

MAPKs의 활성화 기전을 나타내는 항염증 소재의 탐색

이 경 호 · *이 기 형*

(주) 종근당, *공주대학교 산업과학대학

Screening of Anti-Inflammatory Herbs having the Activation of MAPK Family Proteins

Keyong Ho Lee and *Ki-Hyeong Rhee*

Chong Kun Dang Pharm., Yongin 446-916, Korea

*College of Industrial Sciences, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

Abstract

The aim of this study was to evaluate the potential anti-inflammatory properties of herbs via MAPKs such as ERK, p38, JNK. Fifty-one kinds of each herbal medicine, that were extracted with ethanol, were used in the inhibitory assay of cytokine (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and NO. of these, 10 species of herbal medicines, *Angelica dahurica*, *Atractylodes lancea*, *Cnidium officinale*, *Duchesnea chrysantha*, *Oldenlandia diffusa*, *Lonicera japonica*, *Paeonia lactiflora*, *Pinus thunbergii*, *Rehmannia glutinosa* and *Rubus coreanus*, were screened as potential inhibitors (< 300 μ g/mL) of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6. Among the 10 species, *Lonicera japonica* showed potential anti-inflammatory effects. *Lonicera japonica* extract of 200 μ g/mL inhibited the phosphorylation of ERK, p38 and JNK. In addition, *Lonicera japonica* extract at 20 mg/kg increased survival rate from LPS-induced endotoxin shock by 3 fold.

Key words: ERK, p38, JNK, *Lonicera japonica*, endotoxin shock

서 론

생약(生藥, Herbal medicine)은 의약품의 일종으로 인체에 유익한 동식물의 본체, 뿌리, 줄기 등 천연으로 산출되는 자연물을 그대로 또는 일차 가공하여 약으로 사용하는 것으로, 단일 성분의 화합물로 된 의약품과는 달리 많은 종류의 성분이 혼재하고 있어 그 효과가 복합적이고 상대적으로 부작용이 적다고 알려져 있다(Lee 등 2003). 생약은 각 개별 약재마다 각각의 특성이 다양하여 다양한 생리활성을 나타낸다. 본 시험에 사용한 51종의 생약 중 다수는 항염증과 관련된 효과가 알려져 있다. 즉, 택사(*Alisma orientale*)는 이뇨, 혈압 강하, 혈중 지방 감소, 죽상동맥경화 방지, 항지방간, 항염, 혈당 강하 등의 효능이 알려져 있다(Hsu 등 2014). 백지(*Angelica dahurica*)는 진정(鎮靜), 진경(鎮痙) 효과가 있어 감기, 두통, 어지럼증과 치통 등에 사용하고, 풍한을 없애고 어혈을 풀고, 피를 잘

돌게 하여 안면신경통, 산전산후의 혈뇨, 하혈 등에 사용된다. 또한 고름을 없애고, 새 살이 잘 돌아나게 하여 옴과 버짐, 치루, 기미와 주근깨, 흉터 등에도 효과적인 생약재로 알려져 있다(Kim & Chi 1990). 창출(*Atractylodes lancea*)은 주로 궤양 등과 같은 위장장애로 주로 사용한다(Kubo 등 1983; Nogami 등 1986). 천궁(*Cnidium officinale*)은 진경, 혈압 강하, 혈관 확장, 항균, 항진균, 비타민 E 결핍증 치료 등이 있고, 보혈 진정 진통의 효과가 알려져 있다(Han 등 2002; Lee 등 1990). 인동(*Lonicera japonica*)은 간 보호, 항균, 항산화 및 항염증 등이 있으며, 보고된 성분으로는 chlorogenic acid, luteolin 및 caffeic acid 등이 있다(Chang 등 1995). 작약(*Paeonia lactiflora*)은 한 방에서 진통, 진경, 진해, 부인과약, 고혈압, 복통 및 염증 치료제로 널리 사용되어 왔으며, 최근에는 심근경색에 대한 효능도 알려져 있다(Xiao 등 2005; Hsieh 등 2006; Lee 등 2008). 그 주된 생리활성물질로서 페오니플로린(paeoniflorin), 페오

* Corresponding author: Ki-Hyeong Rhee, College of Industrial Sciences, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea.
Tel: +82-41-330-1626, E-mail: howard@kongju.ac.kr

