



## 섬기린초 물 추출물의 마우스 대식세포에서 항염증 효능

장지훈 · 정호경 · 고재형 · 심미옥 · 우경완 · 김태욱 · 이기호 · 안병관 · 조현우 · 조정희 · 정원석<sup>†</sup>  
한약진흥재단

### Anti-Inflammatory Effect of *Sedum takesimense* Nakai Water Extract in RAW 264.7 Cells

Ji Hun Jang, Ho Kyung Jung, Jae Hyung Ko, Mi Ok Sim, Kyeong Wan Woo, Tae Muk Kim, Ki Ho Lee, Byeong Kwan Ahn, Hyun Woo Cho, Jung Hee Cho and Won Seok Jung<sup>†</sup>  
National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** *Sedum takesimense* Nakai has been used as folk medicine in Korea. The present study aimed to determine the biological activity of *S. takesimense* by investigating the anti-inflammatory effects of *S. takesimense* water extract (SKLC) on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells.

**Methods and Results:** Cytotoxicity of SKLC on RAW 264.7 cells was determined by performing MTS assay was found to have no cytotoxic effect on RAW 264.7 cells at a concentration range of 62 - 500  $\mu\text{g/ml}$ . Further, pretreatment of SKLC inhibited lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) production in a dose-dependent manner. To determine the inhibitory mechanisms of SKLC on inflammatory mediators, we assessed the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) pathways. The activities of these pathways were decreased in a dose-dependent manner by SKLC. The production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6 were also reduced.

**Conclusions:** These results suggest that the down regulation of iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 expression by SKLC are mediated by the down regulation of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) activity, a transcription factor necessary for pro-inflammatory mediators. This might be the mechanism underlying the anti-inflammatory effects of SKLC.

**Key Words:** *Sedum takesimense* Nakai, Anti-Inflammatory Effect, RAW 264.7

#### 서 언

섬기린초 (*Sedum takesimense* Nakai)는 돌나물과 (Crassulaceae) 돌나물속 (*Sedum* L.)에 속하는 다년생 초본으로서 우리나라 울릉도와 독도에 분포하는 특산식물종이다 (Chung and Kim, 1989; Nakai, 1919). 돌나물속은 북반구 전역에 분포하고 내건성 및 내한성이 강하며 왕성한 번식력으로 군집을 이루어 자라는 특징을 보인다 (Ohba, 1978). 섬기린초는 주로 울릉도 전 지역에 해안가를 따라 고르게 분포하고 있으며 높이가 50 cm 에 달하고 기부 30 cm 정도가 겨울 동안에 살아남아 있다가 다음해 봄에 다시 싹이 나와서 자라

며 줄기가 옆으로 비스듬히 번으면서 자란다 (Lee, 2003; Lee and Park, 2010). 국산 돌나물속의 일부 종은 항염증에 대한 민간요법으로 사용되어왔으며, 또한 혈액순환을 개선할 수 있다는 보고가 있으나 (Bae, 2000; Kim *et al.*, 2004), 실제 섬기린초에 대한 생리활성 연구는 많이 이루어지지 않은 상태이다. 따라서, 본 연구는 국산토종 특산식물인 섬기린초의 자원산업화를 위하여 항염증 조사를 수행하였다.

염증은 다양한 염증 매개 인자들이 대식세포에 인식되는 것으로부터 시작되며, 염증반응은 병원체의 감염, 화학적 또는 물리적 조직 손상 등으로부터 생체조직의 방어반응의 하나이다 (Lee and Cho, 2015; Namkoong *et al.*, 2015). 하지만

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-61-860-2812 (E-mail) i0823@nate.com

Received 2016 April 21 / 1st Revised 2016 May 16 / 2nd Revised 2016 May 31 / 3rd Revised 2016 June 8 / Accepted 2016 June 10

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

과도한 염증 반응은 조직손상을 촉진시키게 되어 각종 염증관련 질환을 유도한다 (Cho *et al.*, 2009; Willoughby *et al.*, 1975). 대식세포는 단핵세포의 형태로 염증 반응에 관여하는 주요세포로 알려져 있으며, LPS는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 염증매개성 사이토카인들의 분비를 촉진한다 (Kang *et al.*, 2015). 이러한 염증매개성 사이토카인들은 extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinases (p38) 세포신호전달 단백질과 핵내로 이동하여 염증관련 유전자의 발현을 촉진하는 전사조절인자인 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)에 의해 조절 된다 (Feng *et al.*, 1999). NF- $\kappa$ B는 자극을 받지 않는 상태에서는 inhibitory kappa B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ )와 결합하여 세포원형질에 있다가 자극을 받으면 inhibitory kappa B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ )가 proteasome에 의해 분해가 되면서 핵안으로 들어가게 되어 이후 염증과 관련한 사이토카인 발현을 조절하게 된다.

