

## 홍의 추출물의 항염작용 및 그 기전 연구

김종민<sup>1</sup> · 김승형<sup>2</sup> · 양원경<sup>2</sup> · 정택근<sup>3</sup> · 김세란<sup>3</sup> · 황성준<sup>3</sup> · 유화승<sup>1</sup> \*

### The anti-inflammatory effect and the mechanism of *Formica yessensis* extraction

Kim Jong-Min<sup>1</sup> · Kim Seung-Hyung<sup>2</sup> · Yang Won-Kyung<sup>2</sup> · Jung Taek-Geun<sup>3</sup>  
Kim Se-Ran<sup>3</sup> · Hwang Sung-Joon<sup>3</sup> · Yoo Hwa-Seung<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>East-West Cancer Center, Dunsan Korean Medical Hospital of Daejeon University

<sup>2</sup>Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

<sup>3</sup>Korean Society of East-West Comparative Medicine

**Objective** : Hongyi (*Formica yessensis*) is the dried insect of fomicidae. In previous studies, it appeared possibilities on anti-thrombosis, preventing atherosclerosis, treating rheumatoid disease, and inhibiting hela cell. In this study, we investigated anti-inflammatory effects and mechanism of Hongyi.

**Methods** : Hongyi A was extracted by water and made dried powder. Hongyi B was extracted by ethanol and made dried powder. We measured Nitric Oxide (NO) production on the mouse macrophages (RAW 264.7), mouse vascular endothelial cell (MOVAS) and human vascular endothelial cell (HUVEC) for anti-inflammatory effect. In addition, we conducted reverse transcription reaction (RT-PCR) for investigating the mechanism.

**Results** : In RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS, Hongyi A (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) decreased NO production compared with LPS 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  control group with statistical significance ( $p < 0.05$ ). Hongyi A (50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) also decreased NO production compared with LPS 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  control group with statistical significance ( $p < 0.01$ ). Hongyi B (50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) decreased NO production compared with LPS 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  control group with statistical significance ( $p < 0.01$ ). Hongyi B (10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) also decreased NO production compared with LPS 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  control group with statistical significance ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). In the MOVAS, Hongyi A and B increased NO production compared with control group. In the HUVEC, Hongyi B increased NO production compared with control group. The expression of NF- $\kappa$ B in 12-hours MOVAS culture was decreased by Hongyi A and B (10, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) compared with control group, but expression of I $\kappa$ B was increased. In the 24-hours MOVAS culture, expression of I $\kappa$ B was significantly increased. The expression of NF- $\kappa$ B in 12-hours HUVEC culture was decreased by Hongyi A and B compared with control group, but expression of I $\kappa$ B was increased. Hongyi B also increased eNOS mRNA gene expression.

**Conclusions** : Hongyi A and B showed anti-inflammatory effect in mouse macrophages with the activation of vascular endothelial cell through NO production in MOVAS and HUVEC respectively. Hongyi B showed superior effect than Hongyi A, but additional mechanism study should be conducted.

**Key Words** : RAW264.7, Hongyi (*Formica yessensis*), endothelial cells, macrophages, endothelial cell, NF- $\kappa$ B, nitric oxide

## I. 서 론

홍의(*Formica yessensis*)는 불개미 또는 홍개미로 불리며 개미과의 곤충을 말린 것으로, 한국과 중국 등지에서 약재로 활용되어 왔다<sup>1)</sup>. 선행 연구들을 보면 홍의는 혈액의 thrombin time 및 activated partial thromboplastin time을 연장시켜 항응고 및 항혈전에 영향을 미치는 것을 보였으며<sup>2)</sup>, LDL-oxidation의 저해를 활성화하여 foam cell의 형성을 막아 동맥경과 예방 및 치료의 가능성을 나타냈다<sup>3)</sup>. 또 홍의가 포함된 류마티스를 치료하는 약물이 염증 유도된 쥐의 부종을 감소시켜 항염증 및 항류미티스에 대한 결과를 보여줬다<sup>4)</sup>. 이외에도 L-아미노산 활성화 또는 세포독성을 통하여 자궁경부암에서 기원한 hela cell를 억제할 수 있는 가능성을 나타냈다<sup>5)</sup>. 그 밖에 홍의 성분 분석<sup>6)</sup> 및 강직성 척추염의 임상 연구<sup>7)</sup> 등이 진행되었다.

하지만 기존 연구에서 추출법에 따른 효능이 비교되지 않았고 또 홍의의 항염증에 대한 구체적인 기전연구 등이 부족하다고 판단되었다. 이에 전통적인 한약 추출법인 열수 추출법과 70% 에탄올 추출법에 따른 효과를 비교하고 또 그 기전을 알아보기 위하여 본 연구를 진행하게 되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 홍의 효소처리 농축액과 분말제조과정

#### 1) 홍의 A 추출과정 (물 추출)

(1) 홍의에 개미산이 강하여 효소 처리하여도 효소반응이 일어나지 않으므로 물로 가수하여 홍의 100g을 물에 잠길 정도로 하여 4시간 침지시킨 후 반응기에 넣어 80℃±5℃에서 1차 추출하였다.

(2) 1차 추출된 원액을 여과하여 보조탱크로

이송하고 2차 효소반응을 홍의 잔류물에 키틴에이드 (기질에 0.1%), 알카라제 (기질에 0.1%)를 넣고 50℃±5℃에서 2시간 교반하고 48시간 효소 반응하여 키틴과 단백질을 분해하였다.

(3) 1차 추출, 2차 발효 후 1, 2차 혼합 하여 섞여 지게한 후 혼합물을 추출기에 넣고 정제수를 넣어 90℃±5℃에서 3차 추출을 하였다.

(4) 1, 2, 3차 처리한 후 혼합하여 농축하여 15brix로 조정하였다.

(5) 농축액으로 사용할 원료는 80brix이상이므로 고농축하고 Spray Dryer로 사용할 원료는 별도의 작업공정을 진행하였다.

(6) 15brix농축된 원료를 부형제로 텍스트린 10%를 혼합하여 Spray Dryer를 사용하여 수분 6.20g의 건조분말을 얻었다(수율 6.20%).

#### 2) 홍의 B 추출과정 (에탄올 추출)

본 실험에 사용한 홍의 분말을 동서비교한의학회로부터 공급받아 사용하였다. 홍의 분말 100g을 70% 에탄올용액 1,000 ml에서 2시간 동안 가열 환류 추출한다. 이 과정을 두 차례 더 반복하여 추출물을 얻는다. 추출한 추출액을 여과한 다음 여액을 5,000 x g로 30분 동안 원심분리시켜 상층액을 취한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)에 넣어 감압 농축한 다음 freeze dryer로 동결건조하여 홍의의 70% 에탄올추출물 홍의 B를 7.86 g얻었다(수율 7.86%).