놀(paeonol) 및 알비플로린(albiflorin) 등과 같은 여러 모노테르펜 글루코사이드(monoterpene glucoside)와 탄닌 및 페놀산 등이 알려져 있다(Nizamutdinova 등 2008). 지황(*Rehmannia glutinosa*)은 예로부터 자음, 보혈 및 강장의 효능이 있고, 음허발열, 소갈, 혈붕, 월경불순, 태동불안, 음허변비를 치료하여 한약재로서 사용되었다(Lee 등 2011). 복분자(*Rubus coreanus*) 미숙과 성분으로는 gallic acid, 2,3-(s)-HHDP- D-glucopyranose, sanguin H-4, sanguin H-6 등이 있으며(Yoon 등 2002), 생리활성으로는 항산화, 면역 활성 증가, B형 간염바이러스 억제, 항암 및 스트레스 억제 효과 등이 보고되었다(Pang 등 1996; Kim 등 1999; Park 등 2004; Kim 등 2006). 그러나 각각의 생약재에 대한 항염증 효과 다양한 방법 등으로 측정되어 항염증 효과에 대한 기준이 모호하다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 51종의 생약재로부터 *in vitro*에서 LPS로 유도된 염증반응을 억제할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 NO, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현 정도와 MAPKs의 인산화 억제 효과, 그리고 I κ -Ba의 분해 억제 효과의 동일한 조건에 의하여 항염증 후보 물질을 탐색하였고, *in vivo*에서 LPS로 유도된 endotoxin shock model에서 항염증 억제 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 재료

이 실험에 사용한 생약재들은 충북 제천의 약초상에서 구입하여 공주대학교 이기형 교수님의 중 감정 후 사용하였으며, 공주대학교에 보관되어 있다(No. 12-04-03).

2. 추출 및 시료 제조

생약재들을 각각 200 g에 에탄올 2 L를 넣고 2시간 동안 환류 추출하였고, 추출한 용액을 감압농축기로 농축한 후 동결건조기로 건조하였다. 항염증 스크리닝을 위한 *in vitro* 시험의 경우는 실험 전 모든 시료는 최종 DMSO의 농도가 2%가 되도록 희석하여 사용하였고, endotoxin shock 동물 시험의 경우는 건조엑스를 복강 투여로 주사용수에 현탁하여 사용하였다.

3. 실험 동물

실험동물은 8주령 수컷 C57BL/6 마우스(23 ± 3 g)로, 중앙실험동물(주)에서 공급받아 실험동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 고형사료와 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실의 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 상대습도($60 \pm 5\%$)와 명암은 12시간 주기를 유지하였다. 이 동물실험은 공주대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리

위원회의 규정에 따라 수행되었다.

4. NO 억제 효과

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethylenediamide)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고, 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640 배지에서 2×10^5 /well의 밀도로 현탁하였고, 시료를 여러 가지 농도로 처리하였다. LPS(500 ng/mL)로 자극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 μL 의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrophotometer (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다(Wang 등 2014).

5. Cytokine(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 측정

LPS(500 ng/mL)로 RAW 264.7 세포에 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위하여 24시간 후 확인하였으며, LPS를 자극하기 전 시료를 1시간 동안 전처리하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물을 세포 상층액에서 ELISA 법으로 정량하였다. ELISA kit는 BD pharmingen (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 Mouse ELISA kit(TNF- α , IL-1 β , IL-6)를 구입하여 시행하였다(Wang 등 2014).

6. Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/dish로 세포를 배양하고, serum free media(RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 생약 에탄올 추출물(200 $\mu\text{g/mL}$)을 전처리하고, LPS(500 ng/mL)로 자극하여 60분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 cell을 harvest하여 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 mL + phosphatase inhibitor 10 μL + protease inhibitor 10 μL)를 넣어 단백질을 lysis시켜서 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4 \times)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 I κ -Ba를 ECL detection 용액(Amersham)으로 확인하였다(Wang 등 2014).

7. Endotoxin shock

생약 에탄올 추출물을 C57BL/6 마우스에 2 mg/kg과 20 mg/kg의 농도로 복강투여한 후, 1시간 후에 LPS를 50 mg/kg(lethal dose) 주사하고, 3일 동안 12시간마다 생존 여부를 확인하였다. 모든 시험군은 군당 20마리의 개체수로 하였다(Bambirra 등 1984).

8. 통계학적 처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 Student's *t*-test로 처리하였고, 각 농도 군 간에 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 생약 에탄올 추출물의 항염증 효과

생약 에탄올 추출물로부터 RAW 264.7 세포주를 이용한 항염증 효과를 측정하였고, 그 지표로 NO 억제 효능, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성 억제 효능에 대하여 스크리닝하였다.