이에 본 연구는 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 염증반응을 관찰하여, 우리나라 자생식물인 섬기린초 추출물이 염증성 질환의 예방과 치료의 응용 가능성을 시사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

섬기린초 (*Sedum takesimense* Nakai)는 충북 충주시에서 직접 채취하여 진초를 잘라 수세 후 50 $^{\circ}$ C로 열풍건조기를 이용하여 일주일간 건조하였다. 그 후 건조된 섬기린초 시료를 분쇄기를 이용하여 균일하게 분쇄한 후 3차 증류수를 칭량한 시료무게의 10배를 넣고 60 $^{\circ}$ C 환류냉각으로 3시간, 3회 반복하여 추출물을 제조하였다. 이 추출물을 Whatman 여과지로 여과하고, 여과액을 동결건조하여 완전히 건조된 시료를 실험 목적에 맞춰서 phosphate-buffered saline (PBS)용매에 녹여 실험에 사용하였다.

### 2. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin는 Gibco/BRL (Eggenstein- Leopoldshafen, Germany)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), inner salt; phenazine ethosulfate (PES)가 포함된 CellTiter 96 $^{\circ}$  AQ<sub>ucous</sub> one solution cell proliferation assay와 Griess reagent system은 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. TriPure isolation reagent는 Roche (Basel, Switzerland)에서 구입하였다.

Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, PEG<sub>2</sub> ELISA kit와 RIPA cell lysis buffer 3은 Enzo Life Sciences Co. (Farmingdale, NY, USA)에서 구입하였고, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit는 R&D systems (DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development Systems, Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. iNOS, COX-2, I $\kappa$ B- $\alpha$  GAPDH antibodies는 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Taqman Universal Master Mix II, Mouse, FITC conjugate와 Rabbit, Alexa Fluor 514 antibodies는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

### 3. 세포주 및 세포배양

RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여, CO<sub>2</sub>배양기 (MCO-17A1, Sanyo, Osaka, Japan)에서 온도 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 배양하였다.

### 4. 세포 독성 평가 (MTS 분석)

섬기린초 물추출물 시료의 RAW 264.7 cell에 대한 세포 독성 효과를 측정하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 96 well plate에 3  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하여 24시간 배양하였고 10% FBS DMEM 조건에서 시료를 농도별로 전처리하고 여기에 LPS (500 ng/ml)를 각각 처리한 다음 RAW 264.7 cell을 24시간 배양하였다. 그 후의 각각 10  $\mu$ l의 MTS 용해액을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양한 후 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Mnendorf, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Nitric oxide (NO) 농도 측정

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서 섬기린초 물추출물 시료의 NO 생성 억제를 측정하기 위해 시료를 여러 농도로 처리한 실험군과 대조군을 LPS (500 ng/ml)와 함께 24시간 세포 배양 후 griess reagent system를 이용하여 NO를 측정하였다. 96 well plate에 세포 배양 상등액과 griess reagent를 1:1로 혼합하여 넣고 10분 동안 반응 시킨 후 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Mnendorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 분석

섬기린초 물추출물 시료의 RAW 264.7 cell에서 PGE<sub>2</sub> 분비 억제능을 측정하기 위해 PEG<sub>2</sub> ELISA kit를 이용하여 분

**Table 1.** TaqMan gene information for real-time PCR.

Gene symbol	Gene description	TaqMan gene expression assay number	Reference sequence
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1	NM_013693.3
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta	Mm01336189_m1	NM_008361.3
IL-6	interleukin 6	Mm00446190_m1	NM_031168.1
Ptgs2 (COX-2)	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Mm00478374_m1	NM_011198.3
NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible	Mm00440502_m1	NM_010927.3
Hprt1	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (reference gene)	Mm01545399_m1	NM_013556.2

석하였다. RAW 264.7 cell을 96 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/ml로 분주하여 배양하였고, 10% FBS DMEM 조건에서 시료를 농도별로 전처리하고 2시간 후에 LPS (500 ng/ml)를 각각 처리한 다음 RAW 264.7 cell을 24시간 배양하였다. 그 후 세포 배양 상층액을 취하여 ELISA kit 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량하여 분석하였다.

### 7. Real-time PCR (mRNA 발현분석)

RAW 264.7 세포를 6 cm dish에  $1 \times 10^5$  cells/dish 씩 분주한 후 24시간 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 섬기린초 물추출물을 농도별로 처리하고 30분 후에 LPS (500 ng/ml)를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 헹구낸 뒤 TriPure Isolation Reagent를 이용하여 RNA를 분리하였다. 5 g의 mRNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit를 이용하여 cDNA로 합성을 하였다. 합성된 cDNA 1  $\mu$ l, Taqman primer 1  $\mu$ l, Taqman Universal Master Mix II 10  $\mu$ l, 3차 증류수 8  $\mu$ l를 넣고 real-time PCR을 수행하였다. 정량 증합 효소 반응에 쓰인 TaqMan gene은 <http://www.lifetechnologies.com>에서 검색하여 주문 후 사용하였고 분석하고자 하는 유전자 특이적 정보는 Table 1에 나타내었다. 또한 real-time PCR 반응 조건은 50°C에서 2분 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 15초, 어닐링 온도 60°C에서 15초인 사이클을 40회 반복 수행하였다.

