포에 용담화 에탄올 추출물의 세포 독성을 알아보기 위해 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 NR assay를 수행하였다. 용담화 추출물의 세포 생존율을 측정할 결과 세포에 에탄올 추출물을 5-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 첨가하였을 때, 추출물은 대체로 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 유지하였다. 그러나 농도가 50-100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서는 세포의 생존율이 현격히 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 따라서 향후 실험은 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이내에서 실시하였다(Fig. 1).

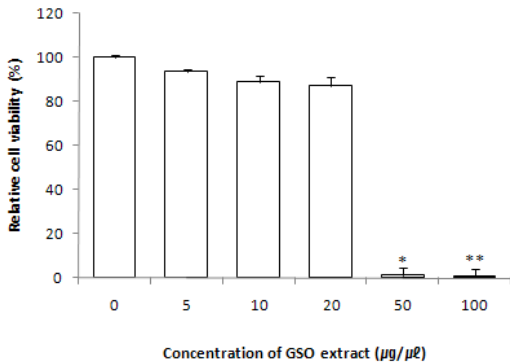


Fig. 1. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on cell viability in RAW264.7 cells.

Cells were plated at 3×10^4 cells/well and incubated in media containing from 5 to 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for 48 hours. Cell viabilities were measured by NR assay as described in materials and methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with control.

2. NO 생성 억제 효과

용담화 에탄올 추출물을 이용하여 RAW264.7 cell에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는지의 여부를 평가 한 결과 용담화 추출물 1.25, 2.5,

5, 10, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 처리하였을 때, LPS 처리군에 비해 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히 용담화 추출물 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도에서 NO 생성이 80% 이상 억제되는 것으로 나타나 항염 작용이 매우 우수한 것으로 나타났다.

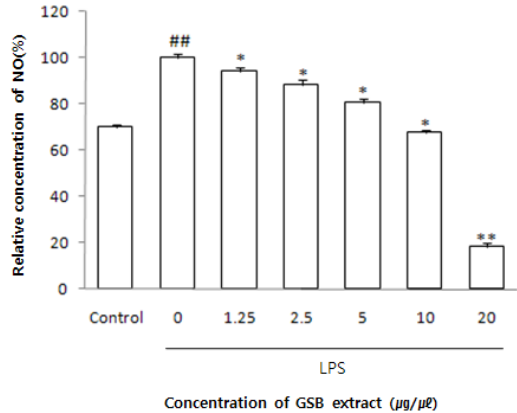


Fig. 2. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on NO production in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and combined with GSO for 48h. Nitrite was measured by Griess reagent. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ## $p < 0.001$ compared with control, and * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with LPS treated group.

3. 세포내 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 저해능

용담화 추출물이 NO 생성과 관련된 주요 효소인 COX-2 발현에 미치는 영향은 Western blot 분석으로 조사하였다. 실험결과 RAW264.7 세포에서 LPS를 첨가하면 COX-2의 발현이 증가하였고, 용담화 추출물 5, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 3). 이상의 결과 용담화 추출물은 RAW264.7 세포에서 COX-2의 발현을 억제하여 NO 생성을 감소시키는 것으로 보인다.

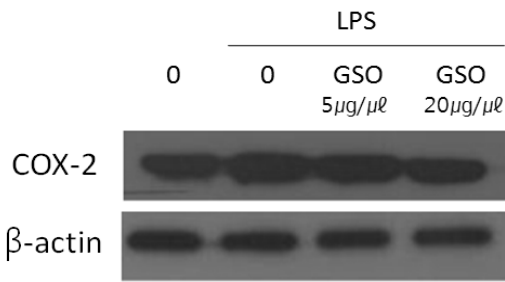


Fig. 3. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on protein expression level of COX-2 in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells are treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and combined with *Gentiane sino-ornata* (GSO) extract. Cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by Western blot analysis using antibody against COX-2. Actin was used as an internal control.