### 2. 생쥐 대식세포주 (RAW264.7)에서 항염에 미치는 효과

#### 1) 세포주 및 세포배양

생쥐 대식세포주 (RAW264.7)는 한국 세포주 은행 (Seoul National University, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 생쥐 대식세포주 (RAW264.7)를 10 % FBS과 1 % 항생제

첨가된 MEM 배지에서 37 °C의 온도와 5 % CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 CO<sub>2</sub> 배양기(Forma Sci, USA)에서 배양하였다.

2) RAW264.7 대식세포 배양 및 NO 생산량 분석

10% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 2 ml의 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지와 RAW 264.7 세포 (2×10<sup>5</sup> cells/well)를 24-well culture plate에 넣고 standard incubator conditions (37°C, humidified, 5% CO<sub>2</sub> /95% air environment)에서 24시간 배양한 다음, 상층액을 제거했고, 여기에 2 µg/ml와 4 µg/ml의 농도로 lipopolysaccharide binding protein (LPS)을 처리한 Cilostazol (10 µg/ml)와 홍의 A와 B (10, 50, 100 µg/ml)을 처리한 후, 다시 24시간, 또한 6시간 배양한 후 상층액을 분리하여 냉동실에 보관하여 사용하였다. ELISA 측정은 Mouse NO (Intron, Korea) ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각 well에 Cilostazol과 상층액을 100µl 씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. NO 생성량을 측정하기 위한 시약인 Gries 시약은 용액 A (0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B (2% Sulfonylamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 제조하고 냉암소에 보관하며, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. 배양이 종료된 후 배양 상층액을 원심분리하여 100µl를 96well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100µl를 분주한 뒤 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준 검량 곡선은 Sodium Nitrite를 0~80µM사이에서 측정하였다.

3) Western blot

홍의 추출물이 RAW264.7 세포주에서 항염증 기전에 관여하는지 확인하고자 염증인자 NF-kB antibody를 이용하여 western blot을 시행하였으며 그 내용은 다음과 같다. RAW 264.7 세포주를 6-well plate에 5 × 10<sup>6</sup> cells/ mL로 분주하여 24 시간 배양한 뒤 홍의 추출물을 10, 50 및 100 µg/mL이 되게 각각 처리한 다음 LPS 2 µg/ml과 4 µg/ml을 처리하여 24 시간, 또는 6시간 배양하였다. 배양 후 phosphate buffer saline (PBS)로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리 하여 상층액을 버렸다. Whole cell lysate는 Lysis buffer (RIPA buffer 980 µl + protease inhibitor cocktail 100 × 10 µl + PMSF 100 mM 10 µl) 100 µl로 얼음에서 15~20 분간 반응시킨 후 상층액을 얻었다. 그리고 Nuclear extract kit (Active motif, USA)를 사용하여 hypotonic buffer를 넣고 얼음에서 15 분간 반응시킨 후 원심분리하여 상층액 (cytoplasmic fraction)을 모았다. 튜브에 남아있는 핵에 complete lysis buffer를 넣고 30 초 동안 얼음에서 반응시킨 후 원심분리 하여 상층액 (nuclear fraction)을 얻었다. 얻은 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량하였다. 10 % SDS page gel을 만들어서 running buffer를 채운 뒤 20 분 동안 pre-running 시키고 그 사이에 단백질용 loading buffer로 희석하고 끓는 물에 5 분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. Gel의 첫 번째 빈칸은 띄우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 120 V로 내렸다. 다 내린 gel을 크기에 맞게 자르고 20 분 동안 transfer 버퍼에 담귀 놓고, 그 사이에 멤브레인을 gel의 크기에 맞게 잘라 transfer 버퍼에 미리 담가 두었다. Gel과 멤브레인을 잘 밀착시킨 다음 transfer 버퍼로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 1 시간 30 분 동안 단백질을 멤브레인으로 이동시켰다.

단백질이 transfer된 멤브레인은 5% skin milk (in TBS/T buffer)로 1시간동안 blocking 해주었다. Primary antibody로서 goat anti-iNOS를 각각 4°C에서 하루를 반응시켰고 이때 사용한 모든 primary antibody는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)사의 것을 사용하였다. 다음 날 anti-rabbit IgG (Amersham, Buckinghamshire, UK)와 anti-goat IgG (Dako, Glostrup, Denmark)를 사용하여 secondary antibody를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이 암실에서 반응시킨 멤브레인을 가볍게 말리고 Detection 용액(Amersham, USA)에 반응시켰으며 다시 멤브레인을 가볍게 말리고 필름에 옮겨 발광시켰다. 필름을 현상용액에 담귀 현상하였고 고정액에 고정시켜 건조시켰다. 결과에 대한 밴드밀도(band density)는 YY-1과 비교하여 Image-Rab densitometer(Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 측정 분석하였다.

### 3. 혈관내피세포의 확장에 미치는 영향

1) 생쥐의 혈관평활근세포 및 사람 혈관 내피세포 준비

(1) 생쥐의 혈관평활근세포의 분리

생쥐 혈관평활근세포 (mouse vascular smooth muscle cell line MOVAS-1, MOVAS)는 수컷 C57BL6 쥐 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA)의 aortic smooth muscle cells에서 얻었다. MOVAS는 10% FBS (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, (Gibco-Invitrogen), and MEM Non-Essential Amino Acids (Invitrogen, Eugene, OR)가 포함된 DMEM에서 배양되었다. (37°C, humidified, 5% CO<sub>2</sub> /95% air environment)

(2) 사람 혈관 내피세포 분리

HUVEC세포는 사람의 umbilical cord veins에서 분리하여 얻은 세포를 사용하였다. HUVEC세포는 collagenase digestion법을 이용하여 0.2% gelatin 코팅된 flask에서 배양하였다. HUVEC were characterized by their typical morphology at confluence and positive immunofluorescence stain by using a monoclonal antibody specific for von Willebrand factor. 세포배양은 M199 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하였고, 20% FBS과 항생제를 포함하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% 환경에서 배양되었다.

2) Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

홍의 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chem, CO.)에 최종 농도가 0.05%가 되도록 녹이고, filter (0.02 µm pore size, Millipore)로 여과 멸균하여 사용하였다. 홍의 A와 B의 농도는 예비 실험을 통하여 결정한 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125 µg/ml로 하여 실험하였다. NO 생성량을 측정하기 위한 시약인 Griess 시약은 용액 A (0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B (2% Sulfonylamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 제조하고 냉암소에 보관하며, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. 배양이 종료된 후 배양 상층액 100µl를 96well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100µl를 분주한 뒤 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준 검량 곡선은 Sodium Nitrite를 0~80µM사이에서 측정하였다.

