



Original Article / 원저

죽엽 열수추출물의 염증억제 효과

손진원[#], 박상미[#], 정지윤, 황보민, 조일제, 정태영, 박정아, 김상찬, 지선영*

대구한의대학교 한의과대학

Anti-inflammatory Effects of the Water Extract of *Phyllostachys Folium* via NF- κ B Inhibition

Jin Won Son[#], Sang Mi Park[#], Ji Yun Jung, Min Hwangbo, Il Je Cho, Tae Young Jung, Chung A Park, Sang Chan Kim, Seon Young Jee*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610,
Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : *Phyllostachys Folium* is leaves of *Phyllostachys nigra* var. *henesis* STAPF. In the East Asian traditional medicine, the herb has been used to treat nasal bleeding, dysuria, epilepsy and etc. The present study was conducted to evaluate the anti-inflammatory effects of the *Phyllostachys Folium* water extracts (PFE) *in vitro* and *in vivo* model.

Methods : Cell viability was measured by MTT assay after the treatment of PFE and NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. iNOS, COX-2, I κ B, p-I κ B α and NF κ B were detected by immunoblot analysis, and levels of cytokine were analyzed by sandwich ELISA kit. Anti-edema effect of PFE was determined in the carrageenan-induced paw edema model in rats.

Results : LPS increased NO and cytokines levels compared with control, these increases were attenuated by PFE. In addition, LPS-induced pro-inflammatory proteins such as iNOS, COX-2 were down regulated by PFE. These anti-inflammatory effect of PFE results from inhibition of phosphorylation of I κ B and translocation of NF- κ B.

Conclusion : These results show that PFE has some anti-inflammatory effects which might play a role in gram-negative

bacterial infection inflammation and NF κ B activated diseases.

Key Words : Phyllostachys Folium, Anti-inflammatory effects, NF- κ B.

I. 서론

죽엽 (竹葉; Phyllostachys Folium)은 禾本科 (벼과; Gramineae)에 속한 여러 해 살이 常綠喬木인 藎대 *Phyllostachys nigra* var. *henonis* STAPP의 잎을 건조한 것으로¹⁻³⁾, 性味는 甘淡寒하며, 心肺膽胃에 작용한다. 清熱除煩, 生津利尿의 효능으로 熱病煩渴, 小兒驚癇, 咳逆吐衄, 面赤, 小便短赤, 口糜舌瘡 등을 치료한다³⁾.

죽엽에는 friedelin, glutinol, luteolin 6-C- α -L-arabinopyranoside, tricin, isoorientin 등의 성분이 있는 것으로 알려져 있으며⁴⁾, 생리활성에 대한 연구로는 죽엽추출물이 고지방식이 및 알콜로 유도된 동물모델에서의 고지질혈증 개선효과^{2,5)}, 죽엽의 항산화 화합물인 methyl chlorogenic acid 유도체 (MCGA)-3의 항산화효과⁶⁾, 죽엽추출물의 GABA신경계를 통한 항불안효과⁷⁾, 죽엽 물추출물 및 에탄올추출물의 항균효과⁸⁾, 죽엽추출물의 항암효과⁹⁾, CCl₄로 유도된 간손상 및 알콜의 반복투여로 유도된 간손상에 대한 간보호효과^{2,10)}가 보고되었다. 그러나 아직까지 죽엽의 항염증효과에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

대식세포는 염증 반응시 interleukin (IL)-1 β , -6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 다양한 사이토카인을 생산하여 생체 방어에 중요한 역할을 한다^{11,12)}. Lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성 박테리아의 세포벽 구성성분으로, 국소 및 전신의 염증반응을 유발하며, 대식세포의 toll-like receptor 4 (TLR4)와 결합하여 I κ B kinase cascade를 통하여 다양한 전염증성물질들을 생성시키므로 염증반응 및 항염증약물의 연구에서 빈용되는 연구모델이다¹³⁾. 홍조류(red seaweed)에서 추출되는 carrageenan (CA)은 급성염증반응을 유도하므로, 약물의 항염증효과 평가와 염증매개물질의 조절에 관한 연구의 동물모델로 사용되고 있다^{14,15)}.

본 연구에서는 죽엽이 清熱瀉火藥임에 근거하여 죽엽추출물의 항염증활성을 평가하고자 하였다. *In vitro* 연구로 LPS로 활성화된 설치류 대식세포주인 Raw 264.7 cells 모델에서 염증의 기전 및 염증관련 cytokine의 발현에 대한 평가를 하였으며, *in vivo* 연구로 CA로 유도된 rat의 죽부종에 대한 부종억제효과를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물(PFE)의 제조

죽엽 (Phyllostachys Folium)은 대원약업사(대구)에서 구입하였으며, 죽엽 300 g에 물 1.5 L를 넣고 약탕기 (대웅, 한국)로 3시간 추출한 후, 추출물을 거르로 1차 여과하고 3000 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하여 9.08 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 죽엽추출물 (Phyllostachys Folium Extract; PFE)의 수율은 3.0%였으며 *in vitro* 처치시에는 DMEM에 녹여 사용하였으며, *in vivo* 실험에서는 생리식염수에 녹여 사용하였다.

2. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)와 LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, USA)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS), Penicillin 및 streptomycin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. Western blot에 사용된 antibody들은 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Cayman (Ann Arbor, MI, USA), Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 각각 구입하였고, NC paper

Authors contributed equally

* Corresponding author: Seon Young Jee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-770-2272 Fax : +82-53-819-1860, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr

• Received : September 29, 2016 / Revised : November 5, 2016 / Accepted : November 8, 2016



는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6의 ELISA kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells는 80-90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않고 사용하였다.

4. 세포생존율의 측정

Raw 264.7 cells를 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well로 분주한 다음 PFE를 농도별로 처리하여 MTT assay를 시행하였다. 세포에 10-100 μ g/ml의 농도로 PFE를 처리한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 배양기에서 24시간 배양하고, 각 well당 MTT (0.1 mg/ml)용액을 50 μ l씩 넣고 4시간 배양한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 Titertek Multiskan automatic microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, LPS와 PFE의 동시처리에 의한 세포생존율 역시 동일한 방법으로 세포생존율을 구하였다. 세포생존율은 control cells에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% of control) = 100 \times /(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

5. NO 생성량 측정

Raw 264.7 cells로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액에 Griess 시약을 처리하여 측정하였다. PFE를 1시간 전처리한 후, LPS를 24시간 처리하고, 각 군별 세포배양 상등액 50 μ l을 96 well plate에 넣고, Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ l를 혼합하고 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan automatic microplate reader로 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 control cell의 NO에 대한 비율로 나타내었다. [i.e. NO production (fold) = (absorbance of treated

sample)/(absorbance of control)].

6. Immunoblot analysis

염증관련 단백질의 발현을 관찰하기 위하여, 처리된 세포들을 PBS로 수거한 후, 20 mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 세포를 용해시켰다. 전세포추출액을 10,000 \times g로 10분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동 후, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이하였다. 이 membrane에 iNOS, COX-2, p-I κ B, NF κ B, actin, lamin 등의 항체에 반응 및 blocking과 세척 후 horseradish peroxidase conjugated secondary antibody를 결합시키고, 이를 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 발색하였다. β -actin과 lamin A/C는 각 단백질의 loading control로 사용되었다.

7. 핵분획의 준비

LPS 및 PFE가 처리된 Raw 264.7 cells를 PBS로 세척한 후, PBS 1 ml을 가하여 수거하고, 원심분리하여 세포들을 microtubes에 수거하였다. 10 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 4 μ g/ml leupeptin, 0.5 mM PMSF를 함유하는 hypotonic buffer 100 μ l를 가하여 vortex하고, 얼음 위에서 10분간 배양하였다. 이를 4 $^{\circ}$ C에서 7,800 \times g로 10분간 원심분리한 후, pellet에 10 mM HEPES (pH 7.6), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 25% glycerol, 4 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF을 함유하는 extraction buffer를 50 μ l를 가하여, vortex한 후 얼음 위에서 1시간 동안 방치하였다. 이를 다시 14,000 \times g로 15분간 원심분리하여, 핵분획을 포함하고 있는 상등액을 취하였다.

8. Cytokine 및 PGE₂의 측정

Cytokine 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 측정하기 위하여 6 well plate에 cells (5 \times 10⁵/ml)을 분주하고

PFE를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치 후 특정 시간에 배지를 수거하여 cytokine과 PGE₂를 측정하였다. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6와 PGE₂는 ELISA kit를 사용하여 측정하였다.

9. 실험동물 및 처치

실험동물은 4주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (130-160 g)를 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC)의 규정에 따라 윤리위원회의 승인 (DHU2013-091)을 획득한 후 시행하였다.

실험은 아무런 처치를 하지 않은 군을 Control군, carrageenan (100 μ l/rat)만을 피하주사한 CA군, carrageenan과 dexamethasone (1 mg/kg, p.o.)을 투여한 DEXA군, carrageenan과 0.3 g/kg의 PFE를 투여한 0.3 g/kg PFE군, carrageenan과 1.0 g/kg의 PFE를 투여한 1.0 g/kg PFE군으로 나누었으며, 각 군당 수는 5마리로 하였다. Dexamethasone과 PFE는 4일 동안 매일 1회 투여하였으며, 마지막 약물투여 1시간 후 carrageenan을 100 μ l/rat로 rat의 오른쪽 발바닥에 주입하여 족부종을 유발하였다. 족부종의 측정은 carrageenan 주입 후 0, 1, 2, 3, 4시간에 부종 측정기 (Plethysmometer, LE 7500; LETICA Scientific Instruments, Spain)를 이용하여 부종 정도를 측정하였다.

10. 통계적 검증

실험 결과는 mean \pm SD로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

III. 실험결과

1. PFE가 Raw 264.7 cells의 세포생존율에 미치는 영향

Raw 264.7 cells에 PFE를 10-1000 μ g/ml의 농도로 처치하고 24시간 배양후 세포생존율을 측정하였다.