### 8. Immunoblot 분석

섬기린초 물추출물 시료의 항염증 효과를 확인하기 위해 Western blot을 이용하여 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 섬기린초 물추출물 시료를 농도별로 처리한 실험군과 대조군을 24시간 배양 후 단백질을 용해시키는 완충제인 RIPA cell lysis buffer을 사용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000  $\times$  g로 4°C에서 30분간 원심 분리하여 단백질만 포함하고 있는 상층액을 얻었다. 정량한 단백질 20  $\mu$ g을 10% SDS-PAGE에 전기 영동시킨 후 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)으로

옮겼다. 그리고 membrane의 blocking은 5% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액을 상온에서 2시간 동안 실시한 다음 iNOS, COX-2, GAPDH에 대한 1차 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG를 반응시키고 ECL detection reagents (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 단백질의 발현정도를 확인하였다.

### 9. 면역형광염색 (immunofluorescence) 분석

RAW 264.7 세포를 cover slip이 깔린 24 wells cell culture plate에 분주하고 24시간이 지난 후 2시간 전에 LPS (500 ng/ml)를 각각 처리한 다음 섬기린초 물추출물을 500  $\mu$ g/ml 농도로 처리하였다. 그런 후 각 시간에 따라 6시간이 지난 후 그룹 별로 cover slip 위의 세포를 1  $\times$  PBS로 3번 세척해 주고, 3.7% formaldehyde로 실온에서 20분 동안 고정 시켜 주었다. 다시 1  $\times$  PBS로 3번 세척 후 0.5% Triton X-100을 15분 간 처리한 후, 3% BSA로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 그런 후 1차 항체로 각각 I $\kappa$ B- $\alpha$  (1:100)를 1% BSA/PBS에 희석하여 처리하여 4°C에서 밤새 반응하였다. 1  $\times$  PBS로 5분간 세척 한 후 2차 항체 (1:200)를 1% BSA/PBS에 희석하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그런 후 마지막으로 1  $\times$  PBS로 5분씩 3번 세척 후 cover slip을 fluorescence solution (DAKO cytometry, Carpinteria, CA)으로 고정 시킨 후 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 관찰하였다. 형광량 측정은 이미지 계량 소프트웨어 (Image J)를 이용하였다.

### 10. Cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 cell을 자극하기 전 섬기린초 물추출물 시료를 30분 동안 전처리를 하였다. 전염증성 사이토카인의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS로 자극한 후 24시간 뒤 이들 염증매개와 관련된 사이토카인을 세포 상층액에서 명시된 ELISA kit의 매뉴얼대로 ELISA법으로 정량하였다.

11. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 ± 표준편차 (mean ± S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 Student's *t*-test로 분석하여 *p*-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 섬기린초 물추출물 (SKLC)의 RAW 264.7 세포주에서 세포생존률에 미치는 영향

섬기린초 (*Sedum takesimensense* Nakai) 물추출물 (SKLC)의 RAW 264.7 세포주에서 세포생존률에 미치는 농도를 조사하여 이후 항염증효과 실험농도를 결정하기 위해 MTS assay를 수행하였다. 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 분주하고 24 시간 안정화 후에 농도별로 (62, 125, 250, 500, 1000 µg/ml)로 SKLC를 처리하고 24시간 후에 MTS를 측정하였다. 그 결과 1,000 µg/ml 농도에서 생존률이 85%로 유의적으로 세포독성이 있었고, 항염증 효과 실험은 독성이 없는 농도에서 실험을 진행하였다 (Fig. 1).

2. 섬기린초 물추출물 (SKLC)의 nitric oxide 생성 억제 효과  
섬기린초 물추출물 (SKLC)가 RAW 264.7 세포주에서

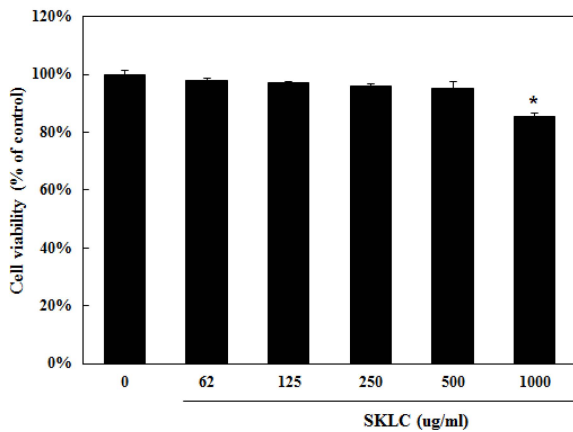


Fig. 1. Effect of SKLC on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated for 24 hours in the presence or absence of SKLC at indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. Means values ± SD form triplicate separated experiments are shown. \*Significant differences between SKLC treated groups were determined compared to the normal group (absence of SKLC) using the Student's *t*-test (*p* < 0.05).