NO 억제 효능에 대하여 300 μ g/mL 이하에서 정량적으로 IC₅₀ 값을 나타내는 생약은 10종이었다. 활성이 강한 순서로는 *Duchesnea chrysantha*, *Lonicera japonica*, *Rubus coreanus*, *Paeonia lactiflora*, *Rehmannia glutinosa*, *Cnidium officinale*, *Oldenlandia diffusa*, *Angelica dahurica*, *Atractylodes lancea* 및 *Pinus thunbergii*로 나타났다. 가장 활성이 강한 *Duchesnea chrysantha*의 IC₅₀은 39 ± 4 μ g/mL이었고, 다음 순서로는 *Lonicera japonica*로 58 ± 4 μ g/mL의 IC₅₀을 나타내었다.

항염증 효과의 지표로 TNF- α 생성 억제 효능에 대하여 스크리닝 결과, 300 μ g/mL 이하에서 IC₅₀ 값을 갖는 약제는 NO 억제 효과의 결과와 동일한 10종의 약제가 스크리닝 되었다. 활성 순서로는 *Rubus coreanus*, *Lonicera japonica*, *Paeonia*

lactiflora, *Cnidium officinale*, *Atractylodes lancea*, *Rehmannia glutinosa*, *Duchesnea chrysantha*, *Pinus thunbergii*, *Angelica dahurica* 및 *Oldenlandia diffusa*로 나타났다. 가장 활성이 강한 *Rubus coreanus*의 IC₅₀은 65 ± 4 μ g/mL이었고, *Lonicera japonica*은 70 ± 5 μ g/mL의 IC₅₀을 나타내었다.

IL-1 β 생성 억제 효능에 대하여 스크리닝 결과, 300 μ g/mL 이하에서 IC₅₀ 값을 갖는 약제는 10종의 약제이었다. 활성 순서로는 *Lonicera japonica*, *Paeonia lactiflora*, *Rubus coreanus*, *Duchesnea chrysantha*, *Cnidium officinale*, *Atractylodes lancea*, *Rehmannia glutinosa*, *Oldenlandia diffusa*, *Pinus thunbergii* 및 *Angelica dahurica*로 나타났다. 가장 활성이 강한 *Lonicera japonica*의 IC₅₀은 81 ± 2 μ g/mL이었고, *Paeonia lactiflora*은 90 ± 6 μ g/mL의 IC₅₀을 나타내었다.

IL-6 생성 억제 효능에 대하여 스크리닝 결과, 활성 순서로는 *Atractylodes lancea*, *Lonicera japonica*, *Paeonia lactiflora*, *Rubus coreanus*, *Oldenlandia diffusa*, *Pinus thunbergii*, *Cnidium officinale*, *Duchesnea chrysantha*, *Rehmannia glutinosa* 및 *Angelica dahurica*로 10종으로 나타났다. 가장 활성이 강한 *Atractylodes lancea*의 IC₅₀은 89 ± 10 μ g/mL이었고, *Lonicera japonica*은 97 ± 5 μ g/mL의 IC₅₀을 나타내었다(Table 1).

2. MAPKs 및 I κ -B α 활성화에 미치는 영향

생약 에탄올 추출물로부터 RAW 264.7 세포주를 이용한 항염증 효과의 지표로 NO, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 억제 효능 스크리닝을 통하여 선정된 10종의 생약 추출물에 대하여 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 cytokine의 생성을 억제하는 기전을 알아보기 위하여 MAPK family인 ERK, p38, JNK의 활성화 정도와 I κ -B α 분해 정도를 알아보았다. 10종 생약 에탄올 추출물이 전 염증성 인자들(NO, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)을 모두 억제하는 농도로 200 μ g/mL를 선정하였다. LPS로 자

Table 1. Anti-inflammatory effect (IC₅₀ μ g/mL) of each extract from various herbs medicines on RAW 264.7 cells

No.	Scientific name	Part	NO	TNF- α	IL-1 β	IL-6	Yield(%)
1	<i>Aconiti jaluensis</i> (초오)	root	>300	>300	>300	>300	0.1
2	<i>Akebia quinata</i> (목통)	stem	>300	>300	>300	>300	1
3	<i>Alisma orientale</i> (택사)	root	>300	>300	>300	>300	2
4	<i>Angelica dahurica</i> (백지)	root	160±10*	175±9*	180±11*	210±15*	3
5	<i>Angelica tenuissima</i> (고본)	root	>300	>300	>300	>300	5
6	<i>Aralia continentalis</i> (독활)	root	>300	>300	>300	>300	6
7	<i>Arisaema amurense</i> (남성)	root	>300	>300	>300	>300	6
8	<i>Astragalus membranaceus</i> (황기)	root	>300	>300	>300	>300	7
9	<i>Atractylodes lancea</i> (창출)	root, stem	200±15*	119±12*	131±12*	89±10*	6
10	<i>Thuja orientalis</i> (측백엽)	leaf	>300	>300	>300	>300	5
11	<i>Benincasa hispida</i> (동과자)	seed	>300	>300	>300	>300	5