3) 역전사 효소중합반응 (RT-PCR)

역전사 반응 (reverse transcription reaction)

은 3-5 $\mu$ g total RNA와 reverse transcriptase (MMLV; GI BCO, BRL)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 역전사 반응은 total RNA (3-5 $\mu$ g), oligo d(T)12-18 (1 $\mu$ g), 2 $\mu$ l dNTP (10mM), MMLV reverse transcriptase (200U), DTT (10mM), RNasin (1 $\mu$ l; Promega, USA)이 20 $\mu$ l 완충용액 (50mM Tris-Cl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MeCl<sub>2</sub>)에 함유된 반응액으로 42 $^{\circ}$ C에서 60분동안 반응시켜 수행하였다. 역전사 반응액의 2 $\mu$ l가 함유된 30 $\mu$ l의 반응액으로 효소중합반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 수행하였다. 2 $\mu$ l reverse transcription 반응액, 2 $\mu$ l dNTP (2.5mM), 3 $\mu$ l primer (5  $\mu$ M), Taq DNA polymerase (0.6U; TAKARA)가 함유된 30 $\mu$ l 반응액(20mM Tris-Cl pH 8.0, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT)을 94 $^{\circ}$ C에서 5 분동안 pre-denaturation 시킨 후 denaturation (94 $^{\circ}$ C, 45초), annealing (58 $^{\circ}$ C, 45초), elongation (72 $^{\circ}$ C, 60초)의 조건에서 33 cycles을 수행하였다. 이때 사용한 iNOS 유전자에 대한  $\beta$ -actin에 대한 sense primer로 5'-TGCCCATCTATGAGGGTTACG-3'와 antisense primer로 5'-TAGAAGCATTTGCGGTGCACG-3'으로 합성하여 사용하였다. PCR 증폭후 PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전개하여 확인하였다.

#### 4. 통계분석

모든 실험 결과의 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균값과 표준오차로 표시하고 통계적 유의성 (P<0.05)은 ANOVA로 검증하였다.

### III. 결 과

#### 1. 생쥐 대식세포주 (RAW264.7)에서 홍의 A와 홍의 B의 항염효과

(1) 생쥐 대식세포 (RAW264.7)에서 홍의 A와 B의 NO 생산량 활성 억제 및 기전연구

(1) 생쥐 대식세포세포 (RAW264.7 cell line)에서 NO 생성량 측정

홍의 추출물과 Cilostazol의 염증 RAW264.7 대식세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RAW264.7 대식세포에 다양한 농도의 홍의 추출물과 양성대조군으로 Cilostazol (10  $\mu$ g/ml)처리한 후 LPS로 자극한 뒤 24시간 후 ELISA로 염증사이토카인 NO 생산량을 측정하였다. 홍의 A의 항염증 효과를 관찰한 결과로, RAW264.7 대식세포에서 LPS 2  $\mu$ g/ml로 자극하여 측정된 NO 생산량은 정상군 (RAW264.7, Normal)에 비하여 LPS를 처리한 대조군 (LPS)이 현저하게 증가되었다. 양성대조군인 Cilostazol은 NO 생산량이 대조군 (LPS)에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다 (p<0.01). 그리고 홍의 A를 처리한 실험군의 NO 생산량은 100  $\mu$ g/ml (p<0.05)에서는 대조군 (LPS)에 비하여 통계적으로 유의하게 감소되었으나, 10, 50  $\mu$ g/ml에서는 통계학적 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 1A). 또한 RAW264.7 대식세포에서 LPS 4  $\mu$ g/ml로 자극하여 측정된 NO 생산량은 정상군 (RAW264.7, Normal)에 비하여 LPS를 처리한 대조군 (LPS)이 현저하게 증가되었다. 양성대조군인 Cilostazol은 NO 생산량이 대조군 (LPS)에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다 (p<0.01). 그리고 홍의 A를 처리한 실험군의 NO 생산량은 50, 100  $\mu$ g/ml (p<0.01) 대조군 (LPS)에 비하여 농도의존적으로 통계적으로 유의하게 감소되었다 (Fig. 1A-1).

홍의 B의 항염증 효과를 관찰한 결과로, RAW264.7 대식세포에서 LPS 2  $\mu$ g/ml로 자극하여 측정된 NO 생산량은 정상군 (RAW264.7,

Normal)에 비하여 LPS를 처리한 대조군 (LPS)이 현저하게 증가되었다. 양성대조군인 Cilostazol은 NO 생산량이 대조군 (LPS)에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다 ( $p < 0.001$ ). 그리고 홍의 추출물B 처리한 실험군의 NO 생산량은 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.01$ )에서는 대조군 (LPS)에 비하여 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 1B). 또한 RAW264.7 대식세포에서 LPS 4  $\mu\text{g/ml}$ 로 자극하여 측정된 NO 생산량은 정상군 (RAW264.7, Normal)에 비하여 LPS를 처리한 대조군 (LPS)이 현저하게 증가되었다. 양성대조군인 Cilostazol은 NO 생산량이 대조군 (LPS)에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다 ( $p < 0.001$ ). 그리고 홍의 B를 처리한 실험군의 NO 생산량은 10 ( $p < 0.01$ ), 50 ( $p < 0.001$ ), 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.001$ )에서는 대조군 (LPS)에 비하여 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 1B-1).

(2) 홍의 A와 B에 의한 생쥐 대식세포 (RAW264.7)에서 NF- $\kappa$ B 신호전달 기전

RAW264.7 세포와 배양시간을 6시간으로 조정하여 LPS 2  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 NF- $\kappa$ B 유전자 발현을 측정한다. 해보면 NF- $\kappa$ B 발현은 홍의 A NF- $\kappa$ B의 protein level에 큰 영향을 주지 않는 결과로 보였다 (Fig. 2A). 홍의 B는 LPS를 처리하였을 경우, 농도 의존적으로 NF- $\kappa$ B의 protein level이 감소하였다 (Fig. 2B). 하지만, 통계학적으로 유의성 있는 결과를 도출하지는 않았다.

## 2. 생쥐 혈관내피세포와 사람 혈관 내피세포에서 홍의 A와 B의 NO 생산량 활성 및 기전연구

1) 생쥐 혈관 내피세포 (MOVAS, Mouse vascular endothelial cell)에서 NO 생성량 측정  
홍의 A와 B를 생쥐 혈관 내피세포와 12시간 동안 배양하여 NO 생산량을 측정한다. 결과, 홍의 A 처리군 100  $\mu\text{g/ml}$ 와 홍의 B 처리군 100  $\mu\text{g/ml}$ 에

서 대조군에 비하여 통계학적 유의성 있게 증가를 나타내었다 (Fig. 3A). 또한 생쥐 혈관 내피세포와 24시간 동안 배양하여 NO 생산량을 측정한다. 결과, 홍의 A 처리군 100  $\mu\text{g/ml}$ 와 홍의 B 처리군 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비하여 증가를 나타내었으나 통계학적 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 3B).

2) 사람 혈관 내피세포 (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells)에서 NO 생성량 측정

홍의 A와 B를 사람 혈관 내피세포와 12시간 동안 배양하여 NO 생산량을 측정한다. 결과, 홍의 B 처리군 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비하여 증가를 나타내었으나 그 증가가 미미하여 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 4A). 사람 혈관 내피세포와 24시간 동안 배양한 결과 NO 생산량이 홍의 B 처리군 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비하여 증가를 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 4B). 홍의 A에서는 12, 24시간 배양에서 모두 영향이 없었다.