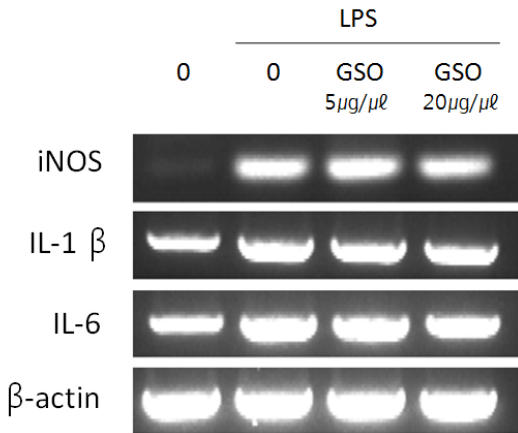


Fig. 4. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on iNOS, IL-1 β and IL-6 mRNA expressions in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells are treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and combined with *Gentiane sino-ornata* (GSO) extract. After 24 hours, cells were analyzed using RT-PCR as described in materials and methods.

4. 세포내 iNOS 및 cytokine 발현 억제능

용담화 추출물이 NO 생성과 관련된 효소인 iNOS와 염증 사이토카인인 IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현에 미치는 영향은 RT-PCR을 수행하여 조사하였다.

실험 결과 RAW264.7 세포에서 LPS 처리 시 iNOS의 발현이 현저히 증가하였고, 또한 용담화 추출물 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도에서 다소 감소하였다. IL-1 β 와 IL-6는 용담화 추출물 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도에서 감소하는 경향을 나타냈으나 그 효과는 크지 않았다(Fig. 4). 이상의 결과 용담화 추출물은 RAW264.7 세포에서 iNOS, IL-1 β 와 IL-6의 발현을 억제하여 NO 생성을 감소시키는 것으로 사료된다.

IV. 고 찰

염증반응(inflammation)은 세균 및 바이러스 등의 미생물들과 생체 이물질들에 의해 활성화된 면역세포 혹은 염증매개인자 (pro-inflammatory mediators)들의 발현에서 부터 시작되며, 병원균들의 감염, 화학적 자극 및 상처 등과 같은 외부자극에 대한 생체조직의 방어기작이다¹⁸⁾. Macrophages는 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로서 LPS와 같은 염증유발물질에 의해 활성화되며¹⁹⁾, 활성화된 macrophages로부터 분비되는 각종 염증 물질들은 염증반응을 유발하여 기관지 천식, 기관지염, 류마티스 관절염, 동맥경화증, 그리고 알츠하이머 병이나 파킨슨 병과 같은 퇴행성 뇌질환과 뇌졸중, 바이러스 감염 등의 발병에 관여한다^{20,21)}. 따라서 최근에는 각종 염증 물질들을 효과적으로 감소시킬 수 있는 항염증제제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 한약재에서 얻은 생리활성 성분이 염증 치료물질이 되고 있다.

용담초(*Gentiana scabra* Bunge)는 다년생 초본으로 초용담(草龍膽), 지담초(地膽草) 등 여러 가지 이름으로 불리고 있으며 용담의 꽃을 용담화(*Gentiana sino-ornata*)라고 한다. 한방에서 사용되는 뿌리의 성미(性味)는 고한(苦寒)으로 간담(肝膽)의 실화(實火)를 사(瀉)하고 청열(淸熱), 조습(燥濕), 하초(下焦)의 습열(濕熱)을 제거하는 효능이 있어 두통, 협통(脇痛), 습진, 피부 및 음낭 소양(搔痒), 황달, 만성 위장 질환에

사용하며¹¹⁾, 대장간균, 백선균, 피부 진균에 대하여 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

Lipopolysaccharide(LPS)는 병원균의 내독소로서 그람 음성 세균의 막 구조물로 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며, 여러 종류의 염증세포 및 조직구성 세포들이 생산하는 cytokine들의 생산을 촉진한다²²⁾. 또한 Raw 264.7 cell과 같은 macrophage 또는 monocyte에서는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{23,24)}.