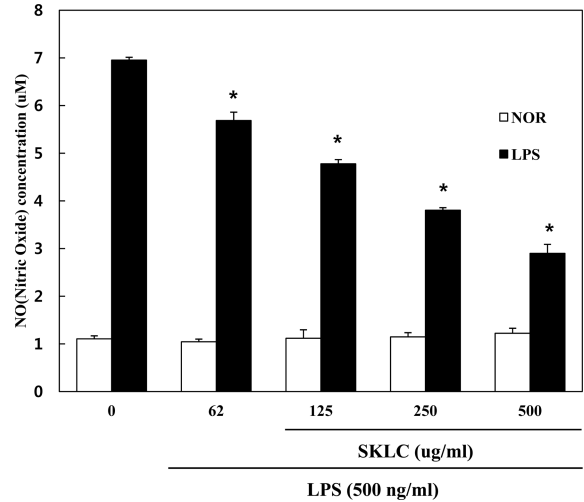


Fig. 2. Effect of SKLC on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of SKLC for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Means values ± SD form triplicate separated experiments are shown. Significant differences between SKLC treated groups were determined compared to the LPS alone treated group using the Student's *t*-test (*p* < 0.05). NOR; normal, LPS; LPS treated.

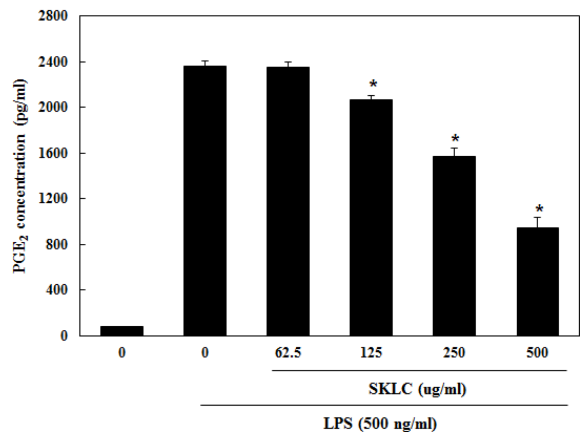
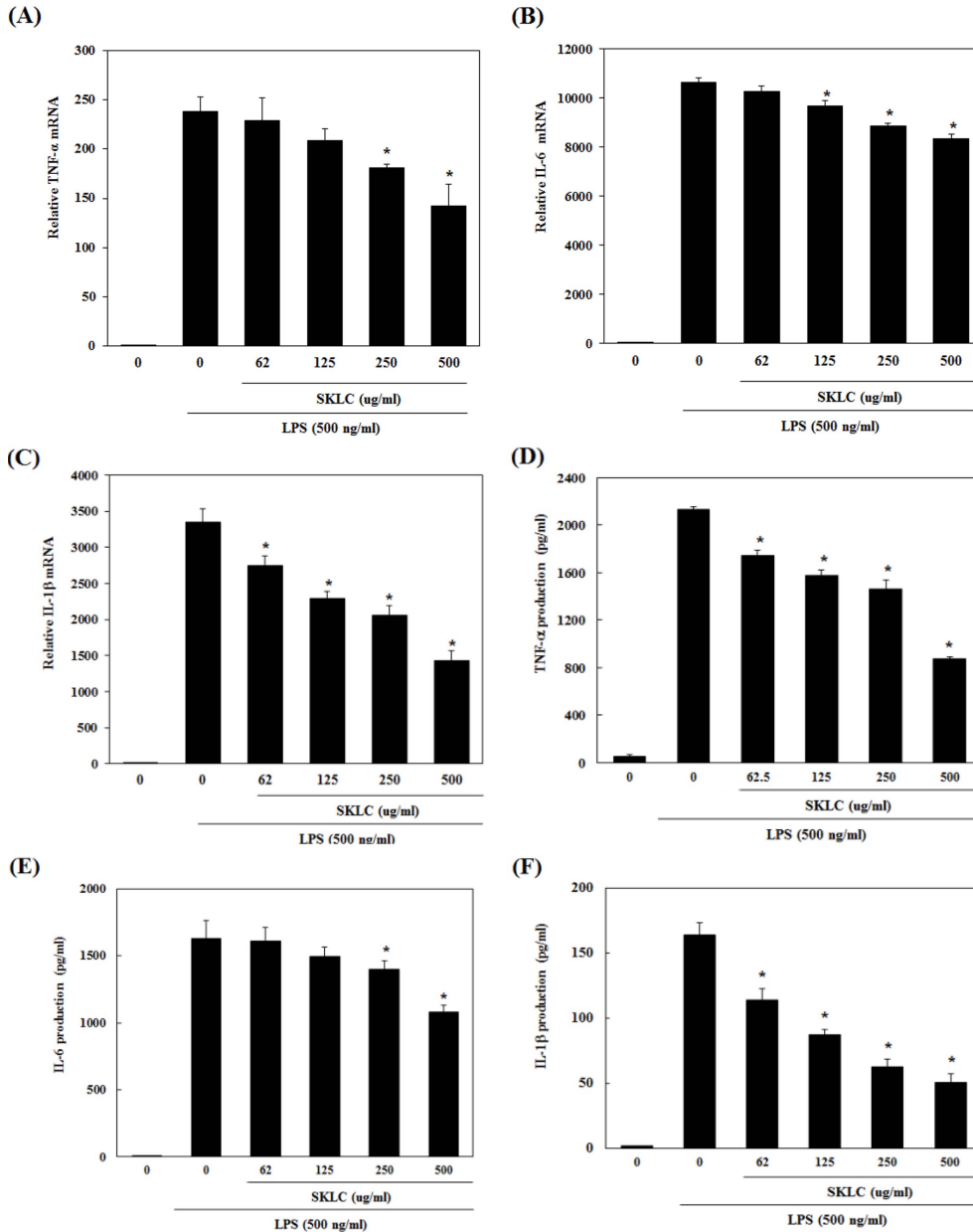