3) 홍의 A와 B에 의한 생쥐 혈관 내피세포에서 NF- $\kappa$ B 신호전달 기전

홍의 A와 B를 생쥐 혈관 내피세포와 12시간 동안 배양한 결과, NF- $\kappa$ B 발현은 홍의 A 처리군 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 와 홍의 B 처리군 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 이 대조군에 비하여 감소를 나타내었고, I $\kappa$ B 발현은 홍의 A 처리군 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 와 홍의 B 처리군 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 이 대조군에 비하여 증가를 나타내었다 (Fig. 5A). 같은 조건에서 시간을 24시간 동안 배양한 결과, NF- $\kappa$ B 발현은 홍의 A 처리군 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 와 홍의 B 처리군 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 이 대조군에 비하여 감소를 나타내었고, I $\kappa$ B 발현은 홍의 A 처리군 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 와 홍의 B 처리군 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 이 대조군에 비하여 현

저하게 증가를 나타내었다 (Fig. 5B).

4) 홍의 A와 B에 의한 사람 혈관 내피세포에서 NF- $\kappa$ B 신호전달 기전

홍의 A와 B를 사람 혈관 내피세포와 12시간동안 배양한 결과, NF- $\kappa$ B 발현은 홍의 A 처리군 10, 50  $\mu$ g/ml와 홍의 B 처리군 10, 50, 100  $\mu$ g/ml이 대조군에 비하여 감소를 나타내었고, I $\kappa$ B 발현은 홍의 A 처리군 10, 50, 100  $\mu$ g/ml와 홍의 B 처리군 10, 50, 100  $\mu$ g/ml이 대조군에 비하여 증가를 나타내었다 (Fig. 6A). 같은 조건에서 시간을 24시간동안 배양한 결과, NF- $\kappa$ B 발현은 홍의 A 처리군 10, 50, 100  $\mu$ g/ml와 홍의 B 처리군 10, 50, 100  $\mu$ g/ml이 대조군과 차이가 없었고, I $\kappa$ B 발현도 홍의 A 처리군 10, 50, 100  $\mu$ g/ml와 홍의 B 처리군 10, 50, 100  $\mu$ g/ml이 대조군에 비하여 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 6B).

5) 생쥐 혈관 내피세포와 사람 혈관 내피세포에서 홍의 A와 B의 내피세포 산화질소 합성효소 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 생산량 활성화

생쥐 혈관 내피세포와 사람 혈관 내피세포에서 홍의 A와 홍의 B에 의해 eNOS의 유전자발현을 분석하였다. 그 결과 생쥐 혈관 내피세포에서는 큰 차이가 없었으나, 사람 혈관 내피세포에서 eNOS mRNA 유전자 발현이 홍의 B에서 농도 의존적으로 증가를 나타내었다 (Fig. 7).

## IV. 고 찰

대식세포는 cytokine이나 LPS 등에 의해 NO를 생성한다. 이렇게 생성된 NO는 효소와 결합된 또는 결합되지 않은 lipid alkoxyl, peroxy radical intermediate와 매우 빨리 반응하여 질

화 중간산물을 생성한다<sup>8)</sup>. NO는 고농도에서 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발한다<sup>9)</sup>. LPS는 세균 내독소로 대식세포에 처리하면 염증성 cytokines 및 NO와 같은 염증반응의 매개물질을 생성하여 병리학적 반응이 일어난다.

본 실험에서 생쥐의 대식세포를 이용하여 LPS로 염증을 유도하고 홍의 A와 B를 사용하여 염증을 얼마나 억제하는지 알아보았다. 중간 과정에서 생성되는 NO 생산량을 측정된 결과 홍의 A는 100  $\mu$ g/ml ( $p < 0.05$ )농도에서, 홍의 B는 50, 100  $\mu$ g/ml ( $p < 0.01$ )농도에서 NO의 생성량을 감소시켰다. 또한 홍의 A와 B의 농도가 높을수록 NO의 생산량이 더 많이 감소하여 농도 의존적으로 NO 생산량을 억제하는 것을 나타냈다. 이로써 홍의 A와 B는 염증반응에 직접적으로 관여하는 NO 생산량을 저해하는 것으로 판단된다.

또한 홍의 B는 LPS를 처리하였을 경우, NF- $\kappa$ B의 protein level이 감소하는 것을 나타냈다. 이러한 결과는 NO 생성 활성화 기전에 NF- $\kappa$ B가 신호전달 기전으로 관여하여 홍의 B에 의하여 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 감소되고, 전사인자인 I $\kappa$ B가 감소가 되어 핵 promotor에 binding이 억제되어 NO유전자의 불활성화로 NO 생산량이 감소하게 됨을 의미한다.

대식세포에서의 홍의 B는 염증반응에 직접 관여하는 NO 생산량을 저해하고, NF- $\kappa$ B의 protein level이 감소하는 것을 나타내었으므로, 이러한 결과는 NO 생성 활성화 기전에 NF- $\kappa$ B가 신호전달 기전으로 관여하여 활성화되어 감소되고, 그 전사인자인 I $\kappa$ B가 감소가 되어 NO유전자의 불활성화로 NO 생산량을 감소시킴을 의미한다. 이러한 도출된 결과를 종합하면 에탄올 추출을 시행하였을 때의 홍의에서 항염 관련 성분이 도출될 가능성이 더 크다고 보인다. 그러므로 추가적으로 정확한 염증 관련된 부분은 성분분석이 필요할 것으로 사료된다.

NO는 혈관 내에서 혈관내피 보호, 강력 항산화제 생성, 순환계, 면역계, 신경계 등의 기능을 촉진, 인체의 모든 기관에 신호 전달을 하는 기능을

갖고 있다.

이에 홍의 A와 B가 혈관 내피세포의 NO 생성에 대한 연구결과, 생쥐 혈관 내피세포에서 12시간 경과 됐을 때 홍의 A와 B 모두 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의한 증가를 보였다. 하지만 24시간 경과에서는 유의한 결과를 얻지 못했다. 비록 유의적 통계를 얻지 못하였으나 NO 생산 증가에 간접적인 영향을 미치는 것으로 보이며, 오랜 시간은 오히려 세포 자체에 영향을 주었을 가능성도 있어, 추후 시간에 따른 NO 생산량을 측정하여 적정시간에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 이 기전을 연구를 위하여 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B 측정 결과, NO 생성 활성화 기전에 NF- $\kappa$ B가 신호전달 기전으로 관여하여 홍의 A와 B에 의하여 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 감소되고, 전사인자인 I $\kappa$ B가 증가되어 핵 promotor에 binding하게 되어 NO유전자의 활성화로 NO 생산량이 증가를 나타내는 것으로 해석된다<sup>10,11</sup>.