Control을 100.00 \pm 0.98%로 하였을 때, PFE 10, 30, 100, 300, 1000 (μ g/ml)은 각각 104.66 \pm 2.51, 107.90 \pm 7.17, 126.81 \pm 1.96, 136.89 \pm 7.83, 136.64 \pm 11.66 (%)의 세포생존율을 보여 PFE는 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

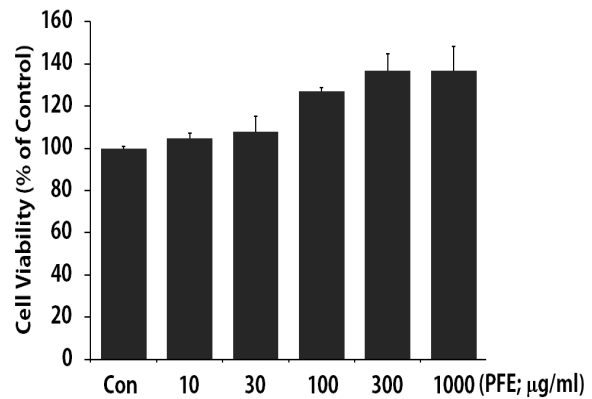


Fig. 1. The effects of PFE on the cell viability on Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with 10-1000 μ g/ml of PFE dissolved in media for 24 h, and the cells were treated with MTT solution for 4 h. The method of MTT assay was described in the materials and methods section. Data represent the mean \pm SD with eight separate experiments.

2. PFE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cells의 NO 생성에 미치는 영향

PFE를 10-300 μ g/ml의 농도로 24시간 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 Control군에 비교하여 NO의 생성량이 2.76 \pm 0.35 배로 유의하게 증가하였으며, 이러한 NO의 증가는 PFE 30, 100, 300 (μ g/ml)의 농도에서 각각 2.17 \pm 0.06, 2.06 \pm 0.11, 1.80 \pm 0.04배로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 2A).

또한 PFE와 LPS의 병용처치에 의한 세포생존율은 control군을 100.00 \pm 2.21%로 하였을 때, LPS 단독 처치군은 58.39 \pm 3.56%로 유의하게 감소하였다. 그러나 PFE와 LPS의 병용처치는 PFE 10, 30, 100, 300 (μ g/ml)의 농도에서 각각 69.06 \pm 3.70, 66.35 \pm 3.16, 70.36 \pm 3.15, 66.53 \pm 3.76 (%)으로서 LPS의 단독처치에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2B).

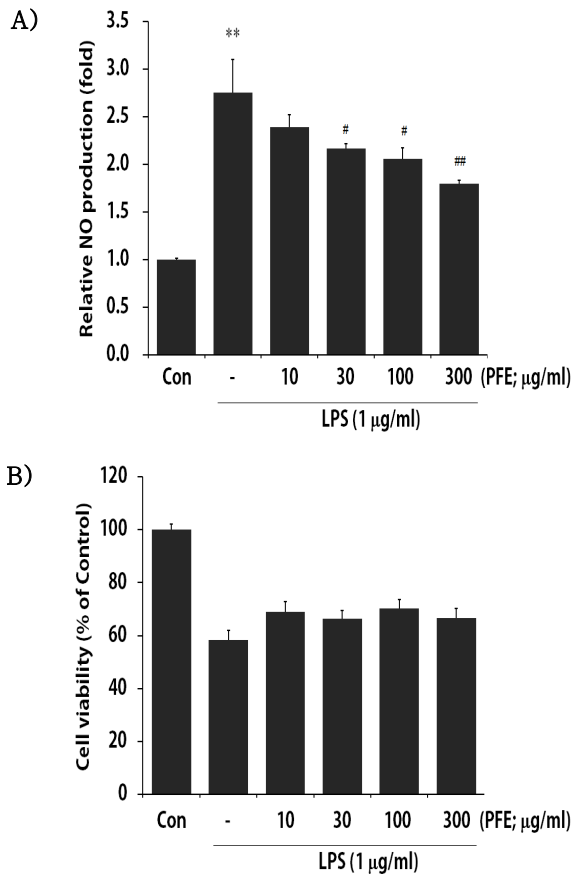


Fig. 2. The effects of PFE on production of nitric oxide (A) and cell viability (B) on Raw 264.7 cells
 Raw 264.7 cells were treated with 10–300 µg/ml of PFE dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of NO in culture medium were monitored as described in the materials and methods section (A). Effect of cell viability on LPS+PFE-treated cells were determined by MTT assay (B). Data represent the mean ± SD with eight separate experiments. (*, significant as compared to control. **P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, #P<0.05, ##P<0.01)

3. PFE가 iNOS의 발현에 미치는 영향

PFE가 유의한 세포독성 없이 NO를 억제하였으므로, NO의 생성과 관련되는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 단백질의 발현을 평가하였다. LPS 처치 시에는 iNOS 단백질의 발현이 증가되었으나, LPS에 PFE를 처치한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 뚜렷하게 감소되었다 (Fig. 3).

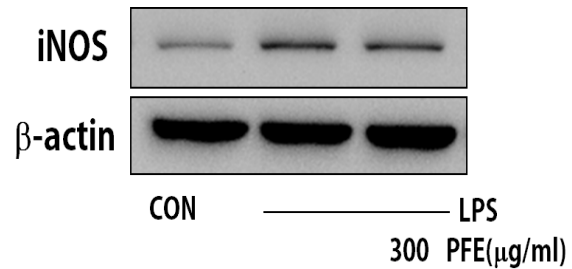


Fig. 3. The effects of PFE on the induction of iNOS expression on LPS-activated Raw 264.7 cells.