Table 1. Continued

No.	Scientific name	Part	NO	TNF- α	IL-1 β	IL-6	Yield(%)
12	<i>Sasa japonica</i> (죽엽)	leaf	>300	>300	>300	>300	5
13	<i>Carthamus tinctorius</i> (홍화자)	fruit	>300	>300	>300	>300	8
14	<i>Cnidium officinale</i> (천궁)	root	150 \pm 14*	111 \pm 9*	130 \pm 12*	119 \pm 12*	10
15	<i>Cirsium japonicum</i> (대계근)	root	>300	>300	>300	>300	5
16	<i>Cyperus rotundus</i> (향부자)	root, stem	>300	>300	>300	>300	5
17	<i>Cotoneaster dammeri</i> (백자단)	seed	>300	>300	>300	>300	5
18	<i>Cynanchum wilfordii</i> (백하수오)	root	>300	>300	>300	>300	6
18	<i>Cornus officinalis</i> (산수유)	fruit	>300	>300	>300	>300	7
19	<i>Crataegus pinnatifida</i> (산사)	fruit	>300	>300	>300	>300	3
20	<i>Duchesnea chrysantha</i> (뱀딸기)	root	39 \pm 4*	150 \pm 11*	117 \pm 13*	160 \pm 9*	5
21	<i>Fagopyrum esculentum</i> (교맥)	seed	>300	>300	>300	>300	6
22	<i>Oldenlandia diffusa</i> (백화사설초)	aerial part	150 \pm 4*	200 \pm 10*	170 \pm 11*	114 \pm 7*	5
23	<i>Gardenia jasminoides</i> (치자)	fruit	>300	>300	>300	>300	5
24	<i>Glycine max</i> (흑두)	seed	>300	>300	>300	>300	3
25	<i>Lyonia ovalifolia</i> (남축)	leaf, stem, fruit	>300	>300	>300	>300	3
26	<i>Lycopus coreanus</i> (택란)	aerial part	>300	>300	>300	>300	8
27	<i>Lonicera japonica</i> (인동)	leaf, stem	58 \pm 4*	70 \pm 5*	81 \pm 2*	97 \pm 5*	9
28	<i>Millettia velutina</i> (응모애두)	leaf, stem	>300	>300	>300	>300	6
29	<i>Triticum aestivum</i> (신곡)	aerial part	>300	>300	>300	>300	6
30	<i>Cucumis melo</i> (과채)	fruit	>300	>300	>300	>300	7
31	<i>Perilla frutescens</i> (소엽)	leaf	>300	>300	>300	>300	10
32	<i>Morus alba</i> (상지)	stem	>300	>300	>300	>300	8
33	<i>Paeonia lactiflora</i> (작약)	root	87 \pm 5*	73 \pm 10*	90 \pm 6*	101 \pm 9*	7
34	<i>Pinus densiflora</i> (송화)	flower	>300	>300	>300	>300	7
35	<i>Prunus humilllis</i> (옥리인)	seed	>300	>300	>300	>300	9
36	<i>Pinus thunbergii</i> (송절)	stem	207 \pm 5*	160 \pm 7*	173 \pm 7*	115 \pm 9*	5
37	<i>Polygonum aviculare</i> (편축)	aerial part	>300	>300	>300	>300	9
38	<i>Polygonatum odoratum</i> (옥죽)	root, stem	>300	>300	>300	>300	11
39	<i>Peucedani radix</i> (전호)	root	>300	>300	>300	>300	10
40	<i>Pyrus pyrifolia</i> (돌배나무)	root	>300	>300	>300	>300	8
41	<i>Rehmannia glutinosa</i> (지황)	root	111 \pm 3*	130 \pm 6*	140 \pm 7*	170 \pm 9*	9
42	<i>Rubus coreanus</i> (복분자)	fruit	78 \pm 2*	65 \pm 4*	114 \pm 7*	112 \pm 8*	6
43	<i>Selaginella tamariscina</i> (권백)	aerial part	>300	>300	>300	>300	7
44	<i>Santalum album</i> (백단향)	stem	>300	>300	>300	>300	6
45	<i>Siegesbeckia pubescens</i> (희림)	aerial part	>300	>300	>300	>300	9
46	<i>Stranvaesia davidiana</i> (홍자귀)	leaf	>300	>300	>300	>300	5
47	<i>Vitis vinifera</i> (포도등)	aerial part	>300	>300	>300	>300	6
48	<i>Vitis vinifera</i> (포도근)	root	>300	>300	>300	>300	3
49	<i>Zingiber officinale</i> (건강)	root	>300	>300	>300	>300	8
50	<i>Zizyphus jujuba</i> (대추)	fruit	>300	>300	>300	>300	9
51	<i>Zephyranthes candida</i> (흰꽃나도사프란)	whole plant	>300	>300	>300	>300	11