또한 사람 혈관 내피세포에서도 증가는 하였으나 그 변화가 미미하였다. 사람 혈관 내피세포에서는 12시간 배양에서만 NO 생성 활성화 기전에 NF- $\kappa$ B가 신호전달 기전으로 관여하여 홍의 A와 B에 의하여 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 감소되고, 전사인자인 I $\kappa$ B가 증가되어 핵 promotor에 binding하게 되어 NO유전자의 활성화로 NO 생산량이 증가를 하게 된다.

생쥐 혈관내피세포와 사람 혈관내피세포에서 홍의 A와 홍의 B에 의해 NO의 생산량이 증가되는 것을 확인 하였고, 혈관내피세포의 eNOS는 활성화된 것과 비활성화된 것 두 가지 형태가 존재하며 인산화(phosphorylation)에 의해 eNOS가 활성화된 형태로 되어야만 일산화질소(NO)의 생성이 가능한데 홍의 A와 B에서 NO생산량과 NF- $\kappa$ B 인산화를 증가시키는 기전 중 특히 사람 혈관 내피세포에서 eNOS mRNA 유전자 발현이 홍의 B에서 농도 의존적으로 증가됨을 증명했다.

홍의를 열수 추출한 홍의 A와 에탄올 추출한 홍의 B는 쥐의 대식세포 실험을 통하여 항염작용이 있음을 알 수 있었으며, 그 기전은 NF- $\kappa$ B를 통한 것으로 보인다. 그러나 기전 연구에서 에

탄올 추출한 홍의 B에서만 유의한 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과로 볼 때, 항염 관련 성분을 추출하는 방법은 물보다는 에탄올이 더 적절하다고 보인다. 그러나 열수 추출에서도 대식세포의 NO 생성을 억제하였으므로 항염 관련 가능성에 대해 다른 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

혈관 내피세포에서는 생쥐와 사람에게 모두 NO 생산량을 증가시켜 혈관 내피세포를 활성화 하였으나 통계적 유의성을 얻지 못해 연구의 한계가 있었다. 통계적 유의성은 도출하지 못했지만, 사람의 혈관내피세포에서 홍의 B와 생쥐 혈관내피세포에서 열수, 에탄올 추출 모두 NO 생산량이 증가한 것으로 보아, 홍의 A와 B 모두 내피세포를 활성화함에 있어 공통적으로 효과가 있음을 보였다. 또한 그 기전 연구에서 생쥐와 사람 혈관 내피세포 모두 NF- $\kappa$ B를 통한 것으로 보인다. 추가로 홍의 B는 사람 혈관 내피세포에서 eNOS mRNA의 발현을 농도 의존적으로 증가시킨다는 것을 알아냈다. 그러나 혈관 내피세포 실험에서 열수 추출인 홍의 A의 기전이 밝혀지지 않아 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

홍의 A와 B는 대식세포에서 NO 생산량을 억제하여 염증반응을 감소시켰다. 내피세포에서는 NF- $\kappa$ B의 활성화가 감소하고, 전사인자인 I $\kappa$ B가 증가하여 NO 유전자의 활성화로 NO 생산량이 증가하였다. 또한 홍의 B는 사람 혈관 내피세포에서 eNOS mRNA의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다. 하지만 열수 추출인 홍의 A의 기전이 명확히 밝혀지지 않아 추가 연구가 요구된다.

## 감사의 글

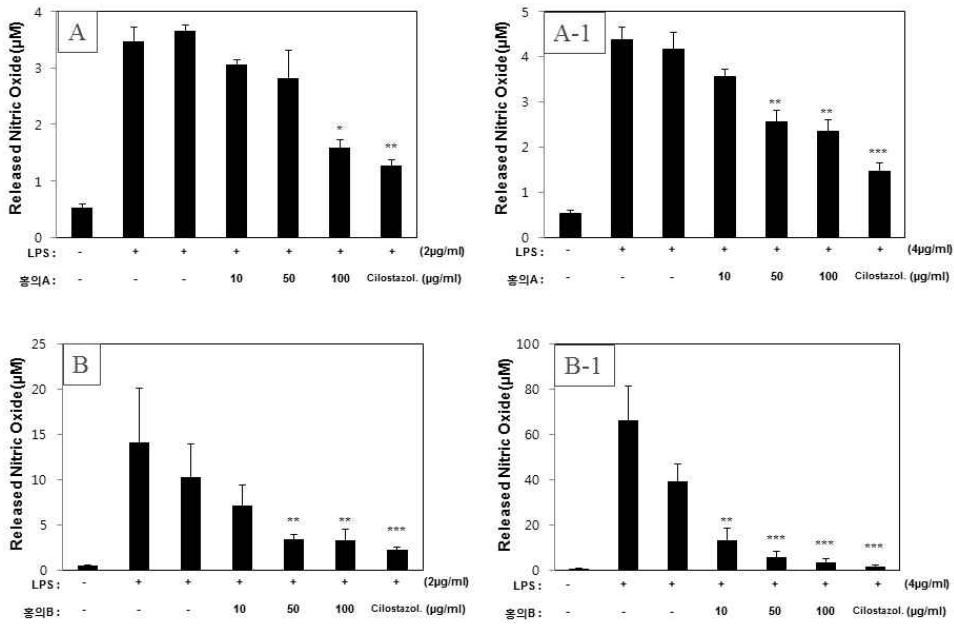
본 연구는 동서비교한의학회 지원(2013년)을 받아 수행되었습니다.



## 참고문헌

1. Joongyakdasajeon. Jungdam publishing department. Seoul, R.O.K., Jungdam publish. p6641, 2006.
2. Han, B.S., Wu, S.J., Kim, S.H., Kim, Y.S.. Evaluation of Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from Crude Extracts of Insects. *Kor J Pharmacogn* 30(4): 409-412, 1999.
3. Park, D.S., Yoon, M.A., Xu, M.A., Yu, H.A., Kim, J.R., Jeong, T.S., Park, H.Y.. Screening of Anti-atherogenic Substances from Insect Resources. *Kor J Pharmacogn* 35(3): 233-238, 2004.
4. Jia, W., Gao, W.Y., Cui, N.Q., Xiao, P.G.. Anti-inflammatory effects of an herbal medicine (Xuan-Ju agent) on carrageenan- and adjuvant-induced paw edema in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 139-141, 2003.
5. Ahn, M.Y., Ryu, K.S., Lee, Y.W., Kim, Y.S.. Cytotoxicity and L-amino Acid Oxidase Activity of Crude Insect Drugs. *Arch Pharm Res* 23(5): 477-481, 2000.
6. Taguch, S., Bulet, P., Hoffmann, J.A.. A novel insect defensin from the ant *Formica rufa*. *Biochemie* 80: 343-346, 1998.
7. Schirmer, K.P., Fritz, M., Jäckel, W.H.. Effectiveness of *Formica rufa* and autologous blood injection in patients with ankylosing spondylitis: a double-blind randomized study. *Z Rheumatol* 59(5): 321-329, 2000.
8. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 78: 915-918, 1994.
9. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 54(4): 469-487, 2003.
10. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388: 548-554, 1997.
11. Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev* 43: 109-142, 1991.