The levels of iNOS expression were monitored 24 h after treatment of LPS (1 µg/ml) with or without PFE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The β-actin was used as a loading control in total cell lysate.

4. PFE가 COX-2의 발현과 PGE2에 미치는 영향

염증반응에서 중요한 역할을 하는 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 LPS 처치 시에는 COX-2 단백질이 현저하게 발현 증가되었으나, PFE를 전처리한 실험군에서는 COX-2의 발현이 뚜렷하게 감소하였다 (Fig. 4A). Cyclooxygenase pathway를 통하여 생성되는 PGE₂는 Control군에서 24.55 ± 12.61 pg/ml를 나타내었고, LPS는 3188.66 ± 237.74 pg/ml로 유의성 있게 증가하였으며, PFE는 100과 300 µg/ml에서 PGE₂를 각각 2317.59 ± 151.86, 1590.59 ± 120.37 (pg/ml)로 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 4B).

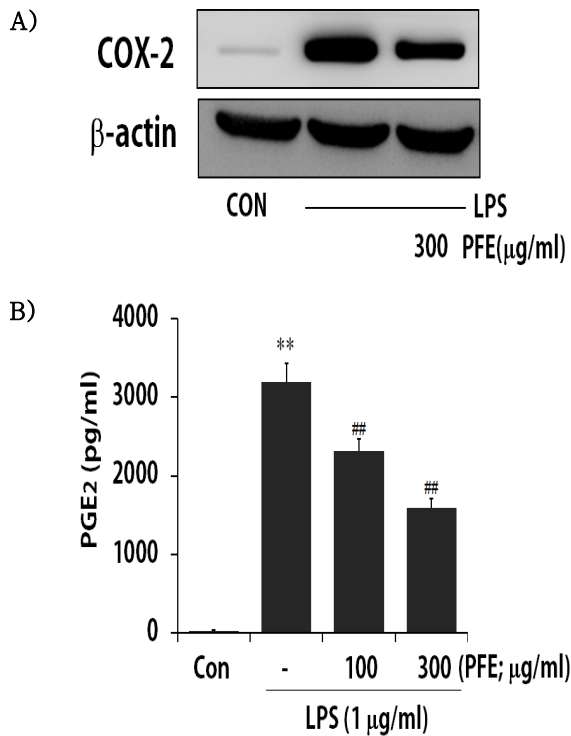


Fig. 4. The effects of PFE on the induction of COX-2 expression (A) and PGE₂ production (B) on LPS-activated Raw 264.7 cells.

The levels of COX-2 were monitored 24 h after treatment of LPS (1 μg/ml) with or without PFE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The β-actin was used as a loading control (A). Cells were cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of PFE for 24 h to determine the level of PGE₂. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE₂ (B). The data represent the mean ± SD of three separate experiments.

(*: significant compared with the control, **P<0.01, #: significant compared with the LPS alone, ##P<0.01).

5. PFE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cells의 cytokine 생성에 미치는 영향

활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-1β, IL-6, chemokine 등을 생산하며, TNF와 IL은 패혈성 쇼크의 중요한 매개체로서 염증반응의 핵심적 역할을 한다. 본 연구에서 LPS는 control 대비 TNF-α의 분비를 108.65 ± 1.46배 유의성 있게 증가시켰으며, PFE는

100, 300 (μg/ml)의 농도에서 TNF-α의 생성량을 각각 85.84 ± 4.10배, 77.72 ± 2.55배로 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 5A). 또한 LPS는 control 대비 IL-6의 생성을 102.83 ± 4.90배로 유의성 있게 증가시켰으며, PFE는 100, 300 (μg/ml)에서 각각 53.67 ± 1.95, 33.16 ± 0.36배로 LPS로 증가된 IL-6를 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 5B).

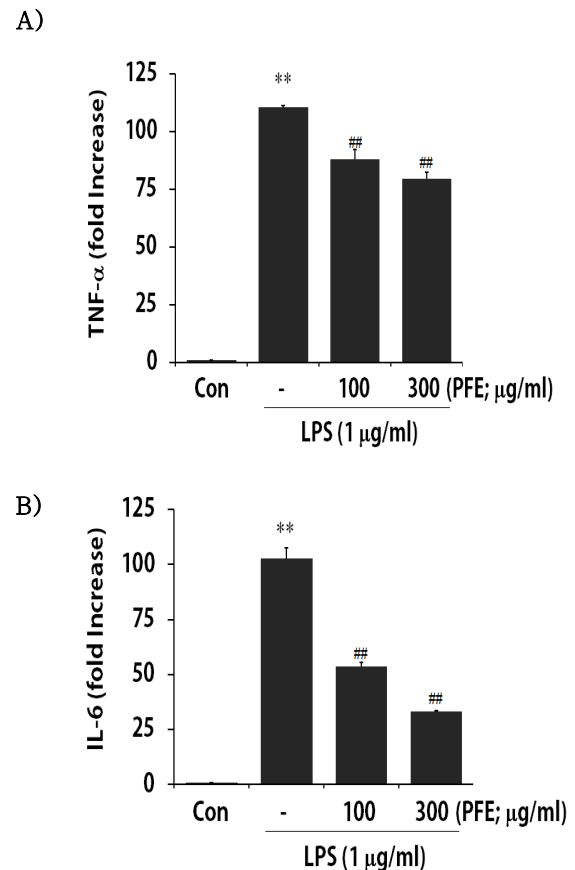


Fig. 5. The effect of PFE on the cytokines in LPS-activated Raw 264.7 cells.