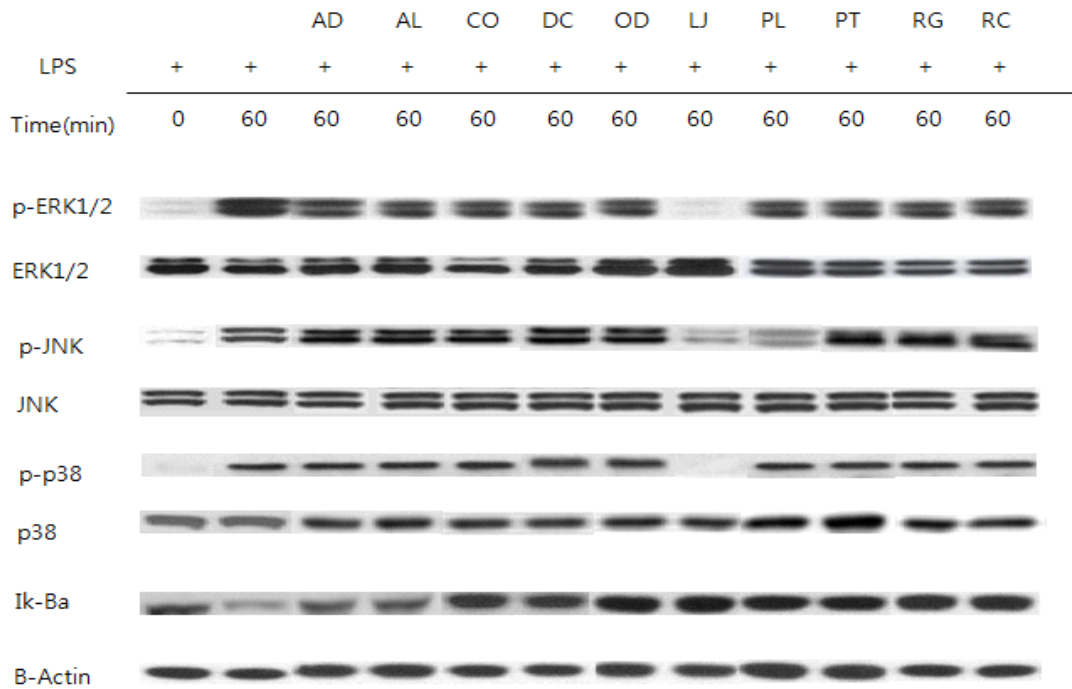
IC₅₀ of diclofenac on NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 were 0.73, 0.61, 0.52 and 1.2 ng/mL. * $p < 0.05$

극된 RAW 264.7 세포의 인산화 정도를 측정된 결과, LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서는 ERK, JNK, p38이 인산화 되었고, 10종 생약 에탄올 추출물 중에서 유일하게 *Lonicera japonica* 추출물에서만 ERK, p38, JNK의 인산화가 억제되었다. *Lonicera japonica* 추출물을 제외한 9종의 생약 추출물 중에서 *Paeonia lactiflora* 추출물의 경우가 JNK 만의 인산화를 억제하였으나, 나머지 ERK와 p38의 인산화에는 영향을 주지 못하였다. 따라서 *Lonicera japonica* 추출물에서만 MAPK family

에 대한 인산화를 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 측정된 I κ -Ba의 분해 정도에 대한 시험 결과, *Lonicera japonica* 추출물의 경우, 다른 생약 추출물과 유사하게 LPS에 의한 I κ -B α 의 분해가 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

3. LPS로 유도된 endotoxin shock의 억제 효과

MAPKs 및 I κ -Ba 활성화 측정을 통하여 항염증 효과가 인



Sample	% of LPS control (60 min)						
	p-ERK1/2	ERK1/2	p-JNK	JNK	p-p38	p38	I κ -Ba
AD	83±9	88±11	93±6	89±12	94±10	100±6	118±19
AL	73±13	90±12	98±5	90±10	91±4	102±5	117±15
CO	70±15	88±13	87±11	89±12	87±12	99±11	131±25
DC	74±15	80±13	89±12	86±12	85±11	96±5	130±18
OD	73±16	100±5	89±16	99±5	94±11	99±5	132±19
LJ	11±5*	94±12	21±8*	96±10	16±5*	92±12	135±12*
PL	71±10	87±13	33±18*	89±10	97±10	95±12	130±24
PT	75±11	79±18	97±10	80±17	99±11	90±17	120±23
RG	72±17	79±17	97±15	84±18	89±15	94±12	119±19
RC	70±16	72±15	89±13	79±14	89±10	91±15	118±17