Nitric oxide (NO)는 아르기닌 (L-arginine)으로부터 산화질소 합성효소 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 생성되는 물질로 NO synthases (NOS)인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 및 constitutive nitric oxide synthase (cNOS or nNOS)에 의해 생성된다. cNOS는 내피세포, 신경세포, 심근세포와 같은 세포 내에 상존 하며 칼슘에 의하여 활성화되어 소량의 NO를 계속 생성한다. 반면 iNOS는 간세포, 혈관 평활근 세포, 섬유 아세포, 마우스의 대식세포와 같은 세포들에서 면역학적 자극이나 염증성 자극에 의해 합성 되고 이들 세포에서는 다량의 NO를 생성한다. 또한 혈관계에 존재하는 eNOS는 염증을 억제하지만 iNOS는 염증을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

과잉 생산된 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다²⁵⁾.

Cyclooxygenase (COX)는 COX-1과 COX-2의 두 가지 이성체가 존재하는데²⁶⁾, 세포가 병적 스트레스를 받으면 세포막에서 지방산의 일종인 Arachidon 산이 유리되고 이를 원료로 하여 COX-1 효소와 COX-2 효소가 스트레스를 해결하기 위하여 염증 매개 물질인 각 prostaglandins (PGs)을 만들어낸다. COX-1은

혈관, 위, 신장의 정상조직에서 발견되며, 혈류의 유지나 점액과 중탄산염의 생성, 신장 기능 조절과 같은 신체의 항상성 유지에 관여하는 반면 COX-2는 염증 반응 뿐 만 아니라 혈액응고, 신장기능, 혈관조절 및 면역 반응 등에 관여하고, 염증성 cytokine이 분비되면 COX-2가 활성화 된다²⁷⁾. 또한 COX-2는 염증조직, 악성 종양조직에서 정상세포에 비해 많은 양의 prostaglandin (PG)의 생성을 유도하여 혈관 생성을 촉진하고 세포의 증식을 도울 뿐 아니라 면역 능력을 억제함으로써 암세포 성장에 좋은 환경을 제공하여 또 다른 질병의 병원성과의 직접적인 연관성을 시사하고 있다²⁸⁾. COX-2가 발현되면 류마티스 관절염 같은 만성염증 질환과 대장, 두경부, 폐, 방광, 전립선, 위 등 인체에 악성 종양이 발견 된 연구 결과들이 보고되었다^{29,30)}. COX에 의해 생성되는 PGs는 염증, 유사분열 생식, 세포의 유착, 면역 감시기구 등에서 중요한 기능을 수행하고 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 유방암, 대장암, 위암, 폐암 등 각종 인체 암의 발생 및 진행에 역할을 한다는 실험적 증거들이 보고³¹⁾되고 있다.

이상의 연구 결과 용담화 에탄올 추출물은 LPS로 활성화시킨 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 NO생성을 저하시키고 염증반응에 관련된 사이토카인의 발현을 억제시켜 높은 항염증 효능을 나타냈으며, 향후 항염증 전략으로 개발하기 위한 기초자료로 응용될 수 있을 것으로 기대한다.

V. 결 론

용담화 에탄올 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 RAW264.7 세포를 활용하여 세포독성과 세포 내 NO (Nitric Oxide) 생성량을 측정하였다. Western blot 분석으로 단백질 발현 양을 측정하였으며 아울러 RT-PCR을 수행하여 RAW264.7 세포 내에서 용담화 추출물의 염증 사이토카인 발현 억제 효

과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 용담화 추출물은 5-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 첨가하였을 때, 대체로 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 유지하여 세포 독성이 없는 것을 확인하였다.
2. 용담화 에탄올 추출물은 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도에서 NO 생성이 80% 이상 억제되는 것으로 나타나 항염 작용이 매우 우수한 것으로 나타났다.
3. 용담화 에탄올 추출물은 COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.