Fig. 3. Effect of SKLC on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of SKLC for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Means values ± SD form triplicate separated experiments are shown. Significant differences between SKLC treated groups were determined compared to the LPS alone treated group using the Student's *t*-test (*p* < 0.05).

nitric oxide (NO)생성을 저해하는지 확인하기 위해 SKLC를 62, 125, 250, 500 µg/ml 농도로 처리하고 30분후에 LPS (500 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양후 세포 배양액의 NO생성



**Fig. 4. Effect of SKLC on LPS-induced TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , gene expression (A, B, C) and production (D, E, F) in RAW 264.7 cells.** Cells were pretreated with the indicated concentrations of SKLC for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. Means values  $\pm$  SD form triplicate separated experiments are shown. Significant differences between SKLC treated groups were determined compared to the LPS alone treated group using the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).

저해효과를 griess reagent 법을 통해 확인하였다. 그 결과, LPS를 단독으로 처리한 세포군에 비해 SKLC를 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

또한 LPS를 처리하지 않고 SKLC만 처리한 군에서는 NO 생성의 변화가 없는 것을 관찰할 수 있었고, SKLC가 RAW

264.7세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

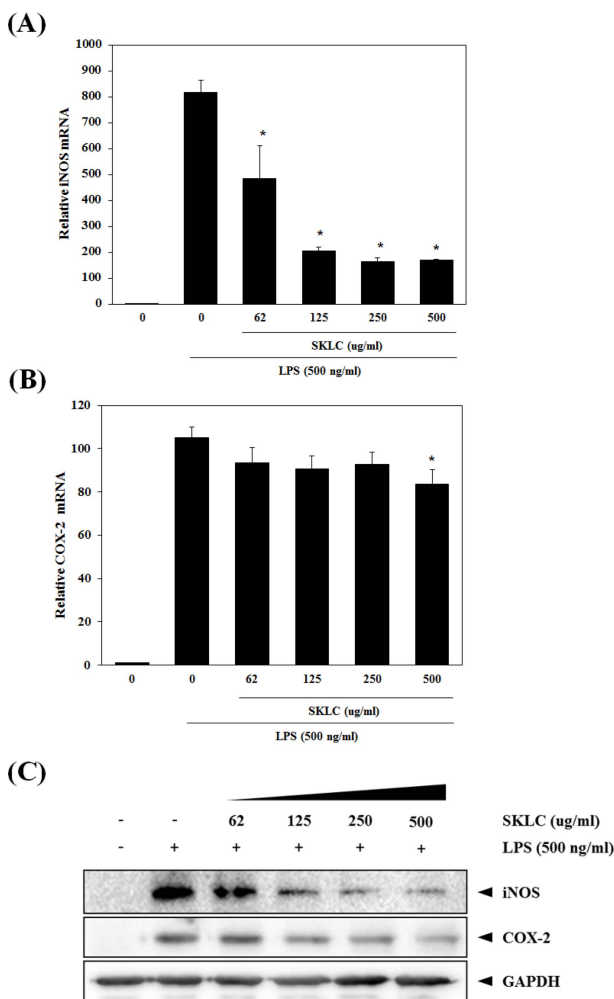
### 3. 섬기린초 물추출물 (SKLC)의 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 효과