Fig. 1. Effect of herbal extracts (200 μ g/mL) on the expression of I κ -Ba degradation and MAP family kinase activity on LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. * $p < 0.05$. AD: *Angelica dahurica*, AL: *Atractylodes lancea*, CO: *Cnidium officinale*, DC: *Duchesnea chrysantha*, OD: *Oldenlandia diffusa*, LJ: *Lonicera japonica*, PL: *Paeonia lactiflora*, PT: *Pinus thunbergii*, RG: *Rehmannia glutinosa*, RC: *Rubus coreanus*

정된 *Lonicera japonica* 추출물에 대하여 endotoxin shock 억제 효과를 측정한 결과, LPS만 주사한 군은 48시간에 endotoxin shock으로 인해 20마리 중에서 15마리가 사망하였고, 5마리만 생존하여 25%의 생존율을 나타내었다. 하지만 *Lonicera japonica* 추출물 20 mg/kg을 처리한 실험군에서 48시간에서 endotoxin shock으로 인한 사망 개체수가 없었다. 그러나 62시간에서 4마리가 사망, 69시간에서 2마리가 추가로 사망하여 시험 종료(72시간)까지 총 6마리가 사망하였다. 시험 종료 시점에서는 생존율은 70%을 나타내어 유의성 있게 endotoxin shock에 의한 사망을 억제하였다. *Lonicera japonica* 추출물 2 mg/kg을 처리한 실험군에서는 LPS군과 유사하게 48시간에서 개체가 사망하였으나, 그 생존율은 40%로 LPS군 대비는 높았으며, 시험 종료 시점까지 더 이상의 사망 개체수는 나타나지 않았다(Table 2). 따라서 *Lonicera japonica* 추출물 2 mg/kg 및 20 mg/kg은 LPS에 의한 endotoxin shock을 억제하는 것으로 나타났다.

염증은 손상에 대한 살아 있는 조직의 반응으로 조직 손상을 국소화시키고, 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 방어기전이다. 즉, 생체에 유해한 자극이 가해지고 난 후의 방어기전으로부터 수복 과정까지의 모든 경과를 가리킨다. 염증의 진행은 염증부위로부터 히스타민, 브라디키닌, 프로스타글란딘 등의 화학물질이 분비되어 진행된다. 국소증상은 발적, 종창, 열감, 동통, 부종, 기능장애 등의 징후가 있다. 면역 반응, 백혈구 증가와 같은 전신증상도 나타나는 경우가 있다(Trowbridge & Emiling 1997). 특히 염증 부위의 활성화된 macrophage는 cytokine, prostaglandin, nitric oxide(NO) 등을 생성함으로써 염증 매개 역할을 한다(Nathan CF 1987). NO는 라디칼을 가진 가스성의 물질이며, 생체 내에서 짧은 시간 동안만 존재한다. NO는 생체 내에서 심혈관계의 항상성 조절과 혈액응고, 신경전달 등에서 중요한 역할을 하지만, 독성을 나타내기도 한다. NO의 과잉 생성은 circulatory shock, atherosclerosis, cardiac allograft rejection, chronic inflammation, cardiac infarction, cancer 등과 연관이 있음이 밝혀지고 있다 (la Sala 등 2005). 다량의 NO는 염증 반응을 야기하거나 cyclo-

oxygenase(COX)의 활성을 촉진시켜 염증 반응을 심화시키므로, NO 생성 억제는 항염증제의 기전을 연구하는 데 있어 좋은 치료 target이라고 할 수 있다(Van Snick 1990). 또한 염증 반응이 시작되면 염증반응의 전사인자인 NF- κ B가 활성화되는데, NF- κ B의 활성화는 먼저 IL-1 β , IL-6, IL-8과 TNF- α 를 포함하는 일부 주요 염증 촉진 단백질의 유전자 발현을 조절한다(Kranzhofer 등 1999). IKK의 활성은 NF- κ B Rel A와 I κ -Ba의 인산화와 유비퀴티네이션과 프로테아좀 분해를 촉진하며, NF- κ B 조합체는 핵으로 전사되고, NF- κ B의 서브유닛인 Rel A와 κ B 의존적인 유전자를 활성화한다. 따라서 NF- κ B 활성은 I κ -Ba의 감소를 통해 알아낼 수 있다(Kranzhofer 등 1999).

