

## Lipopolysaccharide를 처리한 RAW 264.7 세포에서 백두옹 메탄올 추출물의 항염증 효과

이귀선 · 김두희 · 박중현 · 최희승 · 허성규 · 차윤엽

상지대학교 한의과대학 한방재활의학교실

### The Anti-Inflammatory Effect of *Pulsatilla koreana* Methanol Extract in Lipopolysaccharid-Exposed RAW 264.7 Cells

Gui Sun Lee, Doo Hee Kim, Joong Hyun Park, Hee Seung Choi, Seong Kyu Heo, Yun Yeop Cha

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Sangji University

Received: April 7, 2017

Revised: May 30, 2017

Accepted: May 30, 2017

**Correspondence to:** Yun Yeop Cha  
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Sangji University, 80 Sangjidaegil, Wonju 26338, Korea  
Tel: +82-33-741-9260  
Fax: +82-33-732-2124  
E-mail: omdcha@sangji.ac.kr

Copyright © 2017 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

**Objectives:** This study was performed to identify the anti-inflammatory effect of *Pulsatilla koreana* (PK) methanol extract on lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory.

**Methods:** There were five groups. They were control group, LPS-exposed PK methanol extract group (0 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml). To measure out cytotoxicity of PK, we performed the MTT assay. To evaluate the anti-inflammatory effect of PK, we examined the inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), and pro-inflammatory cytokines (interleukin [IL]-1β, IL-6, tumor necrosis factor-α [TNF-α], IL-10).

**Results:** 1. The extract of PK (~100 µg/ml) itself did not have any cytotoxic effect in RAW 264.7 cells. 2. The concentration of plasma NO and PGE2 in PK methanol extract group showed a lower values than those of control group. 3. The concentration of plasma IL-1β, plasma IL-6, and plasma TNF-α in PK methanol extract group showed a lower values than those of control group. 4. The concentration of Plasma IL-10 in PK methanol extract groups showed higher than control group; however, these values showed no significantly different.

**Conclusions:** According to this study, the extract of PK could be used as a protective agent against inflammation.

**Key Words:** *Pulsatilla koreana*, Lipopolysaccharide, RAW264.7, Anti-inflammatory effect, Cytokines

## 서론

염증반응(inflammation)은 병원균들의 감염, 화학적 자극 및 상처 등과 같은 외부 자극에 대한 생체 조직의 방어기전으로 각종 병원균들에 의해 활성화된 면역세포 혹은 염증매개인자들의 발현에서부터 시작된다<sup>1)</sup>. 대부분의 항염증제들은 장기 복용 시 출혈성 소화관 궤양, 신장 기능 저하 및 혈압상승뿐만 아니라 심근경색 및 혈전 형성 등의 순환기계 질환도 유발할 수 있다고 보고되었다<sup>2)</sup>. 따라서 효과가 우수하면서 부작용이 적은 새로운 약물의 개발이 필요하며, 마

황<sup>3)</sup> 감국<sup>4,5)</sup> 하고초<sup>6)</sup> 등 한약재를 이용한 연구결과들은 새로운 항염증제의 개발 가능성을 보여주었다.

생체 내의 과도한 염증반응은 주변 조직을 손상시키고 질병의 상태를 악화시키거나 새로운 질병을 유발하기 때문에 임상 현장에서 염증반응의 제어는 매우 중요하다<sup>7)</sup>. 최근에 비만이 염증성 질환의 원인이 될 수 있다는 연구 결과가 보고되고 있다. 비만으로 인해 과잉으로 축적된 체내 지방 조직은 염증반응 매개물질의 생산에 관여하며, 생체 전반의 다양한 곳에 염증 질환을 유발할 수 있다<sup>8)</sup>. 지방세포가 단순히 지방축적의 기능만 있는 것이 아니라 종양괴사인자 α

(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6 등을 분비하는 내분비 기관으로서의 역할을 하기 때문에<sup>8)</sup> 염증반응을 제어할 수 있는 약물의 개발은 비만으로 인한 각종 질환의 치료 효과를 개선하는 데 도움을 줄 수 있다. 체내 축적된 비만세포는 대식세포를 끌어모으는 역할을 하는 monocyte chemoattractant protein-1이라는 adipokine을 분비하여 체내 대식세포를 지방세포 사이로 모이게 한다. 이렇게 모인 대식세포는 지방세포로부터 분비된 여러 사이토카인(cytokines)에 의해 TNF- $\alpha$  등의 사이토카인을 분비하게 되며 이는 지방세포 막의 receptor에 작용하게 되고 nuclear factor (NF- $\kappa$ B)를 활성화시켜 지방산이 유리된다. 유리된 지방산은 다시 대식세포 막에 존재하는 receptor에 작용해 NF- $\kappa$ B를 활성화시켜 비만과 염증을 더욱 악화하게 된다<sup>9)</sup>.