섬기린초 물추출물 (SKLC)가 RAW 264.7 세포주에서

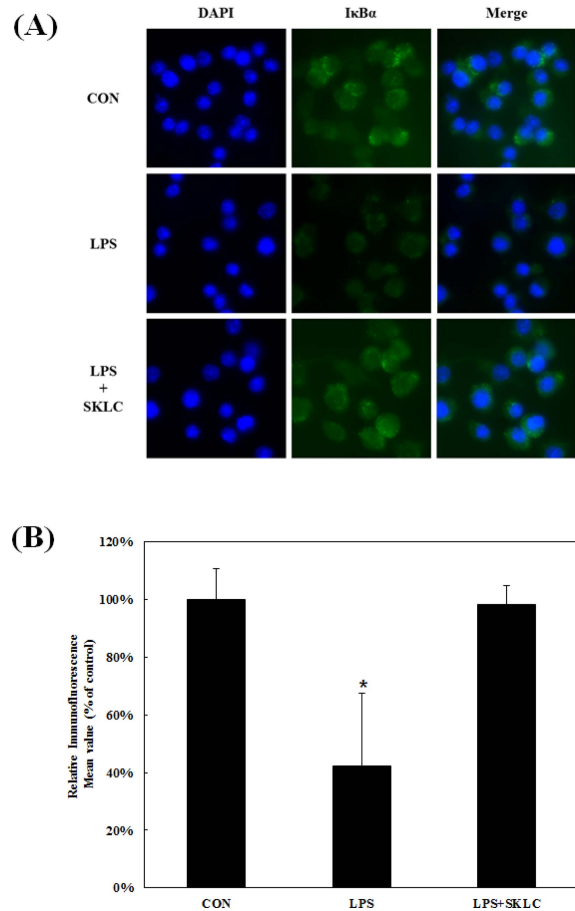
PGE<sub>2</sub>생성을 저해하는지 확인하기 위해 SKLC를 62, 125, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하고 30분후에 LPS (500  $\text{ng/ml}$ )를 처리하여 24시간 배양 후 세포 배양액의 PGE<sub>2</sub>생성 저해효과를 ELISA kit를 이용하여 분석하였다. 그 결과 LPS에 의해 Raw 264.7 세포에서 PGE<sub>2</sub>생성이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, SKLC를 처리하였을 때 농도별로 유의성있게 PGE<sub>2</sub>생성이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 이는 섬기린초 물추출물 (SKLC)가 PGE<sub>2</sub>생성 활성을 낮춤으로써 항염증 효과가 있음을 시사하였다.

#### 4. 섬기린초 물추출물 (SKLC)의 염증관련 사이토카인의 생성 억제 효과

섬기린초 물추출물이 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도 되는 각종 전염증성 및 염증성 사이토카인들의 발현을 조사하였다. 섬기린초 물추출물을 전처리한 후 LPS로 자극하여 24시간 후에 세포와 세포배양액을 수집하였다. Real-time PCR 측정된 결과 섬기린초 물추출물의 62 - 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 IL-1 $\beta$  발현을 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였고, TNF- $\alpha$  발현을 250 - 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-6 발현을 125 - 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농



**Fig. 5. Effect of SKLC on LPS-induced iNOS and COX-2 gene (A, B) and protein expression (C) in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of SKLC for 30 minutes before being incubated with LPS (500  $\text{ng/ml}$ ) for 24 hours. Means values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. Significant differences between SKLC treated groups were determined compared to the LPS alone treated group using the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 6. Effect of SKLC on I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation in LPS-induced RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with SKLC (500  $\text{g/ml}$ ) for 30 minutes before being incubated with LPS (500  $\text{ng/ml}$ ) for 24 hours. (A); Degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  was visualized with fluorescence microscope after immunofluorescence staining with anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  antibody (green). Cells were stained with DAPI for visualization of nuclei (blue). (B); Relative I $\kappa$ B- $\alpha$  immunofluorescence mean value were presented. Means values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. Significant differences between SKLC treated groups were determined compared to control (CON, absence of SKLC and LPS) group using the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).



도에서 각각 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 4A, B, C). ELISA 방법으로 측정된 결과 섬기린초 물추출물의 62 - 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 IL-1 $\beta$  생성을 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였고, TNF- $\alpha$  생성을 125 - 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-6 생성을 250 - 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 4D, E, F).

#### 5. RAW 264.7 세포주에서 염증관련 단백질의 발현 감소효과

섬기린초 물추출물 (SKLC)가 iNOS, COX-2 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해 RAW 264.7 세포주에서 62, 125, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리를 한 후 24시간 배양을 하고 mRNA 및 단백질을 분석하였다. 그 결과 iNOS, COX-2의 mRNA 및 단백질의 양이 농도별로 감소하였고, 특히 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 많은 감소를 한 것을 확인할 수 있었다. 또한 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질은 LPS를 단독으로 처리한 군에서 감소되는 것을 확인하였고 SKLC를 농도별로 처리한 군에서 LPS 단독처리군보다 증가하는 것을 확인하였다. 이는 SKLC가 LPS에 의해 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질을 degradation하는 것을 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

#### 6. 섬기린초 물추출물 (SKLC)의 면역형광염색을 통한 I $\kappa$ B- $\alpha$ degradation의 완화효과

대식세포주 내에서의 세포기질 (cytosol)에 있는 I $\kappa$ B의 분해 정도를 알아보기 위하여 I $\kappa$ B- $\alpha$  항체를 이용하여 면역형광 염색을 실시하였다. 그 결과 LPS 단독으로 처리한 군에서는 I $\kappa$ B의 분해가 많이 나타났지만, SKLC를 처리한 군에서는 I $\kappa$ B가 분해가 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과는 SKLC가 I $\kappa$ B의 분해를 억제하여 전염증성 사이토카인이나 NO와 같은 염증매개물질의 발현을 조절하는 NF- $\kappa$ B의 핵내이동 (nuclear translocation)을 저해한다는 것을 시사한다 (Fig. 6).