본 연구에서는 *Lonicera japonica* 에탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 자극된 유도된 RAW 264.7 세포로부터 NO의 생성과 다양한 염증성 세포활성물질의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. *Lonicera japonica* 에탄올 추출물의 처리에 의하여 LPS에 의해서 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성량을 억제하였다. 또한 LPS 자극으로 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 분비되는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 억제하였고, MAPK family인 ERK, p38 및 JNK의 인산화와 I κ -Ba의 분해는 억제하였다. 이 결과를 통해 *Lonicera japonica* 에탄올 추출물은 MAPK family인 p38과 JNK의 신호전달 억제와 I κ -Ba 분해 억제를 통하여 염증성 cytokine의 생성을 억제하는 것을 알 수 있다.

장기나 조직으로부터의 과도한 cytokine의 분비는 endotoxin shock을 유발하여 사망을 초래한다. *Lonicera japonica* 에탄올 추출물의 cytokine 분비억제는 shock 억제에 응용이 가능할 것으로 추측하여 LPS로 유도한 endotoxin shock 모델에서 생존율을 측정하였다. *Lonicera japonica* 에탄올 추출물은 LPS로 유도한 endotoxin shock에서 생존율은 LPS 유발군 25%에서 *Lonicera japonica* 에탄올 추출물 20 mg/kg에서 생존율을 3배 이상 증가시켰으며, 생존시간은 LPS 유발군 48시간에서 *Lonicera japonica* 에탄올 추출물의 경우 62~69시간으로 1.3~1.4배 증가시켰다. 이러한 결과는 *Lonicera japonica* 에탄올 추출물의 cytokine 분비 억제 효과가 *in vitro* 뿐만 아니라, *in vivo*에서도 탁월하여 shock을 억제한 것으로 사료된다. 본 실험의 결과는 Lee 등(2011)과 Wang 등(2014)에서 도출된 결과와 비록 추출물의 추출조건을 상이하나, 항염증의 효과에서는 유사한 효능을 나타내었다. Wang 등(2014)은 *Lonicera japonica* 의 물 추출물에서 LPS 유도로 생성된 염증 반응에서 NO 및 염증성 사이토카인 TNF- α , COX-2 및 IL-6에 대한 억제 효과를 나타내었고, Lee 등(2011)의 연구에서는 *Lonicera japonica* 의 부탄올 추출물에서 LPS 유도로 생성된 IL-6의 감소시키는 결과를 얻어 항염증 효과가 있음을 보고하였다.

Table 2. Survival number by treatment of *Lonicera japonica* extract (20 mg/kg and 2 mg/kg) against LPS-induced endotoxin shock in C57BL/6 mice

Group	Time (hour)				
	0	48	62	69	72
LPS	20	5	5	5	5
LPS + LJ 2 mg/kg	20	8	8	8	8
LPS + LJ 20 mg/kg	20	20	16	14	14

LJ: *Lonicera japonica*

따라서 본 실험결과들을 통해 *Lonicera japonica* 에탄올 추출물의 항염증 효과는 ERK, p38 및 JNK의 인산화를 저해하고, NF- κ B 활성을 억제하여 NO와 IL-1 β , IL-6의 생산을 억제함을 통해 일어남을 확인할 수 있어, *Lonicera japonica* 에탄올 추출물의 뛰어난 항염증 효과가 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

Lonicera japonica 에탄올 추출물의 처리에 의하여 LPS에 의해서 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성량과 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 억제하였고, MAPK family인 ERK, p38 및 JNK의 인산화와 I κ -B α 의 분해를 억제하였다. LPS로 유도한 endotoxin shock 동물실험에서 *Lonicera japonica* 에탄올 추출물 20 mg/kg에서 LPS로 유도한 endotoxin shock에 대한 생존율을 3배 이상 증가시켰으며, 생존시간도 1.3~1.4배 증가시켰다.