Fig. 1. Nitric Oxide Production in RAW264.7 with Hongyi A and B



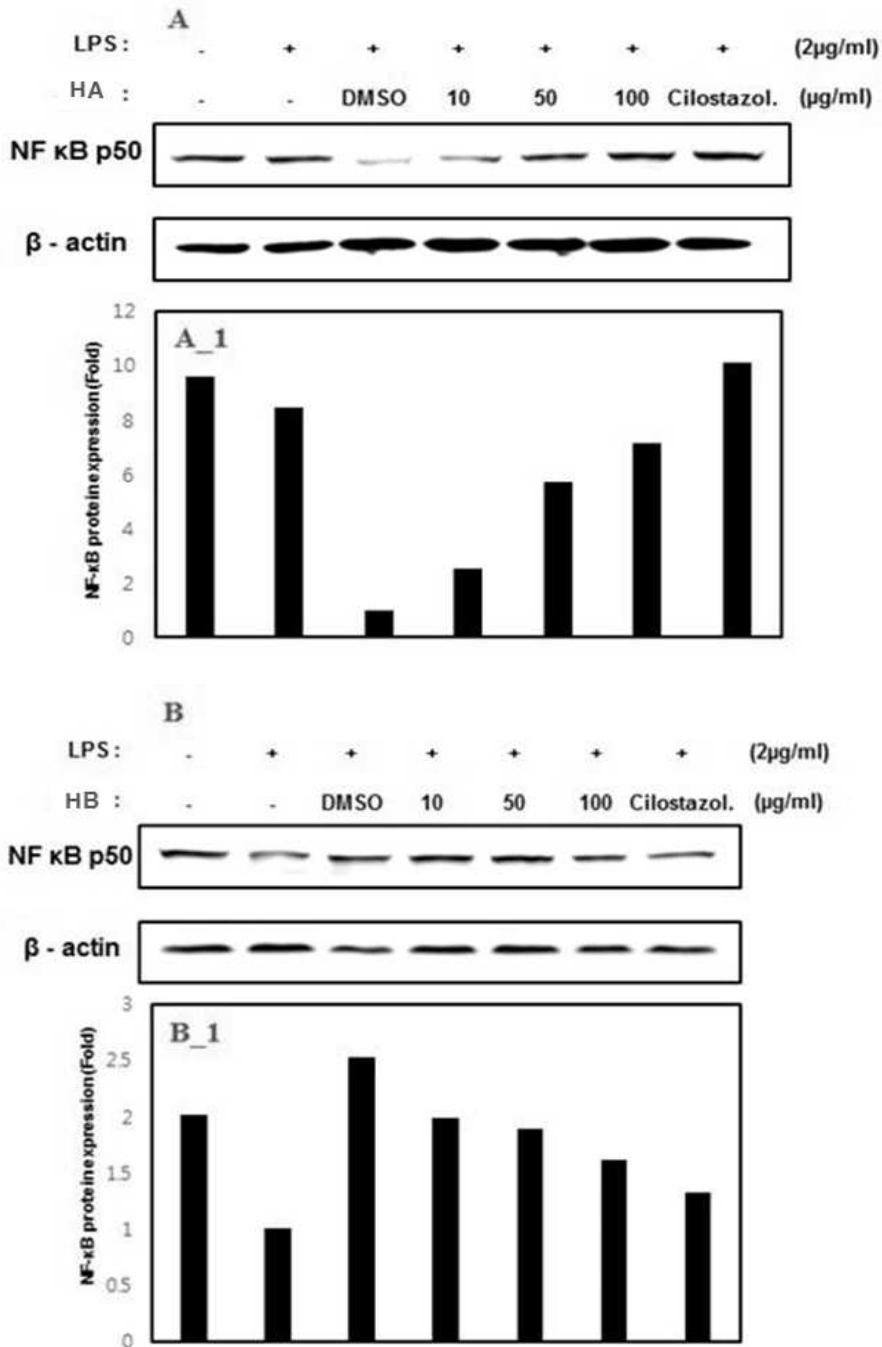
A : Nitric oxide production RAW264.7 treated by LPS 2 μg/ml with Hongyi A

A-1 : Nitric oxide production RAW264.7 treated by LPS 4 μg/ml with Hongyi A

B : Nitric oxide production RAW264.7 treated by LPS 2 μg/ml with Hongyi B

B-1 : Nitric oxide production RAW264.7 treated by LPS 4 μg/ml with Hongyi B

Fig. 2. Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in RAW264.7 with Hongyi A and B