## 고 찰

염증반응은 면역적인 반응으로 일련의 과정들이 체내에 존재하지 않는 모든 외부 인자 감염에 대항하는 방어작용이다 (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007). 이러한 염증반응에 대식세포가 매우 중요한 역할을 하며, NO, PGE<sub>2</sub>, 그리고 전염증성 사이토카인들을 포함한 다양한 염증 매개물질을 조절한다 (Sarkar *et al.*, 2008; Southan and Szabo, 1996). NO의 생성은 아미노산의 한 종류인 아르기닌의 deamination 반응에 의해 생성되며 (Labet *et al.*, 2009), 신경이나 근육세포에서 지속적으로 발현하는 효소인 eNOS와 대식세포와 같이 감염에 대한 반응으로 발현하게 하는 iNOS가 있다 (Knowles and Moncada, 1994). LPS는 그람음성균을 구성하는 한 물질로써 대식세포의 표면에 있는 TLR4 수용체와 결합하여 일련의 염증반응을 일

으리게 된다 (Lu *et al.*, 2008). 하지만 비정상적인 염증반응은 대장염, 관절염, 위염 등 모든 염증관련 질병과 자가면역질환을 일으키게 된다 (Lechner *et al.*, 2005). 최근에는 현재 시판되고 있는 다수의 항염증 치료제의 활성이 낮거나 소화장애, 과민반응들의 부작용이 발견되어 천연물을 가지고 항염증 활성을 갖는 연구들이 많이 활성화 되어 있다 (Lee *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2014).

이러한 사실에 기초하여 SKLC가 마우스 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 감소하는지 확인한 결과, 농도별로 감소되는 것을 확인하였고, 또한 PCR과 western blot을 통해 SKLC가 iNOS의 발현을 억제하여 NO 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

기존의 비스테로이드성 소염진통제 (NSAIDs)들은 프로스타글란딘 (prostaglandin) 합성을 억제하며 이는 COX-2의 생성 및 효소 활성저해에 의한 것이다 (Nakatsugi *et al.*, 1996). COX는 COX-1과 COX-2로 구분되는데, 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 프로스타글란딘을 합성한다 (Chun *et al.*, 2004; Seibert *et al.*, 1994). 상대적으로 COX-2는 염증반응 부위에서 발현되는 것으로 아라키돈산 (arachidonic acid)을 염증 매개 물질인 프로스타글란딘으로 합성한다 (Seibert *et al.*, 1994). PCR과 Western blot을 이용하여 COX-2의 발현을 확인한 결과 SKLC가 LPS에 의해 형성되는 COX-2를 유의성 있게 감소시켰다. 또한 COX-2에 의한 산물인 prostaglandin E<sub>2</sub>도 SKLC에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

추가적으로 SKLC는 LPS에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 와 IL-6, IL-1 $\beta$ 의 생성을 유의성 있게 저해하였다. 대식세포에서 염증반응을 유도하는 물질로 잘 알려진 이러한 전염증성 사이토카인은 LPS등의 염증 자극 물질에 의해 생성이 유도된다 (Gabay, 2006). 이러한 염증반응의 대식세포내 신호전달은 LPS에 의해 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화, 분해가 되어 같이 붙어 있던 NF- $\kappa$ B를 활성화되어 핵내로 이동하게 된다. 핵내로 이동한 NF- $\kappa$ B가 COX-2, iNOS 인코딩하고 있는 프로모터에 전사인자로 작용하여 염증성 사이토카인의 분비, COX-2, iNOS의 활성화를 유도한다고 알려져 있다 (Karin and Ben-Neriah, 2000; Nahar *et al.*, 2014). 본 연구에서 SKLC에 의한 전염증성 사이토카인 분비억제, COX-2, iNOS의 활성 억제에 대한 기전으로 NF- $\kappa$ B가 핵안으로 전좌 (translocation)가 되는지를 간접적으로 확인하기 위하여 세포질에 있는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 를 형광염색하여 확인하였다. SKLC를 처리하였을 때 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해 반응이 억제됨을 형광량을 통해 알 수 있었고, 이는 NF- $\kappa$ B의 전좌 (translocation)가 억제됨을 간접적으로 확인할 수 있었다. 이 결과는 COX-2의 발현억제, NO와 전염증성 사이토카인의 분비억제, NF- $\kappa$ B의 전좌 (translocation)억제 기작에 SKLC가

관여한다는 것을 간접적으로 시사한다.

본 실험 결과를 요약하면, SKLC가 RAW 264.7 세포에서 NF-κB 전사 활성을 억제함으로써 LPS에 의해 유도되는 iNOS 그리고 COX-2와 전염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6, IL-1β의 발현을 유전자 및 단백질 단계에서 효과적으로 저해한다. 하지만 SKLC가 최근에 나오고 있는 항염증 치료제 처럼 Cox-1를 저해하지 않고 specific하게 Cox-2를 저해하는지와 다른 특정 염증성 질병을 저해할 수 있는지 *in vivo*에서 추가적인 실험을 수행하여야 한다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한국 토종자원의 한약재 기반구축사업의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Bae KH.** (2000). The medicinal plants of Korea. Kyohak Publishing Co. Seoul, Korea. p.202.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M and Chan FKM.** (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 137:1112-1123.
- Chun KS, Cha HH, Shin JW, Na HK, Park KK, Chung WY and Surh YJ.** (2004). Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF-κB. *Carcinogenesis*. 25:445-454.
- Chung YH and Kim JH.** (1989). A taxonomic study of *Sedum* section *Aizoon* in Korea. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 19:189-227.
- Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP and Liew FY.** (1999). Extracellular signal-related kinase(ERK) and p38 mitogen-activated protein(MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *The Journal of Immunology*. 163:6403-6412.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS and Girardin SE.** (2007). Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation. *Clinical and Experimental Immunology*. 147:227-235.
- Gabay C.** (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research and Therapy*. 8(Supplement 2):S3.
- Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, Cho JH, Kuk YI, Hyun KH and Cho HW.** (2014). Inhibitory effect of *Alopecurus aequalis* Sobol ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:98-104.
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Park SW, Park WM, Ahn NK, Choi YU, Bae NY, Park JH and Ahn DH.** (2015). Anti-inflammatory effect of *Sargassum coreanum* ethanolic extract through suppression of NF-κB pathway in LPS induced RAW264.7 cells in mice. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 43:112-119.
- Karin M and Ben-Neriah Y.** (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-κB activity. *Annual Review of Immunology*. 18:621-663.
- Kim DW, Son KH, Chang HW, Bae KH, Kang SS and Kim HP.** (2004). Anti-inflammatory activity of *Sedum kamtshaticum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 90:409-414.
- Knowles RG and Moncada S.** (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*. 298:249-258.
- Labet V, Grand A, Morell C, Cadet J and Eriksson LA.** (2009). Mechanism of nitric oxide induced deamination of cytosine. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 11:2379-2386.
- Lechner M, Lirk P and Rieder J.** (2005). Inducible nitric oxide synthase(iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology*. 15:277-289.
- Lee KS, Kim GH, Seong BJ, Kim SI, Han SH, Lee SS, Yang H and Yoo YC.** (2014). Anti-inflammatory activity of solvent fractions from ginseng berry extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:449-456.
- Lee SE and Cho SI.** (2015). Anti-inflammatory effects of *Salviae Miltiorrhizae* Radix extract on RAW264.7 cell via anti-oxidative activities. *Korea Journal of Herbology*. 30:89-94.
- Lee TB.** (2003). Coloured flora of Korea. Hyangmoonsa. Seoul, Korea. p.459.
- Lee W and Park JH.** (2010). Intraspecific sequence variation of *trnL/F* intergenic region(cpDNA) in *Sedum takesimensense* Nakai (Crassulaceae) and aspects of geographic distribution. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 40:157-162.
- Lu YC, Yeh WC and Ohashi PS.** (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42:145-151.
- Nahar PP, Driscoll MV, Li L, Slitt AL and Seeram NP.** (2014). Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. *Journal of Functional Foods*. 6:126-136.
- Nakai T.** (1919). The vegetation of Dagelet island: Its formation and floral relationship with Korea and Japan. *Proceeding of the Third Pan-Pacific Science Congress*. 1:911-914.
- Nakatsugi S, Sugimoto N and Furukawa M.** (1996). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandin E2 production by cyclooxygenase-2 from endogenous and exogenous arachidonic acid in rat peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 55:451-457.
- Namkoong KS, Jang SA, Sohn EH, Park JP, Sohn ES, Koo HJ, Yoon WJ, Kwon JE, Jeong YJ, Meng X, Han HS and Kang SC.** (2015). Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. *Korean Journal of Plant Research*. 28:145-152.
- Ohba H.** (1978). Generic and infrageneric classification of the old world sedoideae(Crassulaceae). *Journal of the Faculty of Science, the University of Tokyo*. 12:139-198.
- Sarkar D, Saha P, Gamre S, Bhattacharjee S, Hariharan C, Ganguly S, Sen R, Mandal G, Chattopadhyay S, Majumdar S and Chatterjee M.** (2008). Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF-κB pathway.



International Immunopharmacology. 8:1264-1271.  
**Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L and Isakson P.** (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91:12013-12017.  
**Southan GJ and Szabo C.** (1996). Selective pharmacological

inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. Biochemical Pharmacology. 51:383-394.  
**Willoughby DA, Dunn CJ, Yamamoto S, Capasso F, Deporter DA and Giroud JP.** (1975). Calcium pyrophosphate-induced pleurisy in rats: A new model of acute inflammation. Agent and Actions. 5:35-38.