References

- Ameri A. 1998. The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system. *Prog Neurobiol* 56:211-235
- Bambirra EA, da Cruz MQ, Campos DS, Lima AO. 1984. Some characteristics of the hyperreactivity to bacterial lipopolysaccharide induced in mice by *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79:433-437
- Chang CW, Lin MT, Lee SS, Karin CS, Liu C, Hsu FL. 1995. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera japonica* Thunb. and *Castanopsis hystrix*. *Antiviral Res* 27:367-374
- Han SH, No DI, Lee KT, Shon YH, Baek TS, Nam JS, Lim JK. 2002. Effect of *Cnidium officinale* Makino aqua-acupuncture solution on carcinogen-induced carcinogenesis in *in vitro*. *J Korean Meridian Acupoint* 19:7-13
- Hsieh CL, Cheng CY, Tsai TH, Lin IH, Liu CH, Chiang SY, Lin JG, Lao CJ, Tang NY. 2006. Paeonol reduced cerebral infarction involving the superoxide anion and microglia activation in ischemia-reperfusion injured rats. *J Ethnopharmacol* 106:208-215
- Hsu PC, Tsai YT, Lai JN, Wu CT, Lin SK, Huang CY. 2014. Integrating traditional Chinese medicine healthcare into diabetes care by reducing the risk of developing kidney failure among type 2 diabetic patients: a population-based case control study. *J Ethnopharmacol* 156:358-364
- Kim HS, Chi HJ. 1990. Studies on essential oils of plants of *Angelica* genus in Korea(III). *Kor J Pharmacogn* 21:121-125
- Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi, JS, Kwon OS, Lee HY. 2006. Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. *Korean J Med Crop Sci* 14:206-211
- Kim TG, Park MS, Han HM, Kang SY, Jung KK, Rhee HM, Kim SH. 1999. Inhibitory effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on Hepatitis B virus replication in HepG2 2.2.15 cells. *Yakhak Hoeji* 43:458-463
- Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. 1999. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1623-1629
- Kubo M, Nogami M, Nishimura M, Moriura T, Arichi S. 1983. Studies of crude drugs about its origin, process and quality. I. The preventive effects of Chinese crude drug 'Zhu' on experimental stomach ulcer and its pharmacological evaluation (1). *Yakugaku Zasshi* 103:442-448
- la Sala A, Gadina M, Kelsall BL. 2005. G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J Immunol* 5:2994-2999
- Lee KH, Whang KS, Rhee KH. 2011. Effects of *Lonicera japonica* Thunb. on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice. *J Med Plants Res* 5:5437-5443
- Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS, Song J. 2003. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Korean J Med Crop Sci* 11:127-134
- Lee SM, Yoon MY, Park HR. 2008. Protective effects of *Paeonia lactiflora* Pall on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:1272-1277
- Lee SY, Kim MJ, Yim DS, Chi HJ, Kim HS. 1990. Phthalide content of *Cnidium* Rhizome. *Kor J Pharmacogn* 21:69-73
- Lee SY, Yean MH, Kim JS, Lee JH, Kang SS. 2011. Phytochemical studies on *Rehmanniae radix*. *Kor J Pharmacogn* 42:127-137
- Nathan CF. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:319-326
- Nizamutdinova IT, Jin YC, Kim JS, Yean MH, Kang SS, Kim

- YS, Lee JH, Seo HG, Kim HJ, Chang KC. 2008. Paeonol and paeoniflorin, the main active principles of *Paeonia albiflora*, protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Planta Med* 74:14-18
- Nogami M, Moriura T, Kubo M, Tani T. 1986. Studies on the origin, processing and quality of crude drugs. II. Pharmacological evaluation of the Chinese crude drug 'zhu' in experimental stomach ulcer. (2). Inhibitory effect of extract of *Atractylodes lancea* on gastric secretion. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 34:3854-3860
- Pang KC, Kim MS, Lee MW. 1996. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. *Kor J Pharmacogn* 27:366-370
- Park JH, Kim YJ, Mun YJ, Lee YC, Woo WH. 2005. Inhibitory effect of methanolic extract of *Cnidii rhizoma* on the melanogenesis. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 19:938-944
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung JK, Bang JK, Lee HY. 2004. Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedera sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. *Kor J Biotechnol Bioeng* 19:113-117
- Trowbridge HO, Emiling RC. 1997. In *Inflammation : A Review of the Process*. 5th ed. Quintessence Pub. Co., Chicago
- Van Snick J. 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8:253-278
- Wang JH, Bose S, Kim GC, Hong SU, Kim JH, Kim JE, Kim H. 2014. Flos *Lonicera ameliorates* obesity and associated endotoxemia in rats through modulation of gut permeability and intestinal microbiota. *PLoS One* 9:e86117
- Xiao L, Wang YZ, Liu J, Luo XT, Ye Y, Zhu XZ. 2005. Effects of paeoniflorin on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Life Sci* 78:413-420
- Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH. 2002. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Korean J Food Sci Technol* 34:898-904

Received 9 February, 2015

Revised 11 May, 2015

Accepted 1 June, 2015