Production of cytokines was measured in the media of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of PFE for 12 h (TNF-α) and 6 h (IL-6), respectively. The amount of cytokines was measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean ± SD with three separate experiments. (*, significant as compared to control. **P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, ##P<0.01)

6. PFE가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 NF-κB pathway에 미치는 영향

비활성 대식세포에서는 NF-κB가 세포질에서 inhibitory-κB와 결합형으로 존재하나, 활성화되면 I-κB가 인산화되고, NF-κB가 핵으로 들어가 iNOS, COX-2 등의 전사를 유도하게 된다. 본 연구에서는 세포질에서 IκBa의 발현과 인산화를, 핵분획에서 NF-κB의 발현을 평가하였다.

세포질에서 p-IκBa는 LPS처치에 의하여 뚜렷하게 증가하였으며, PFE 300 μg/ml의 전 처치에 의해 IκBα의 인산화가 현저하게 감소되었다. 또한 IκBa는 LPS에 의하여 감소되었고, 이러한 감소는 PFE의 전 처치에 의하여 증가되었다 (Fig. 6A). 핵내에서의 NF-κB는 LPS 처치에 의해 증가하였으며, PFE는 핵분획에서의 NF-κB를 감소시켰다 (Fig. 6B).

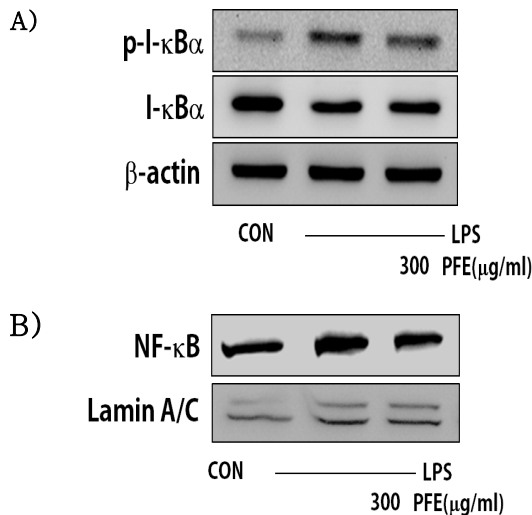


Fig. 6. The effect of PFE on the NF-κB pathway in LPS-activated Raw 264.7 cells.

The levels of p-IκBa, IκBa (A) and nuclear NF-κB proteins (B) were monitored after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) with or without PFE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). β-actin and lamin A/C were used as a loading control for lysate and nuclear fraction, respectively.

7. PFE가 carrageenan으로 유도된 rat의 족부종에 미치는 영향

PFE가 LPS에 의해 활성화된 NF-κB를 억제하여

*in vitro*에서 염증매개물질을 억제함을 확인하고, carrageenan (CA)으로 유도된 염증동물모델에서 족부종을 측정하였다. CA군의 족부종은 control군에 비교하여, 1, 2, 3, 4 시간에 각각 149.61 ± 18.22 , 164.85 ± 13.42 , 174.25 ± 9.02 , 169.01 ± 8.66 (%)로 유의한 발 부종을 유발하였다. Dexamethasone (DEXA)군에서는 각각 112.32 ± 4.77 , 112.07 ± 4.17 , 118.69 ± 5.22 , 110.26 ± 6.84 (%)로 유의한 족부종억제를 나타내었다. PFE 0.3 g/kg를 투여한 군에서는 1-4 시간에 각각 133.31 ± 6.00 , 161.51 ± 3.07 , 169.68 ± 4.79 , 146.90 ± 14.71 (%)를 나타내어 4 시간에 유의한 족부종의 억제를 나타내었으며, PFE 1.0 g/kg를 투여한 군에서는 각각 122.97 ± 11.00 , 150.11 ± 9.79 , 157.74 ± 12.24 , 140.59 ± 2.65 (%)로 1, 4시간에 유의한 족부종의 억제를 나타내었다 (Fig. 7).

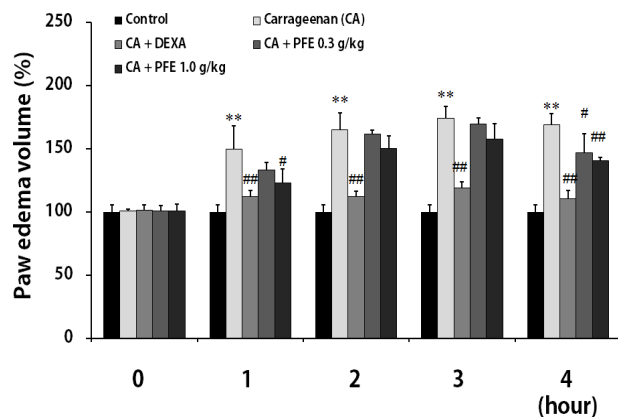


Fig. 7. The effect of PFE on the carrageenan-induced paw edema.