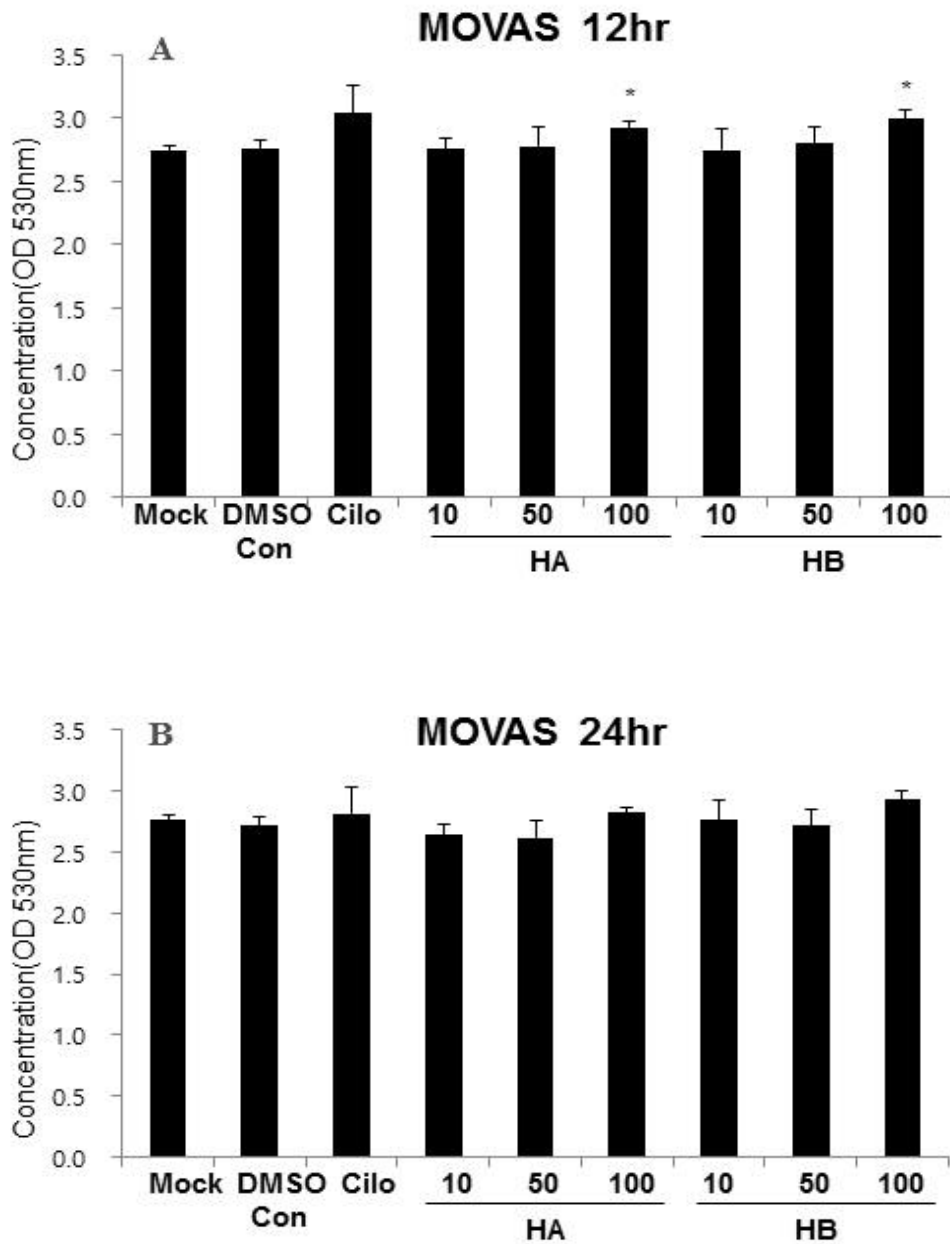


A : Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in RAW264.7 with Hongyi A

B : Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in RAW264.7 with Hongyi B

\*\* HA : Hongyi A, HB : Hongyi B, LPS : lipopolysaccharide binding protein

Fig. 3. Nitric Oxide Production in Mouse Vascular Endothelial Cell (MOVAS) with Hongyi A and B

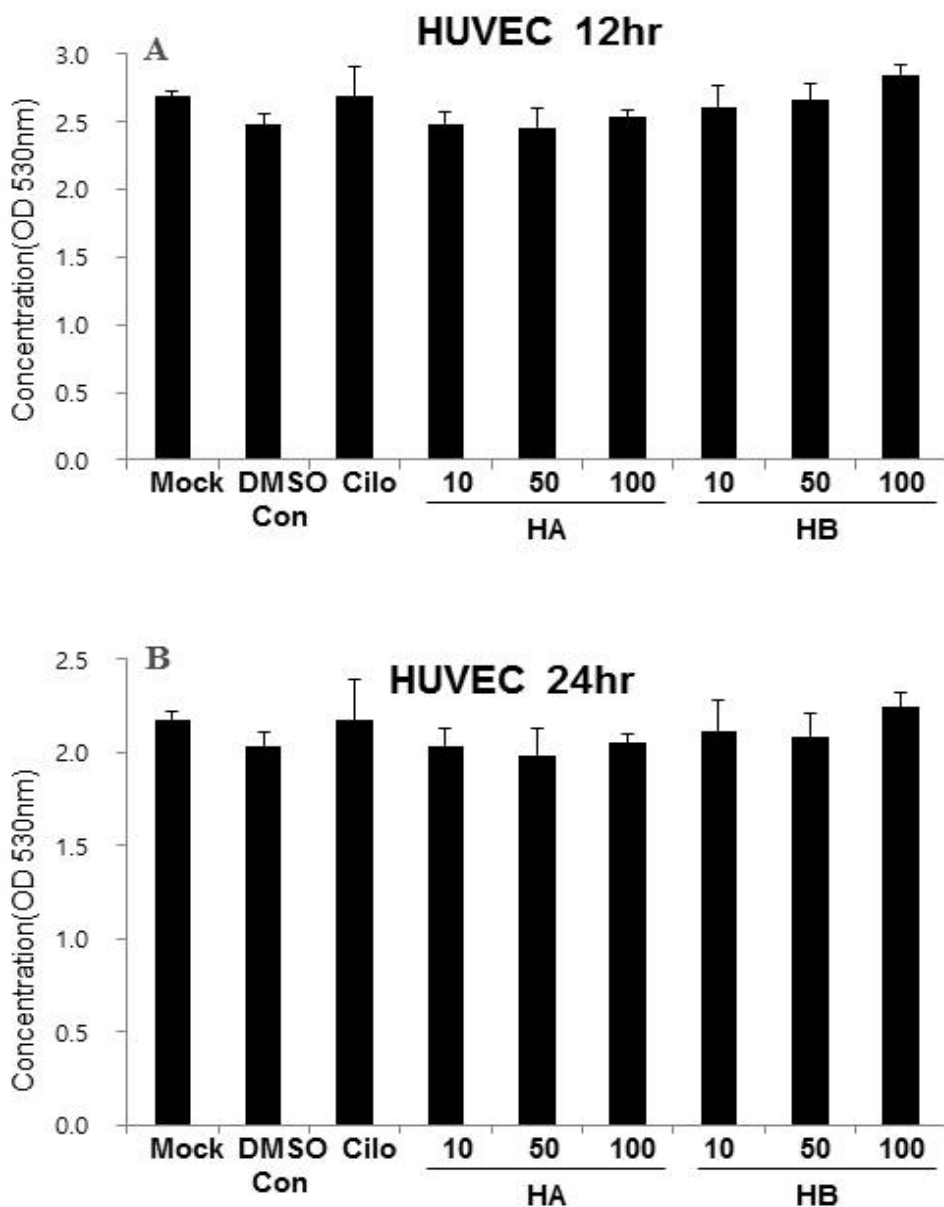


A : Nitric Oxide Production in MOVAS with Hongyi A and B (100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) during 12 hours.

B : Nitric Oxide Production in MOVAS with Hongyi A and B (100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) during 24 hours.

\*\* HA : Hongyi A, HB : Hongyi B, Cilo : Cilostazol

Fig. 4. Nitric Oxide Production in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) with Hongyi A and B