한의학에서는 비만의 유형을 脾虛型, 痰飲型, 陽虛型, 食積型, 肝鬱型, 瘀血型으로 크게 구분하고 있다<sup>10,11)</sup>. 비만에 대한 약물연구는 Hwang 등<sup>12)</sup>의 연구에 따르면 탕제의 빈도는 태음조위탕, 조위승청탕, 체감의이인탕, 방풍통성산 순으로 나타났고, 처방에 포함된 본초를 계산하였을 때는 의이인, 당귀, 감초, 나복자, 천궁, 마황 순으로 나타났다. 2010년부터 2014년 12월까지 비만 생약 치료에 대한 연구로는 사삼추출물을 이용한 연구와 털부처꽃과 돌단풍 잎 추출물을 1:1로 배합한 연구로 총 2편이었다. 이외에도 마황<sup>13)</sup>, 홍삼<sup>14)</sup>, 미후등<sup>15)</sup>, 마치현<sup>16)</sup>, 자초<sup>17)</sup>, 흰민들레<sup>18)</sup> 등 항염증 효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

백두옹(*Pulsatilla koreana*)의 주요성분은 triterpenoid계의 hederagenin, triterpenoid saponin II 및 ursolic acid 등으로 보고되었으며<sup>19,20)</sup>, 혈당 및 혈청 콜레스테롤의 저하, 심장수축 및 위장운동의 증강, 이질, 소염, 해열, 수종 및 항균 등에 효과를 나타낸다는 것이 밝혀졌다<sup>21-24)</sup>. 백두옹은腸胃의 熱毒을 淸除하고 涼血止痢시키는 특징이 있어 熱毒下痢를 치료하는 要藥으로 세균성이질과 아메바성이질에 상용한다. 황련, 황백 등을 배합하여 熱毒血痢로 發熱腹痛하고 下痢膿血하며 裏急後重한 證을 치료한다. 아교주, 감초, 진피, 황련 등을 배합하여 產後下痢를 치료한다<sup>25)</sup>. 이와 같은 연구결과들은 백두옹에 내재하는 물질들이 염증반응에 상당히 관여할 가능성을 시사해준다. 현재까지 한의학계에 보고된 백두옹에 대한 연구로는 지질다당류(lipo-

polysaccharide, LPS)로 활성화된 복강 대식세포에서 백두옹 물 추출물의 항염증 효과<sup>26)</sup>, 백두옹 분획층의 항산화 효과<sup>27)</sup>, 백두옹의 주요성분인 triterpenoid saponin이 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제하는 효과를 관찰한 Wei 등<sup>28)</sup>의 연구 등 여러 연구가 있으나 LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 백두옹 메탄올 추출물의 항염증 효과에 대한 연구는 아직 진행되지 않았다. 자초의 항염증 효과에 대한 연구<sup>17)</sup>에서 물 추출 방식과 메탄올 추출 방식에 따른 차이를 보고하였는데 TNF- $\alpha$ 는 물 추출물에서 더 억제가 잘 되었고, IL-1 $\beta$  및 IL-6의 경우에는 메탄올 추출물에서 보다 잘 억제되었다. 따라서 본 연구는 비만시에 체내 염증반응을 제어하고, 비만으로 인해 유발될 수 있는 여러 질환들의 치료와 예방에 도움을 줄 수 있는 기초 약물의 개발을 위해 LPS를 처리한 Raw 264.7 세포에서 백두옹 메탄올 추출물이 전염증성 사이토카인과 산화 질소(nitric oxide, NO) 등의 염증매개물질들의 생산에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 백두옹 메탄올 추출물

본 실험에 사용된 약재는 백두옹으로 상지대학교 한의과대학 한방재활의학교실에서 지역 약업사(천일약업사, Wonju, Korea)를 통해 구입하였다. 백두옹 500 g (건조중량)을 5시간씩 3회 추출하고, 여과, 감압 농축하여 MeOH extracts, 105 g을 만들었으며, 수득률은 21%였다.

### 2. RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 세포는 한국 세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium에 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시험과정의 모든 cells는 80%~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

### 3. 지질다당류(lipopolysaccharide) 처리 및 시료 채취

LPS 처리는 dish에 cells를 분주하고( $1 \times 10^6$ /ml), 백두옹

메탄올 추출물을 각 처리별 농도(0 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml)로 처리한 후 1시간이 경과하였을 때 1 µg/ml 수준에서 medium에 처리하였다. 백두옹 메탄올 추출물 및 LPS를 처리하지 않은 cell을 대조군으로 하였으며 시료채취는 LPS 처리 후 6시간째에 시행하였다.

#### 4. 세포생존력

백두옹 메탄올 추출물의 세포독성 정도를 알아보기 위해 각 처리별 세포배양군을 24시간 동안 배양한 후, MTT solution을 처리, 다시 4시간 배양한 후 ELISA microplate reader (MCC/340; Titertek Instruments, Huntsville, AL, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 백분율로 세포생존율을 산정했다.

#### 5. 산화 질소(nitric oxide) 측정

NO 측정은 세포배양액과 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)을 1:1 (50 µl:50 µl)로 혼합, 10분간 반응 후, ELISA microplate reader (MCC/340; Titertek Instruments)로 540 nm에서 측정했다.

#### 6. 프로스타글란딘(prostaglandin E2) 측정

프로스타글란딘(prostaglandin E2, PGE2)은 assay design kit (Amersham Pharmacia Biotech Co., Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 형태로 측정했다.

#### 7. 사이토카인(cytokines) 정량

배양액을 4°C, 15,000 rpm, 15분간 원심분리한 후, 상층부를 0.45 µm 필터로 여과하고, 다시 원심분리해서 상층부를 -80°C에 냉동 보관하였다. 사이토카인(IL-1β, TNF-α, IL-6 및 IL-10) 정량은 시판 kit (Biosource International, Camarillo, CA, USA)를 이용했으며, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF-α의 최저 측정농도는 0.7 pg/ml였고, 다른 사이토카인들은 3~8 pg/ml였다.

## 결 과

### 1. 백두옹 메탄올 추출물의 세포독성

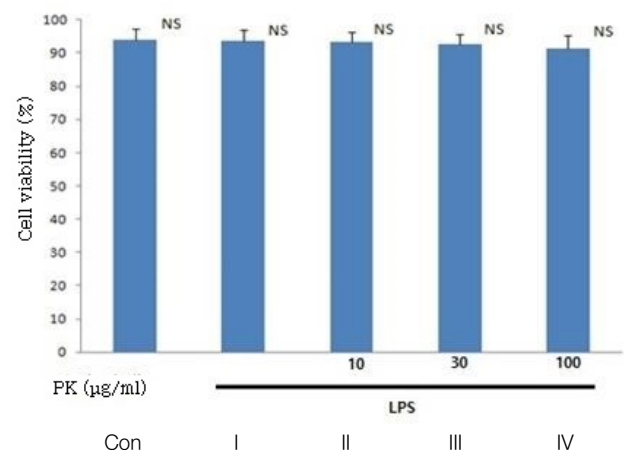
백두옹 메탄올 추출물이 세포생존율에 미치는 영향을 살펴 보았다. 대조군과 LPS 및 백두옹 메탄올 추출물 첨가군(0 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml)에 대해 24시간 세포배양 시험을 한 결과 처리군 모두가 생존율 90% 이상으로 처리군들 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1).

### 2. 산화 질소(nitric oxide) 생산량

각 처리군별 NO의 생산량을 나타냈다. 대조군과 비교하여 LPS 처리군 모두에서 NO의 생산량이 증가했다. 백두옹 메탄올 추출물 처리량이 증가함에 따라 NO 생산량이 감소하였지만 100 µg/ml 백두옹 메탄올 추출물 처리군은 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

### 3. 프로스타글란딘(prostaglandin E2) 생산량

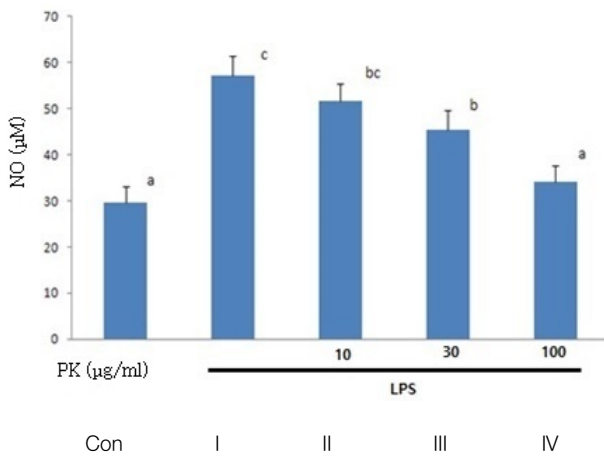
각 처리군별 PGE2의 생산량을 나타냈다. LPS 처리군 모두에서 PGE2의 생산량이 대조군보다 유의하게 높은 값을 나타내었다. LPS 처리군 간에서는 백두옹 처리군 모두가 낮은 값을 나타내었으며 백두옹 메탄올 추출물 처리량이 증가함에 따라 PGE2가 점진적으로 감소했다(Fig. 3).



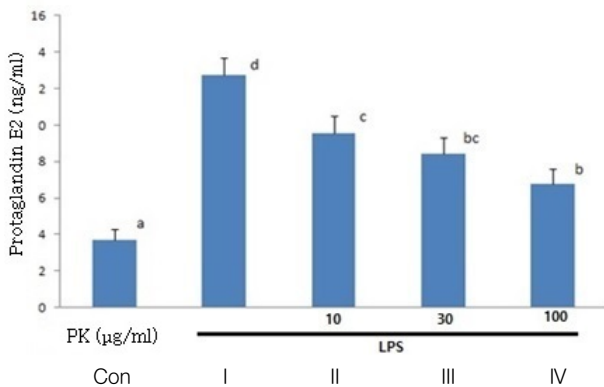
**Fig. 1.** Effects of *Pulsatilla koreana* (PK) extracts on cytotoxicity in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. NS: not significantly different ( $P > 0.05$ ), Con: control, I: LPS (1 µg/ml), II: LPS (1 µg/ml)+10 µg/ml PK extracts, III: LPS (1 µg/ml)+30 µg/ml PK extracts, IV: LPS (1 µg/ml)+100 µg/ml PK extracts.

#### 4. Interleukin-1 $\beta$ 의 생산량

각 처리군별 IL-1 $\beta$ 의 생산량을 나타내었다. IL-1 $\beta$ 의 생산량은 대조군보다 LPS 처리군 모두에서 유의하게 높은 값을 나타내었다. LPS 처리군들 간에서는 백두옹 메탄을 추출물의 처리량이 증가함에 따라 IL-1 $\beta$ 가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 4).