PFE was administered to rats at an oral dose of 0.3 and 1.0 g/kg/day for 4 days before the induction of carrageenan (CA) injection. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of CA dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The swelling of the paw was measured 0-4 h after CA injection. Dexamethasone (DEXA; 1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean \pm SD of five animals. (*: significant compared with the Control, **P<0.01, #: significant compared with the carrageenan alone, #P<0.05, ##P<0.01)

IV. 고찰

본 연구는 죽엽의 항염증효과를 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 죽엽의 처치가 염증매개물질에 미치는 영향과 carrageenan으로 유도된 염증성 족부종에 대한 죽엽의 효능을 평가하고자 수행하였다.

죽엽은 甘淡寒하며, 心肺脾胃에 작용하고, 淸熱除煩, 生津利尿의 효능이 있어 熱病煩渴, 小兒驚癇, 咳逆吐衄, 面赤, 小便短赤, 口糜舌瘡 등의 증상을 치료한다³⁾.

근래까지 죽엽의 생리활성에 대한 연구로는 죽엽추출물 투여가 고콜레스테롤 투여에 따른 고지방식이 및 지질식이에 의한 혈청중 중성지질 감소 효과가 보고되었으며⁵⁾, 또한 이 등²⁾은 죽엽물추출물이 장기간의 알콜 투여로 증가된 흰쥐의 triglyceride를 유의하게 감소시킴을 보고하였다. 또한 죽엽의 세포보호효과로서, 권⁶⁾은 죽엽의 항산화 화합물인 methyl chlorogenic acid 유도체 (MCGA)-3가 bovine aortic endothelial cell에서 ROS로 생성되는 세포괴사에 대하여 heme oxygenase 1, ferritin 및 glutathione 등을 활성화시켜 세포보호효과를 나타냄을 보고하였으며, 김 등¹⁰⁾은 왕대잎 (Phyllostachys bambusoides) 물추출물이 흰쥐 肝均質液에 대하여 지질과산화물 형성을 저해함을 제시하고, *in vivo*로써 CCl₄로 유도된 간독성을 억제함을 보고하였다. 또한 이 등²⁾도 죽엽 물추출물이 장기간의 알콜 투여로 증가된 흰쥐의 간손상을 유의하게 억제함을 보고하였다. 한편 김 등⁷⁾은 죽엽 물추출물이 elevated plus-maze에서 항불안효과가 우수하였으며, 이러한 효능은 선택적으로 GABA 신경계에 적용함으로써 효능을 나타냄을 확인하였다. 도 등⁸⁾은 죽엽이 *Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*에 항균효과가 있음을 보고하였고, 송 등⁹⁾은 죽엽 물추출물이 Sarcoma-180을 처치한 생쥐의 생존율을 연장시키며, 암중/체중의 비율을 유의성 있게 감소시킴을 밝혀 죽엽의 항암활성을 제시하였다. 그러나 죽엽의 항염증효과에 관한 연구는 매우 제한적인 실정므로, 본 연구에서는 죽엽 열수추출물 (PFE)의 염증억제 기전 및 염증관련 cytokine의 발현에 대한 평가를 하였으며, *in vivo* 연구로 carrageenan으로 유도된 rat의 족부종에 대한 부종억제효과를 평가하였다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 L-arginine과 O₂로부터 nitric oxide synthase (NOS)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 신호전달자로서 중요한 역할을 한다. NOS는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)가 있으며, cNOS에는 신경세포의 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포의 endothelial constitute NOS (ecNOS)가 있다. cNOS는 일반적으로 생리적으로 작용하는데 반해, iNOS는 LPS, interferon- γ , IL-1, TNF- α 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성한다. 고농도의 NO 생성은 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있다¹⁶⁻²¹⁾.

본 연구에서는 PFE의 30, 100 그리고 300 μ g/ml의 농도는 LPS에 의해 증가된 NO의 생성량을 LPS 단독 처치군 대비 78.62, 74.64, 54.35(%)로 유의성 있게 감소시켰다. 또한 PFE 10-1000 μ g/ml 및 PFE (10-300 μ g/ml)+LPS의 처치에서 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다. 이러한 결과는 PFE가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 NO의 생성을 억제할 수 있음을 의미한다. PFE가 NO를 억제함을 확인하고, NO를 생성함에 핵심적인 역할을 하는 iNOS 단백질의 발현을 살펴보았다. iNOS는 LPS에 의해 발현이 현저히 증가되었고, PFE에 의해 LPS로 유도된 iNOS의 발현량이 뚜렷하게 감소되었다. 이러한 결과는 PFE가 NO를 억제함에 있어 iNOS단백질의 발현억제가 매개됨을 시사한다.

한편, COX-2는 유도형 효소로서 염증반응 및 발열 통증 등을 유발하는 prostaglandins을 생성하여 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. COX-1은 위장에서 위점막보호, 신장혈류량조절 등을 통하여 신체의 항상성유지에 중요한 역할을 한다²²⁾. Cyclooxygenase pathway를 통하여 이루어지는 PGE₂는 arachidonic acid로부터 PGG₂, PGH₂를 거쳐 생성되는 염증매개물질로서 염증반응과 종양의 발생에 관여한다¹¹⁾.

본 연구에서 PFE는 LPS에 의해 발현이 증가된 COX-2 단백질을 현저하게 감소시켰으며, PGE₂는 control에서 24.55 \pm 12.61 pg/ml을 나타내었고, LPS는 3188.66 \pm 237.74 pg/ml로 PGE₂를 유의성 있게 증가시켰으며, PFE는 100과 300 μ g/ml에서 PGE₂를 각각 2317.59 \pm 151.86, 1590.59 \pm 120.37 (pg/ml)로 유의

성 있게 감소시켜 COX-2의 억제와 동일한 결과를 나타내었다.

Cytokine은 면역세포에서 분비되어 면역체계를 조절하는 단백질로서, 활성화된 대식세포에서는 TNF, IL 등의 cytokine이 분비된다. TNF와 IL은 패혈성 쇼크의 중요한 매개체로서 염증반응의 핵심적 역할을 한다. TNF- α 는 pro-inflammatory cytokine으로서 blood monocytes, macrophages, mast cells, endothelial cells 등으로부터 분비된다. 근래에는 TNF- α 가 많은 자가면역질환에서 염증의 개시 및 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{23,24}).

본 연구에서 LPS는 control 대비 TNF- α 의 분비를 108.65 \pm 1.46배 유의성 있게 증가시켰으며, PFE는 100, 300 (μ g/ml)의 농도에서 TNF- α 의 생성량을 각각 85.84 \pm 4.10배, 77.72 \pm 2.55배로 유의적으로 감소시켰다. 또한 LPS는 control군 대비 IL-6의 생성을 102.83 \pm 4.90배로 유의성 있게 증가시켰으며, PFE는 100, 300 (μ g/ml)에서 각각 53.67 \pm 1.95, 33.16 \pm 0.36배로 LPS로 증가된 IL-6를 유의성 있게 감소시켰다.

iNOS와 COX-2의 발현에 관여하는 전사인자로는 NF- κ B, AP-1, C/EBP 등이 있고, 이중 핵심적 전사 조절인자로는 NF- κ B가 대표적인 전사조절인자로 알려져 있으며^{17,23,25,26}), LPS 등의 염증유발 자극에 의해 NF- κ B pathway가 활성화되어 iNOS나 TNF- α 등의 유전자 발현에 관련한다²³).

본 연구에서는 PFE의 염증매개물질억제 작용이 NF- κ B pathway와 관련됨을 평가하기 위하여 세포질에서 I- κ B α 의 발현과 인산화를 평가하고, 핵분획으로의 NF- κ B의 이동을 평가하였다. 세포질에서 p-I- κ B α 는 LPS처치에 의하여 뚜렷하게 증가하였으며, PFE 300 μ g/ml의 전 처치는 p-I- κ B α 가 현저하게 감소되었다. 또한 I- κ B α 는 LPS에 의하여 감소되었고, 이러한 감소는 PFE의 전 처치에 의하여 현저하게 증가되었다. 이러한 결과는 LPS에 의해 p-I- κ B α 가 증가한 만큼 I- κ B α 는 감소하고, PFE가 p-I- κ B α 를 억제하는 만큼 I- κ B α 가 증가함을 의미한다. 핵내에서는 PFE가 LPS에 의해 증가된 NF- κ B의 발현을 현저하게 감소시켰다.

이러한 연구결과는 PFE가 NF- κ B의 억제단백질중의 하나인 I- κ B α 의 인산화를 억제하고, 이로 말미암아 NF- κ B의 핵으로의 전위를 억제하며, 그러한

결과로 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, NO, PGE₂의 감소가 유도됨을 의미한다.

PFE가 *in vitro*에서 LPS에 의해 활성화된 NF- κ B pathway를 억제하여 염증매개물질을 억제함을 확인하고, *in vivo*로써 carrageenan으로 유도된 염증동물모델에서 PFE가 염증성 족부종을 억제할 수 있는지 평가하였다.

CA군의 족부종은 1-4 시간에 각각 149.61 \pm 18.22, 164.85 \pm 13.42, 174.25 \pm 9.02, 169.01 \pm 8.66 (%)로서 유의한 발 부종을 유발하였으며, PFE 0.3 g/kg를 투여한 군에서는 1-4 시간에 각각 133.31 \pm 6.00, 161.51 \pm 3.07, 169.68 \pm 4.79, 146.90 \pm 14.71 (%)을 나타내어 4 시간에 유의한 족부종의 억제를 나타내었으며, PFE 1.0 g/kg를 투여한 군에서는 각각 122.97 \pm 11.00, 150.11 \pm 9.79, 157.74 \pm 12.24, 140.59 \pm 2.65 (%)로 1, 4시간에 유의한 족부종의 억제를 나타내었다.

이상의 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 연구결과는 죽엽 열수추출물 (PFE)에는 항염증작용이 있음을 의미하며, 임상적으로 염증성 질환에 죽엽이 광범위하게 활용될 수 있는 것으로 사료된다.

V. 결론

죽엽 열수추출물(PFE)의 항염증효능을 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 NO의 생성량, iNOS, COX-2의 발현 및 TNF- α , IL-6, PGE₂, NF- κ B에 미치는 PFE의 영향 및 carrageenan으로 유도된 rat의 족부종에 미치는 PFE의 영향을 살펴본바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PFE는 LPS로 증가된 NO를 유의적으로 억제하였으며, iNOS의 발현 역시 억제하였다. 또한, PFE는 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 cells에서 분비되는 cytokine을 유의하게 억제하였다.
2. PFE는 LPS에 의해 발현이 증가된 COX-2 단백질의 발현을 감소시켰으며, PGE₂ 역시 PFE의 처치에 의하여 유의하게 감소하였다.
3. PFE는 LPS로 활성화된 p-I- κ B α 의 발현을 억제하고, 핵분획에서의 NF- κ B의 발현을 유의하게 억제하였다.
4. Carrageenan으로 유도된 rat의 족부종에 대하여

PFE (0.3g/kg)은 4시간에, PFE (1.0g/kg)은 1, 4 시간에 염증성 부종을 유의성 있게 억제하였다.

이러한 결과로 보아, 淸熱瀉火藥으로 사용되는 죽엽이 그람 음성균의 감염이나 NF- κ B가 활성화되어 나타나는 염증성 질환의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

* 이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No.2012R1A5A2A42671316)

References

1. Kim JH, Joo YS. A Literature Study on the Origin of Herba Lopharheri and Folium Phyllostachys. K.O.M.S. 1996;17(2):5-16.
2. Lee J, Seo B, Park J, Roh S. Effects of water extracts from Phyllostachys Folium on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. Kor. J. Herbology. 2011;26(3):31-6.
3. Professors of Herbology. Herbology. Seoul. Younglimsa. 1992:166.
4. Yoon KD, Kim Y, Huh H. The flavone glycosides of Sasa borealis. Kor. J. Pharmacogn. 2000;31(2):224-7.
5. Shin MK, Han SH, Kim KS, Kim YH, Jung WH, Yoon HS, Jung YH. Antihyperlipidemic Effects of Extract from Phyllostachys Folium in Cholesterol-Induced Hyperlipidemia Rats. The East Asian Society of Dietary Life 2000 Spring Conference. 2000:132.
6. Kwon MH. Effects of Antioxidant Phytochemicals on Stress Protein Expression in Cultured Animal Cell Line. Korea Research Foundation. 2004.
7. Kim SY, Ryu JH, Jang CG. Development of food and medicinal substances possessing tranquilizing effects from natural resources. Korea Science and Engineering Foundation. 2006.
8. Do J, Kim K, Jo J, Kim Y, Kim B, Kim H, Lim S, Lee S. Antimicrobial, Antihypertensive and Anticancer Activities of Medicinal Herbs. Korean J. Food Sci. Technol. 2005;37(2):206-13.
9. Song J, Park S, Choi J, Kim J. Effects of Phyllostachyos Folium (PF) on solid tumor in mice. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2009;22(2):39-49.
10. Kim N, Lee S, Kwon C, Hong N. Antilipoperoxidant Effects of Leaves of Phyllostachys bambusoides S. et Z. Kor. J. Pharmacogn. 1995;26(4):368-76.
11. Lee D, Park S, Hwangbo M, Jung T, Kim S, Jee S. Roots of Daucus carota sativa abrogates acute phase of Inflammation by the Inhibition of NO and Pro-Inflammatory Cytokine Production. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2013;26:45-57.
12. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 1990;144:1425-31.
13. Kook Y. Effect of Hwangryunhaedok-tang on Blood Pressure and Renal Functions in Spontaneously Hypertensive Rats. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2002;10(1):113-29.
14. Di Rosa M. Review: Biological properties of carrageenan. J Pharm Pharmacol. 1972;24:89-102.
15. Nicklin S, Miller K. Effect of orally administered foodgrade carrageenans on antibody-mediated and cellmediated immunity in the inbred rat. Food Chem Toxicol. 1984;22:615-21.
16. Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. Free Radic Biol Med. 2013;65:1174-94.
17. Bove PF, van der Vliet A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial sig-



- naling and inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(4):515-27.
18. Feng C, Chen L, Li W, Elmore BO, Fan W, Sun X. Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem.* 2014;130:130-40.
 19. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001;69:625-35.
 20. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 2000;28:217-26.
 21. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:301-9.
 22. Yang C. Gastrointestinal disorders associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Dongkook Medicine.* 2003;10(2):190-9.
 23. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology.* 2003;139:11-20.
 24. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 2003;37(6):355-61.
 25. Park HJ, Yoon SW, Yoon JW, Yoon HJ, Ko WS. Inhibitory Effect of Omisodok-eum on the Secretion of NO in LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology.* 2002;16(5):921-7.
 26. Chen F, Castranova V, Shi X. New insight into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 2001;159(2):387-97.