이상의 결과 용담화 추출물은 본 실험에서 세포에 대해 독성을 나타내지 않으면서 항염 효능을 가지고 있는 것으로 보아 항염증 제품을 개발하기 위한 기초 연구의 일환으로 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

References

1. Willoughby DA, Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis*. 1975;34:471-8.
2. Trowbridge HO, Emling RC, Inflammation: a review of the process, 5th ed. Chicago: Quintessence Pub.Co. 1997;3-9.
3. Chung EK, Seo EH, Park JH, Shim JH, Kim KH, Lee BR, Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Korean J Organic Agric*. 2011;2:245-53.
4. Medzhitov R, Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454:428-35.
5. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2009;8:18-30.
6. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy of immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *AnnInternMed*. 1993;119:1198-208.
7. Barton CC, Barton EX, Ganey PE, Kunkel SL, Roth RA. Bacterial lipopolysaccharide enhances aflatoxin B1 hepatotoxicity in rats by a mechanism that depends on tumor necrosis factor- α . *Hepatology*. 2001;33:66-73.
8. Byun BH, Effects of *Inonotus obliquus* Ethanol Extract on Cytokine Expression in Raw 264.7 Cell. *Kor.J.Herbology*. 2005;20(2): 55-60.
9. Lee E. Anti-inflammatory effect of *Scutellariae Radix*. *Korean J.Plant Res*. 2007;20(6):548-52.
10. Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim CH, Kim BW, Park SD. Anti-inflammatory effect of Injinho-tang in RAW 264.7 Cells. *Kor.J.Herbology*. 2008;23(2):169-78.
11. Seo JW. The anti-oxidative activities and separation of the *Gentiana scabra* var. *buergeri* extracts. Wonkwang University. 2008.
12. Kim MS, Kim SC, Jee SY, Hwang SY, Cho WJ, Lee JR et al. Inhibitory effect of *Gentianae Radix* MeOH extract on pro-inflammatory mediator production in lipopolysaccharide activated Raw264.7 cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2008;21(1):28-38.
13. Kim NY, Kang TH, Kim DH, Kim YC. Anitric oxide synthesis inhibitor from the roots of *Gentiana scabra* in RAW 264.7 cells. *J Kor Pharmacogn*. 1999;30(2):173-6.
14. Zhu YP. Harwood academic publishers.

- Amsterdam, Chin, *Mat. Med.* 1998;146-9.
15. Huh H, Kim HK, Lee HK. PAF antagonistic activity of 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid glucose ester from *Genyiana scabra*. *Arch Pharm*. 1988;21(4):436-9.
 16. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1984;24(2-3):119-24.
 17. Green strok CL. Radiation and aging free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med Hypotheses*. 1993;41(5):473-82.
 18. Abul K. *Celluar and Molecular Immunology*. 6th edition. Saunders Elsevier. 2006;75-97.
 19. Iontcheva I, Amar S, Zawawi K H, Kantarci A, Dyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect, Immun*. 2004;72:2312-20.
 20. Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J. Pediatr*. 2004;144:421-9.
 21. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:413-21.
 22. Marriot JB, Westby M, Cookson S, Guckian M, Goodbourn S, Muller G. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- α production. *J Immunol* 1998;161:4236-43.
 23. Willeaume V, Kruids V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J. Inflamm*. 1996;46:1-12.
 24. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogenactivated protein kinases and NF-kappaB regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J*. 2002;366:376-82.
 25. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cell. *The FASEB J*. 1992;6:3051-64.
 26. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase and 2. *Anu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:97-120.
 27. Sato T, Nakajima H, Fujio K, Mori Y. Enhancement of prostaglandin E2 production by epidermal growth factor requires the coordinate activation of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 in human squamous carcinoma A431 cells. *Prostaglandins*. 1997;53:355-69.
 28. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu LP, Miller W et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophage Up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*. 1998;58:1208-16.
 29. Kelly LM, Hill AD, Kennedy S, Connolly EM, Ramanath R, Teh S et al : Lack of prognostic effect of Cox-2 expression in primary breast cancer on short-term follow-up. *Eur J Surg Oncol*. 2003;29:707-10.
 30. Park K, Han S, Shin E, Kim HJ, Kim JY. Cox-2 expression on tissue microarray of breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32:1093-6.
 31. Seo YJ. Role of Cyclooxygenase-2 in

Carcinogenesis and Its Selective Inhibition
for Cancer Chemoprevention, Molecules and
cells, 2002;13(4):8-17.