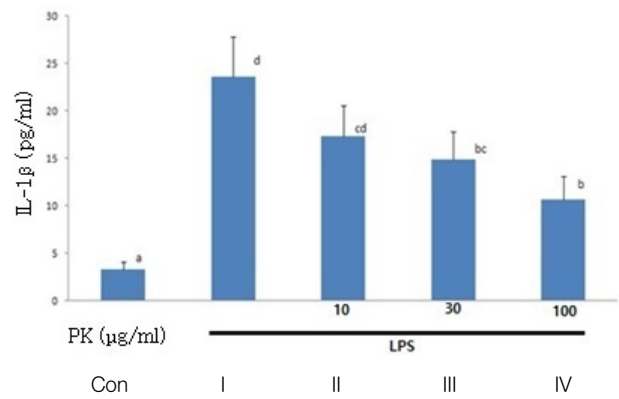
**Fig. 2.** Effects of *Pulsatilla koreana* (PK) extracts on the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. a, b, c: means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). Con: control, I: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), II: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+10  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, III: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+30  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, IV: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+100  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts.



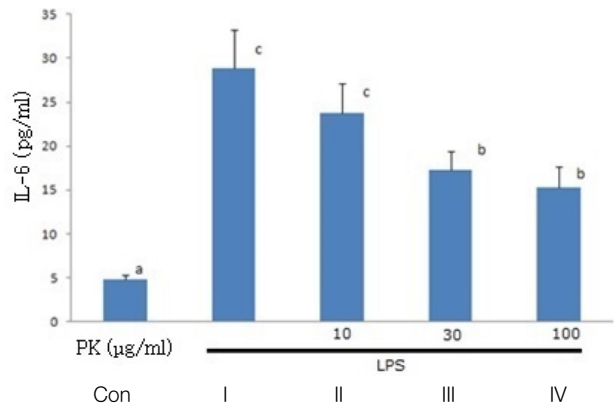
**Fig. 3.** Effects of *Pulsatilla koreana* (PK) extracts on the production of prostaglandin E2 in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. a, b, c, d: means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). Con: control, I: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), II: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+10  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, III: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+30  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, IV: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+100  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts.

#### 5. Interleukin-6의 생산량

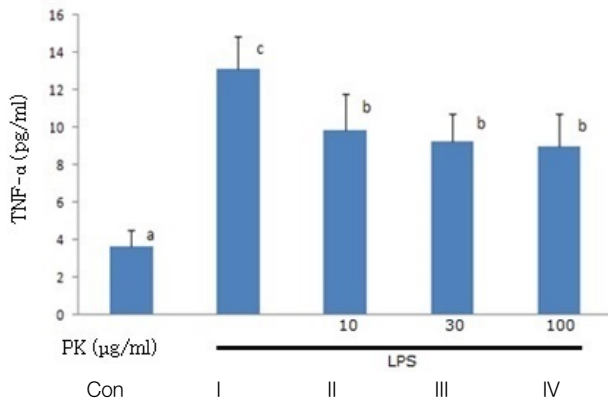
각 처리군별 IL-6의 생산량을 나타내었다. LPS 처리군 모두가 대조군보다 유의하게 높은 값을 나타내었다. LPS 처리군들 간에서는 백두옹 메탄을 추출물 처리군 모두가 LPS 단일 처리군보다 낮은 값을 나타내었다. 그러나 백두옹 메탄을 추출물 10  $\mu\text{g/ml}$  처리군은 LPS 단일 처리군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 5).



**Fig. 4.** Effects of *Pulsatilla koreana* (PK) extracts on the production of interleukin (IL)-1 $\beta$  in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. a, b, c, d: means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). Con: control, I: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), II: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+10  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, III: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+30  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, IV: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+100  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts.



**Fig. 5.** Effects of *Pulsatilla koreana* (PK) extracts on the production of interleukin (IL)-6 in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. a, b, c: means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). Con: control, I: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), II: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+10  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, III: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+30  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, IV: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+100  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts.



**Fig. 6.** Effects of *Pulsatilla koreana* (PK) extracts on the production of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. a, b, c; means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). Con: control, I: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), II: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+10  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, III: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+30  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, IV: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+100  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts.

## 6. 종양괴사인자 $\alpha$ (tumor necrosis factor)- $\alpha$ 의 생산량

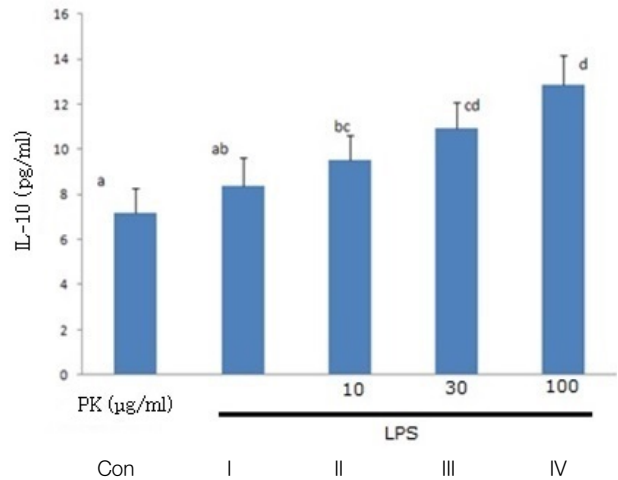
각 처리군별 TNF- $\alpha$ 의 생산량을 나타내었다. 대조군과 비교하여 LPS 처리군 모두가 유의하게 높은 값을 나타내었다. LPS 처리군들 간에서는 백두옹 처리군들이 LPS 단일 처리군보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 그러나 백두옹 처리군들 간에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 6).

## 7. Interleukin-10의 생산량

각 처리군별 IL-10의 생산량을 나타내었다. 대조군과 비교하여 LPS 처리군들이 높은 값을 나타내었다. 그러나 LPS 단일 처리군은 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. LPS 처리군들 간에서는 백두옹 메탄올 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 IL-10이 증가하는 경향을 보였으나 백두옹 메탄올 추출물 10  $\mu\text{g/ml}$  처리군은 LPS 단일 처리군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 7).

## 고찰

비만은 체내에 지방이 과잉 축적된 상태로 정의할 수 있으며 그 원인으로는 식사습관, 활동부족, 유전, 호르몬 요인, 심리적 요인 등이 복합적으로 관련되어 있다<sup>29)</sup>. 비만이 단지 외모의 문제가 아니라 고혈압, 당뇨, 고지혈증 등 대사 증후군을 초래할 수 있다<sup>30)</sup>는 인식은 널리 퍼져있으나 비만이 염증성 질환의 또 다른 원인이 될 수 있다는 점은 간과되



**Fig. 7.** Effects of *Pulsatilla koreana* (PK) extracts on the production of interleukin (IL)-10 in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. a, b, c, d; means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). Con: control, I: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), II: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+10  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, III: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+30  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts, IV: LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )+100  $\mu\text{g/ml}$  PK extracts.

고 있다. 비만한 경우 adipose tissue, liver, pancreas, skeletal muscle, hypothalamus와 같은 여러 조직에서 염증 매개인자의 생성이 증가되고, 염증반응이 활성화된다. Adiponectin, resistin, visfatin, leptin과 같은 adipokines이 부적절하게 생산되면 단핵구가 이동하고, 대식세포로 분화하게 되어 만성 염증을 일으키는 대사 장애의 중요 원인이 된다. 특히 adiponectin은 염증, 인슐린 저항성, 심혈관계 질환과 연관성이 높다. 전염증성 사이토카인과 별도로 또 다른 기전으로 제시되는 것이 ghrelin이라는 호르몬이다. Ghrelin은 소화기관과 시상하부에서 분비되는 호르몬으로 에너지 부족을 감지하는 센서의 역할을 하며, 비만 시에는 분비가 감소되고 칼로리를 제한하면 증가하게 된다. Ghrelin은 전염증성 사이토카인을 감소시키기 때문에 항염증 효과가 있다. 따라서 과도한 지방의 축적은 만성적으로 에너지 과잉의 신호를 보내기 때문에 Ghrelin의 분비를 감소시키고 leptin의 분비를 증가시킨다<sup>31)</sup>. 이처럼 생체 내에 과잉으로 축적된 지방조직은 염증성 매개물질들 및 염증에 관여하는 사이토카인들을 생산하는 동시에 호르몬의 불균형을 야기시켜서 비만으로 인한 각종 질환들에 직접적으로 영향을 준다<sup>32-34)</sup>. 따라서 비만으로 인한 염증성 질환들을 예방하고 치료효과를 높이기 위해서는 염증 매개물질들의 생산을 제어하는 것이 중요하다.

항염증 효과에 대한 단미제 연구로는 청피, 인진호, 자초, 흰민들레, 미후등, 마치현, 대황 등이 있다. 청피에 대한 연구<sup>35)</sup>는 신경세포에서 항염증 작용을 나타내는지 확인하기 위하여 PC12 cell에 4-HNE를 처리하여 염증반응을 유도한 후 염증신호 전달 분자인 JNK와 전사인자인 NF- $\kappa$ B 인산화 단백질 발현을 관찰한 연구로 유의성 있는 결과를 나타내었다. PC12 세포는 신경세포의 특성을 갖고 있어 세포 사멸과 항산화 효능 실험에 사용되는 것이 일반적이지만, 과산화와 염증은 밀접한 관계가 있기 때문에 PC12 세포로도 염증인자를 볼 수 있다. Seo 등<sup>36)</sup>의 연구는 인진호가 급만성 간염, 황달, 지방간 등 간기능 개선 효과가 있는 점에 착안해서 혈액 및 간장의 전염증성 사이토카인들을 조사한 연구로 혈액 내 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도는 대조군에 비해 낮은 결과를 보였고, 간장 사이토카인을 분석한 결과에서는 IL-1 $\beta$  및 IL-6 농도는 실험군이 대조군보다 낮은 경향을 보였으나 TNF- $\alpha$ , IL-10의 농도에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 자초는 아토피 피부염, 항알러지 효과, 간손상에 대한 보호 효과 등이 알려져 있으며, Choi 등<sup>17)</sup>의 연구에서는 NO, PGE2 전염증성 사이토카인을 살펴보고, 기전에 대한 연구로 matogen-activated protein kinases (MAPKs)과 NF- $\kappa$ B의 활성화를 조사하였다. 특이할 만한 점은 물 추출 방식과 에탄올 추출 방식에 따라 차이가 있었는데 TNF- $\alpha$ 는 물 추출물에서 더 억제 효과가 잘 되었고, IL-1 $\beta$  및 IL-6의 경우에는 메탄올 추출물에서 보다 잘 억제되었다. 작용 기전은 p38, JNK의 인산화를 억제하고 NF- $\kappa$ B의 활성 억제를 통해 NO와 전염증성 사이토카인의 생산을 억제함을 확인할 수 있었다. 이와 유사한 모델로 연구한 흰민들레 추출물의 경우 NO, IL-1 $\beta$ , IL-6의 생산을 억제하였으며, MAPKs 중 p38, JNK, ERK1/2의 인산화와 NF- $\kappa$ B의 활성억제를 통해 작용함을 밝혀냈다<sup>18)</sup>. 미후등 약침 개발을 위한 연구도 있었는데, 미후등 약침추출물은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 생산을 억제하였고, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 유전자 발현과 PGE2, NO의 생산을 억제하여 새로운 항염증제 약침추출물로서 가능성을 인정 받았다<sup>15)</sup>. 마치현 70% 에탄올 추출물은 RAW 264.7 세포에 작용하여 NO의 생성, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 생산을 억제하였으며, MAPKs 중 ERK1/2, JNK의 인산화와 I $\kappa$ -B $\alpha$ 의 분해를 억제하여 항염

증 효과를 나타낸다고 하였다<sup>16)</sup>. 유사한 연구모델로 LPS shock을 준 RAW 264.7 세포에 대황추출물을 투여한 결과 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생산을 억제하여 대황에도 항염증 효과가 있음을 보고하였다<sup>37)</sup>.

백두옹은 미나리제재과에 속하는 다년초 초본식물로서 우리나라 전 지역에 분포하고 있으며 중국 동부부에도 자생하고 있다. 치통, 해열 및 수종 등에 효과가 있고, 항균, 소염, 지혈, 이질, 항암 등에도 이용되어 왔다<sup>38-40)</sup>. 백두옹의 성분 중 saponin은 소염작용이 있는데 가수분해되어 triterpene형의 genin과 glucose 등으로 전환되는 것으로 알려졌다<sup>41,42)</sup>. 백두옹의 항염증 효과에 대한 선행 연구로 Park과 Song<sup>26)</sup>의 연구와 Wei 등<sup>28)</sup>의 연구가 있는데, Park과 Song<sup>26)</sup>의 연구는 백두옹 물 추출물의 항염증 효과에 대한 것으로 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12를 평가지표로 사용하였다. 본 연구는 백두옹을 메탄올로 추출한 것으로 NO, PGE2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10을 평가지표로 사용하였는데, 자초를 메탄올로 추출했을 때와 물로 추출했을 때 효과 차이가 있었던 Choi 등<sup>17)</sup>의 연구를 감안했을 때 연구의 차별점이 있다고 볼 수 있다. Wei 등<sup>28)</sup>의 연구는 대식세포에서 백두옹의 주요성분인 triterpenoid saponin이 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제하는 효과를 연구한 것으로, 특히 어떤 분자구조에서 더 효과적인지 확인하였다. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)을 살펴본 결과 특히 compound 19와 20에서 TNF- $\alpha$ 의 분비 억제가 효과적이었음을 밝혔다<sup>28)</sup>.

따라서 본 연구는 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 백두옹 메탄올 추출물이 염증성 매개물질들 및 전염증성 사이토카인의 생산에 미치는 영향을 검토함으로써 새로운 비만 치료제의 개발을 위한 토대를 마련하고자 하였다.

백두옹 메탄올 추출물의 세포독성시험에서 백두옹 추출물 처리군 모두가 세포생존율 90% 이상의 값을 보였으며, 처리군들 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 백두옹 추출물이 세포배양실험에 특별한 독성현상을 나타내지 않는다는 것을 시사한다.

생체 내 염증반응은 염증매개물질들의 작용에서 시작되며, 많은 양의 염증유도 사이토카인(pro-inflammatory cytokines), NO 및 PGE2가 iNOS와 COX-2에 의해 생성된다<sup>43)</sup>. 이와 같은 염증매개물질들의 생산은 염증반응의 강도와 지속성에 직접적으로 영향을 준다. 본 연구에서 대조

군과 비교하여 LPS 처리군 모두에서 NO 및 PGE2의 생산량이 증가했으나 백두옹 메탄올 추출물 처리량이 증가함에 따라 NO 및 PGE2 생산량이 감소하였다. 이러한 결과는 백두옹 메탄올 추출물에 염증매개물질들의 생산을 억제하는데 영향을 줄 수 있는 물질들이 내재하고 있음을 시사한다.

IL-1 $\beta$ 는 친염증 또는 항염증성 사이토카인으로 TNF- $\alpha$ 와 함께 작용하며 감염이나 종양이 있을 때 나타나는 면역반응에서 염증성 사이토카인으로 작용한다. 또한 TNF- $\alpha$ 는 활성화된 대식세포에 의하여 주로 생성되며, 세균감염이나 악성종양 발생 시 숙주의 반응에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>44,45</sup>. IL-6는 염증유도 사이토카인으로서 내인성 발열인자(pyrogen)로 작용하며 면역 체계와 조혈 등에 다양한 영향을 미친다<sup>46</sup>. 이상의 3개 전 염증성 사이토카인들은 생체 내 염증반응의 지속성과 강도에 영향을 미친다. 본 연구에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생산량은 백두옹 메탄올 추출물의 처리량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 전술한 NO 및 PGE2의 결과에 잘 부합되며, 백두옹 메탄올 추출물에 면역반응에 영향을 줄 수 있는 항염증 기능성 물질들이 내재하고 있음을 인지시켜 준다.

IL-10은 macrophages, Kupffer cells, T와 B lymphocytes 및 hepatocytes 등에서 생산되는 사이토카인으로<sup>47</sup>, T-cell의 활성화를 유도하여 점막을 보호하고, 활성화된 대식세포나 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6, IL-8의 합성을 억제한다고 알려져 있다<sup>48,49</sup>. 본 연구에서 백두옹 메탄올 추출물 처리군에서 IL-10의 생산량이 증가하는 경향을 보여 이와 같은 결과가 NO, PGE2 및 전염증성 사이토카인의 생산에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

이상의 여러 결과들을 종합해보면 백두옹 메탄올 추출물에는 염증반응을 제어하는 데 영향을 줄 수 있는 기능성 물질들이 내재하고 있음을 시사해 주며, 비만 시에 염증매개물질 및 사이토카인의 생산을 제어하여 생체 내 염증반응에 긍정적인 효과를 줄 것으로 생각된다.

## 결론

RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 백두옹 메탄올 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었

다.

1. 백두옹 메탄올 추출물(~100  $\mu$ g/ml)은 대식세포에서 세포독성을 거의 나타내지 않았다.
2. 대조군과 비교하여 LPS 처리군 모두에서 NO 및 PGE2의 생산량이 증가했으나 백두옹 메탄올 추출물 처리량이 증가함에 따라 NO 및 PGE2 생산량이 감소하였다.
3. IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생산량은 백두옹 메탄올 추출물의 처리량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.
4. 백두옹 메탄올 추출물 처리군에서 IL-10의 생산량이 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과들을 종합해보면 백두옹 메탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에 작용하여 NO, PGE2, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생산을 억제하였으며, IL-10의 생산을 촉진함으로써 생체 내 염증반응에 긍정적인 효과를 준 것으로 생각된다. 따라서 백두옹 메탄올 추출물이 항염증 치료에 응용될 수 있다고 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 2016년도 상지대학교 교내연구비 2차 지원에 의해 이루어졌음.

## References

1. Abbas A, Lichtman A, Palle S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Milton : Elsevier Saunders. 2007 : 355.
2. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy of immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 1993 ; 119(12) : 1198-208.
3. Kim TH, Yang KS, Hwang EZ, Park SB. Effect of *Ehedeae herba* on the immune response in mice. *Korean J Pharmacogn.* 1991 ; 22(3) : 183-91.
4. Lee E. Anti-inflammatory effect of *Scutellariae Radix*. *Korean J Plant Res.* 2007 ; 20(6) : 548-52.
5. Nam JY, Lee HS, Lee SW, Chung MY, Yoo ES, Rho MC, et al. Effect of kikkanol F monoacetate and 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone isolated from *Chrysanthemum indicum* L. on IL-6 production. *Korean J Pharmacogn.* 2005 ; 36(3) : 186-90.
6. Ko IJ, Yoo SJ, Lee EB. Pharmacological studies on *Prunellae herba* and *Thesii herba*(I). *Korean J Pharmacogn.* 1986 ; 17(3) : 232-41.

7. Rabson A, Roitt IM, Delves PJ. Really essential medical immunology. 2nd ed. Oxford : Blackwell Publishing Ltd. 2005 : 1-14.
8. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 ; 259 : 87-91.
9. Park MH, Woo SY. Inflammation in obesity. *J Bacteriol Virol*. 2016 ; 46(4) : 343-8.
10. Moon JS, Kang BG, Choi SM, Ryu EK. A study of syndrome index differentiation in obesity. *J Korean Med Obes Res*. 2007 ; 7(1) : 55-70.
11. Kang KW, Moon JS, Kang BG, Kim BY, Choi SM, Shin MS. The comparison of pattern identification diagnosis according to symptom scale based on obesity pattern identification questionnaire. *J Korean Med Obes Res*. 2009 ; 9(1) : 37-44.
12. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Literature review of herbal medicines on treatment of obesity since 2000-mainly about Ephedra herba. *J Korean Med Obes Res*. 2007 ; 7(1) : 39-54.
13. Joh HG, Yang JM, Kim DI. Effects of the oral administration of Ephedra Sinica extract on suppression of body weight gains and the DNA chip expression of obese rats. *J Orient Obstet Gynecol*. 2007 ; 20(3) : 65-80.
14. Kim IK, Min SY, Kim JH. Effect of combination of total saponin of red ginseng and coisis semen for the prevention and treatment of obesity. *J Korean Orient Med*. 2009 ; 30(1) : 17-25.
15. Kim YJ, Song CH. Anti-inflammatory effect of Bower actinidia in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Korean J Acupunct*. 2013 ; 30(4) : 243-51.
16. Seo SW. The anti-inflammatory effect of Portulaca oleracea 70% EtOH extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *J Herbol*. 2015 ; 30(6) : 33-8.
17. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG. The anti-inflammatory effect of Lithospermum Erythrorhizon on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Korean J Herbol*. 2013 ; 28(2) : 67-73.
18. Kim MJ, Bae GS, Choi SB, Jo IJ, Kim DG, Shin JY. The anti-inflammatory effect of Taraxacum coreanum on lipopolysaccharide induced inflammatory response on RAW 264.7 cells. *Korean J Herbol*. 2014 ; 29(6) : 21-6.
19. Kim IH, Kim KH. Studies on the pharmacologically active substances of Pulsatilla Koreana. The isolation of hederagenin. *Korean J Phamacog*. 1971 ; 2(3) : 121-3.
20. Shimizu M, Shingyouchi KI, Morita N, Kizu H, Tomimori T. Triterpenoid saponins from Pulsatilla cernua Spreng. I *Chem Pharm Bull*. 1978 ; 26(6) : 1666-71.
21. Namba T. The Encyclopedia of Wakan-Yaku (traditional sino-japanese medicines with color pictures). Osaka : Hoikusha Publishing Company. 1993.
22. Akamatsu K. Wakan-Yaku. Tokyo : Yichiyaku Publ. Co. Ltd. 1980 : 462-3.
23. Yook CS. A Pictorial of Korean Plant Drugs. Seoul : Jinmyung Publ. Co. Ltd. 1981 : 132.
24. Wang YS. Pharmacology and application of Chinese material medica. Beijing : Peoples Medical Publ. House. 1983 : 330-4.
25. The Korea Association of Herbology. Herbology. Seoul : Younglimsa. 2005 : 255.
26. Park SJ, Song HJ. Anti-inflammatory effect of Pulsatilla koreana NAKAI in LPS-stimulated Murine peritoneal macrophage. *Korean J Herbol*. 2007 ; 22(1) : 111-7.
27. Cho HJ, Yun HJ, Yi HS, Park SD. Anti-oxidative effects of fractionated Pulsatilla koreana NAKAI extracts. *Korean J Herbol*. 2010 ; 25(2) : 99-106.
28. Wei Li, Ding Y, Sun YN, Yan XT, Yang SY, Choi CW. Triterpenoid saponins of Pulsatilla koreana root have inhibition effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Chem Pharm Bull*. 2013 ; 61(4) : 471-6.
29. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korea rehabilitation medicine. 2nd ed. Seoul : Koonja. 2005 : 349, 357-9, 393-6.
30. Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University. Internal medicine. Seoul : Koonja. 1996 : 852-62.
31. Hirabara SM, Gorjao R, Vinolo MA, Rodrigus AC, Nachbar RT, Curi R. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J Biomed Biotechnol*. 2012 : 1-16.
32. Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*. 2001 ; 17(11-12) : 953-66.
33. Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2000 ; 149(1) : 139-50.
34. Tsukui S, Kanda T, Nara M, Nishino M, Kondo T, Kobayashi I. Moderate-intensity regular exercise decreases serum tumor necrosis factor-alpha and HbA1c levels in healthy women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 ; 24(9) : 1207-11.
35. Ye YJ, Kim YS, Kang MS. Effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium on 4-hydroxynonenal-induced inflammation in PC12 cells. *J Korean Med Obes*. 2016 ; 16(2) : 79-84.
36. Seo YS, Lee E, Cha YY. Anti-inflammatory effect of Artemisia Capillaris Thunberg in lipopolysaccharide-exposed rats. *J Orient Rehab Med*. 2010 ; 20(3) : 27-35.
37. Jeun DJ, Cha YY, Lee E. Inflammatory effect of Rheum undulatum L. *J Orient Rehab Med*. 2011 ; 21(1) : 35-46.
38. Chang HM, But PPH. Pharmacology and applications of Chinese materia medica. Singapore : World scientific. 1987 :



- 226.
39. Wang YS. Chinese herbal drug pharmacology and application. Beijing : People's Medical Publishing House. 1983 : 330-7.
40. Shanghai Science and Technology. Chinese materia medica dictionary. 3rd ed. Tokyo : sohakkwan Ltd. 1985 : 2084-87.
41. Jeong HJ, Kim KW, Kim HD. Isolation of herbicidal compounds from Pulsatilla koreana Roots. Korean J Plant Res. 1996 ; 9(1) : 47-57.
42. Matin ML, Moran A, Roman L. Pharmacologic screening of Pulsatilla alpina subsp. J Ethnopharmacol. 1987 ; 21(2) : 201-6.
43. Posadas I, Terencio MC, Guillen I, Ferrandiz ML, Coloma J, Paya M, et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2000 ; 361(1) : 98-106.
44. Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. Ann N Y Acad Sci. 1990 ; 587(1) : 325-31.
45. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. Crit Care Med. 1993 ; 21(10) : 423-35.
46. Snick J. IL-6: an overview. Annu Rev Immunol. 1990 ; 8(1) : 253-78.
47. Louis H, Moine O, Peny M, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, et al. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. Hepatology. 1997 ; 25(6) : 1382-9.
48. Simpson, KJ, Lukacs NW, Colletti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. J Hepatol. 1997 ; 27(6) : 1120-32.
49. Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, et al. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. Hepatology. 1988 ; 28(6) : 1518-24.