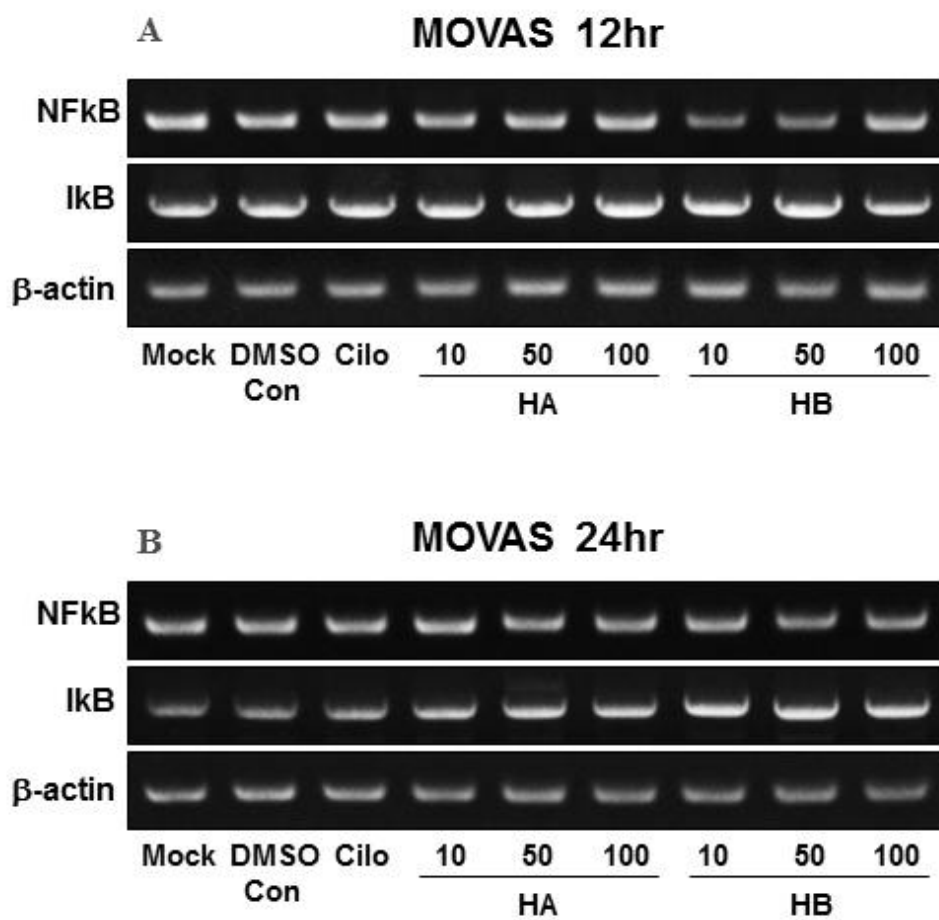


A : Nitric Oxide Production in HUVEC with Hongyi A and B (100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) during 12 hours.

B : Nitric Oxide Production in HUVEC with Hongyi A and B (100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) during 24 hours.

\*\* HA : Hongyi A, HB : Hongyi B, Cilo : Cilostazol

Fig. 5. Expression pattern of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B mRNAs in mouse vascular endothelial cell line (MOVAS) after Hongyi A and B treatments

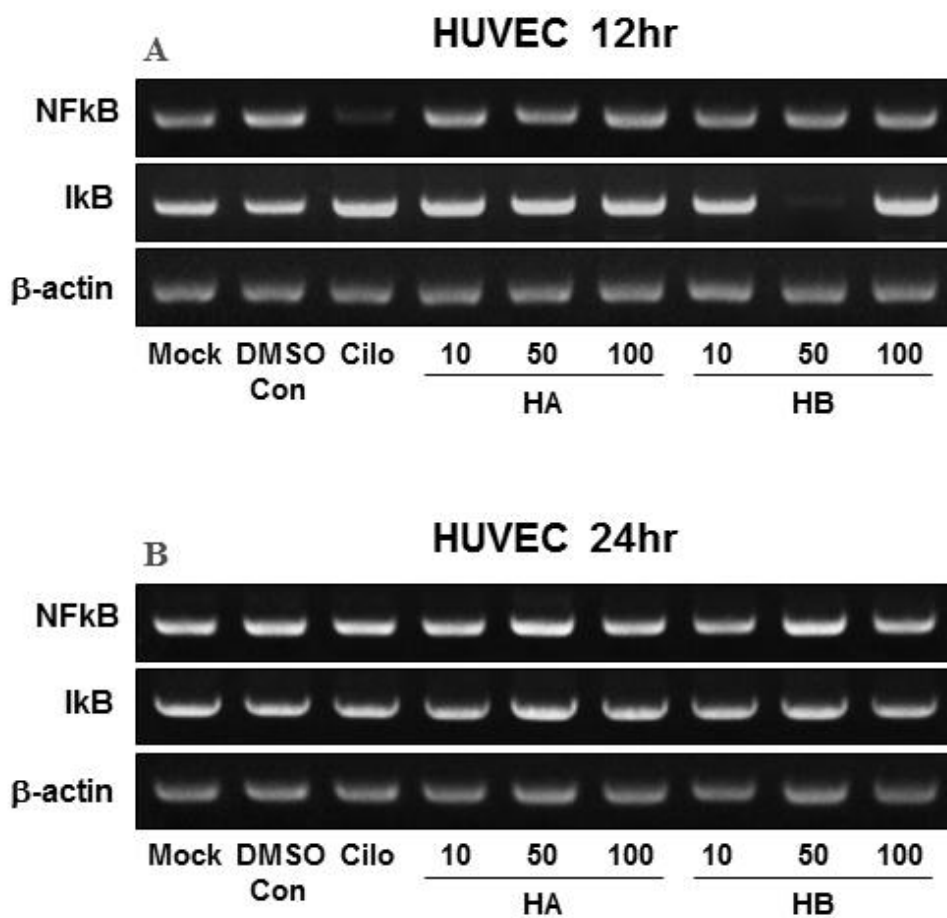


A : Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in MOVAS with Hongyi A and B during 12 hours

B : Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in MOVAS with Hongyi A and B during 24 hours

\*\* HA : Hongyi A, HB : Hongyi B, Cilo : Cilostazol

Fig. 6. Expression pattern of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B mRNAs in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) after Hongyi A and B treatments

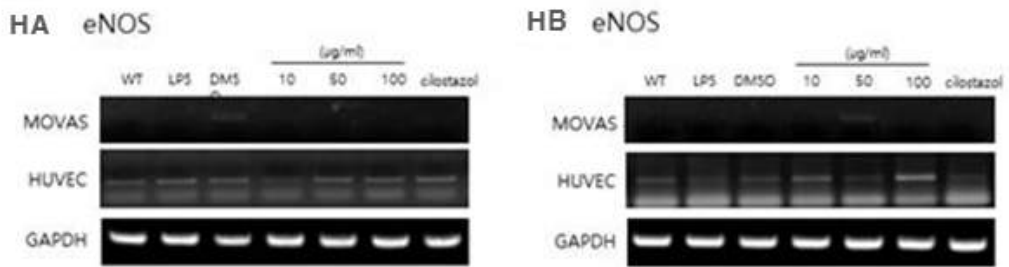


A : Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in HUVEC with Hongyi A and B during 12 hours

B : Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in HUVEC with Hongyi A and B during 24 hours

\*\* HA : Hongyi A, HB : Hongyi B, Cilo : Cilostazol

Fig. 7. Expression pattern of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in MOVAS and HUVEC after Hongyi A and B treatments



A : Expression of eNOS in MOVAS and HUVEC with Hongyi A during 24 hours

B : Expression of eNOS in MOVAS and HUVEC with Hongyi B during 24 hours

\*\* MOVAS : Mouse Vascular Endothelial Cell, HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells