

참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물의 RAW 264.7 대식세포에서 IL-1 β , TNF- α , iNOS 유전자 차등 발현 연구

한효상, 홍성균
남부대학교 통합의학과

Investigation of the IL-1 β , TNF- α and iNOS gene differential expression in Raw 264.7 cells by the water extract of Angelicae Radix from Korea, China and Japan

Hyo-Sang Han, Seong-Gyun Hong

Department of Integrative Medicine, Graduate school Nambu University

요 약 Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 대식세포에 참당귀(AG), 중국당귀(AS), 일당귀(AA)를 6시간과 24시간을 반응시킨 뒤 시간별로 나타나는 inflammation 반응을 확인하고자 하였다. LPS-induced RAW 264.7 대식세포에 AG, AS, AA를 6시간 반응 시킨 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현량을 증가시켰고, AA에서 더 높은 Anti-inflammatory effect를 확인하였다. AG, AS, AA가 RAW 264.7 대식세포의 cell viability에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTS Assay(24시간)를 수행한 결과 1,600 μ g/ml 농도에서 모두 증가시켰다. AG, AS, AA가 LPS를 처리하지 않은 RAW 264.7 대식세포에 6시간동안 면역반응에 미치는 영향을 확인한 결과 AG와 AA를 200 μ g/ml 농도로 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 발현이 증가되었다. 이 연구를 통해 AG, AS, AA는 RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하였을 때 inflammation 반응을 촉진하며, 24시간 뒤 inflammation의 억제를 유도한 결과를 얻을 수 있었다. 향후 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 대식세포의 다양한 염증 반응 메커니즘에 미치는 작용을 확인하는 연구가 필요하다.

주제어 : 참당귀, 중국당귀, 일당귀, 지질다당류, 염증

Abstract We tried to analyze the inflammation reactions by treatment of AG, AS and AA in murine RAW 264.7 cells. To investigate the effect of AG, AS and AA on cell viability of RAW 264.7 cells, AG, AS and AA were treated for 24 h and MTS assay was performed. Cell viabilities were increased in 1,600 μ g/ml concentration by AS, AA and AG treatments, respectively. The mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and iNOS were increased by AG and AA treatment at a concentration of 200 μ g/ml in RAW 264.7 cells without Lipopolysaccharide (LPS) treatment. The mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and iNOS were increased by AG and AA 6 h treatment at a concentration of 200 μ g/ml with LPS treatment. In this study, we observed that AG, AS and AA show various activities on inflammation reaction depend on their treatment time. In the future, studies should be conducted to investigate the effects of AG, AS and AA on the various inflammatory responses of macrophages.

Key Words : *Angelica gigas* Nakai, *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, *Angelica acutiloba* Kitagawa, Lipopolysaccharide (LPS), Inflammation

Received 22 September 2017, Revised 27 October 2017
Accepted 20 November 2017, Published 28 November 2017
Corresponding Author: Seong-Gyun Hong
(Department of Integrative Medicine, Nambu University)
Email: brain@nambu.ac.kr

© The Society of Digital Policy & Management. All rights reserved. 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.

ISSN: 1738-1916

1. 서론

최근 면역 매개물질인 사이토카인의 염증 및 면역 반응 조절기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 등과 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다[1,2].

염증은 국소 부위에 부종, 발적화 그리고 통증을 동반한 수반의 추적을 의미한다. 이러한 항염증효과는 국소 모세혈관의 지름을 증가시키고 동시에 혈류 속도의 감소, 혈관벽의 투과성 (permeability) 등을 증가시키는 것에서 온다[3]. 이런 현상은 상처와 같은 조직 손상 직후에 일어나는 변화로 조직 손상에 의하여 생체 내 국소부위에 유리되는 물질요인의 존재를 추정하게 하며, 염증의 반응을 증가하는 물질인 화학적 매개체로는 프로스타글란딘 (prostaglandin, PG), 산화질소 (nitric oxide, NO), 염증을 유발하는 여러 종류의 사이토카인 (cytokine) 등이 있다 [4].

LPS (Lipopolysaccharide; 리포 다당류)는 그람음성 박테리아에서 생기는 내독소 (endotoxin)의 일종으로 대식세포 등의 면역세포를 자극하여 각종의 염증성인자들의 생성증가를 유도하며[5], 면역세포 중 대식세포는 염증 촉발 물질에 급격한 생성증가를 유발하고[6], 과잉 배출된 염증매개인자들은 염증성질환 유발시켜 자가 면역질환 악화 등의 다양한 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다[7].

사이토카인 (cytokine)이란 인체 내 핵을 가진 모든 세포에서 생산될 수 있는 조절 단백 물질이며, 숙주 방어와 손상 치유 과정에 관여하는 세포들과 조혈 세포에 사이토카인 (cytokine)이 작용하여 면역 반응 및 조혈작용을 조절하는 인자들을 말한다. 현재 사이토카인 (cytokine)은 인터루킨 (interleukin)계 35종, 케모카인 (chemokine)계 48종의 두 그룹으로 나누어지는 인터페론 (interferon)계, 집락자극인자 (colony stimulating factor)계, 성장인자 (growth factor)계 및 종양괴사인자 (Tumor necrosis factor, TNF)계 등의 단백질질 200여종 이상이 사이토카인 (cytokine)에 속하게 된다[8].

한의학에서 많이 사용되고 있는 참당귀, 중국당귀, 일당귀 또한 염증질환치료에도 많이 응용되고 있으므로[9], 대식세포에서 분비되는 염증매개인자들에 대한 참당귀,

중국당귀, 일당귀의 염증 억제 반응을 충분히 검토할 필요가 있다고 사료된다.

당귀는 『신농본초경』 [10] ‘중품’에 “맛은 달고 기는 따뜻하다. 기침과 상기를 치료한다. 온성학질로 생긴 한열과 피부 속이 오싹오싹한 증상을 치료한다. 여성 자궁출혈과 불임증을 치료한다. 여러 가지 악창과 외상이 있을 때 달여서 마신다.”라고 처음 수재 되었으며, 月經不調(생리불순), 經閉腹痛(생리통), 癥瘕結聚(뱃속에 멍울이 모여 맺힌것), 崩漏(자궁출혈), 血虛頭痛(혈허두통), 眩暈(어지러움), 痿痺(저리거나 아픈 것), 腸燥便難(건조한 변비), 癰疽瘡瘍(종기피부병), 跌打損傷을 치료하는 補血和血(피를 보하고 조화시킴), 調經止痛(생리를 조리하여 진통시킴), 潤燥滑腸(장을 습윤케 함)의 효능이 있다[11].

當歸는(Angelicae Gigantis Radix)의 기원식물은 현재 한국, 중국, 일본 3국에서 사용하는 기원식물이 각각 달라 자국의 약전에 규정하고 있는 실정이며 당귀의 기원에 따른 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다[11]. 참당귀는 2~3년생의 초본이며 1~2 m 정도로 곧게 자라고 꽃은 복산화화서이며 적자색으로 핀다. 중국당귀는 다년생 초본이고 40~100 cm로 자라며 꽃은 복산화화서로 소화병이 12~36개 정도이고 백색으로 꽃이 핀다. 일당귀는 다년생 초본이고 40~90 cm 내외로 자라며 꽃은 복산화화서이며 백색이다[12,13]. 당귀로 사용하는 약재는 기원식물이 다르기 때문에 유용성분에도 차이가 있는데 참당귀의 주요성분은 coumarin 계열인 decursin과 decursinol angelate이며 중국당귀와 일당귀의 주요한 성분은 butylphthalide, phthalic anhydride 등이다[14].

약리작용으로는 항산화활성[15,16], 한중일 당귀의 생육특성이나 감별법에 대한 연구[17,18], 활성성분에 대한 연구[19,20], 혈관이나 혈액에 미치는 영향[21,22] 등이 보고되었다.

여러 한약재들에 관한 실험 연구들은 여러 학자들에 의해 진행되어 왔다[23,24,25,26,27]. 또한 참당귀, 중국당귀, 일당귀는 염증 억제 반응의 기능이 알려져 있지만 [28,29] 이에 대한 작용 메커니즘은 밝혀지지 않았다. 이에 저자는 한의학에서 많이 사용되는 있는 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 세포활성도에 미치는 영향을 확인하고 참당귀, 중국당귀, 일당귀를 열수 추출하여 얻은 시료를 대상으로 LPS를

처리한 RAW 264.7 대식세포에 6 시간과 24 시간 반응시켰을 때 염증 반응에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

2.1.1 약제

실험에 사용된 참당귀, 중국당귀, 일본당귀는 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2016년 9월에 구입 (NO: 2016-0901, 2016-0902, 2016-0903)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약제는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2.1.2 시약 및 기기

본 실험을 위해서 filter paper (Advantec No.2, Japan) Dulbecco's modified Eagle medium (WELGENE, Korea), fetal bovine serum (WELGENE, Korea), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (WELGENE, Korea), DPBS (Corning, USA), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), LPS from Escherichia coli 0127:B8 (Sigma, USA), MTS solution (Promega, USA), Qubit RNA Assay Kit (molecular probes, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (GENET BIO, Korea) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 ultrasonic cleaner (Branson, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), CO₂ incubator (Thermo, USA), water bath (HAAKE, Germany), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA) 등이다.

2.2 방법

2.2.1 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물 제조
참당귀, 중국당귀, 일당귀 각각의 약재를 50 g으로 정

확하게 중량을 측정하고 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음, 추출액을 filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻어 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 참당귀 17 g, 수율 34%, 중국당귀 27.5 g, 수율 55%, 일당귀 14 g, 수율 28%였다.

2.2.2 세포 배양

실험에 사용된 세포는 RAW 264.7 대식세포(mouse로부터 유래된 cell line)이며 한국세포주은행에서 구매하였다. 세포 배양은 표준 세포 배양법인 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지해주었고, 10%(v/v) FBS와 1% antibiotic antimycotic을 첨가한 DMEM media에서 세포의 배양을 하였다.

2.2.3 세포 활성화도 평가

참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 RAW 264.7 대식세포에 미치는 세포활성도를 확인하기 위하여 MTS assay(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)를 수행하였다. RAW 264.7 대식세포를 96 well plate에 2,500 cells/well로 분주하고 24 시간 동안 배양한 뒤 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1,600 μ g/ml 농도로 첨가하고 다시 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 MTS 시약을 첨가하고 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 처리한 실험군을 시료를 처리하지 않은 대조군과 대조하여 세포의 생존율을 백분율로 확인하였다. 세포의 생존율은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

세포 활성화도(%) = (시료첨가군의 흡광도 - 시료의 흡광도 / 대조군의 흡광도) × 100

2.2.4 세포 수 측정

RAW 264.7 대식세포를 2 X 10⁵ cells/well로 6 well plate에 분주하고 24 시간 동안 배양한 후 자초를 1,600 μ g/ml 농도로 세포에 처리한 뒤 다시 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 trypsin-EDTA를 처리하여 single cell을 얻은 뒤 hemocytometer로 세포 수를 측정하였다.

2.2.5 Quantitative RT-PCR

RAW 264.7 대식세포를 1 X 10⁵ cells/well로 분주 후 6 well culture dish에 24 시간 배양하였다. 이후 LPS 1 μ g/ml, 참당귀, 중국당귀, 일본당귀 열수 추출물 200 μ g/ml를 세포에 처리한 뒤 6 시간, 24 시간 배양시켰다. 그 후 시료가 첨가된 배지를 제거하고 PBS를 이용해 한번 세척 후 RNA를 eCube Tissue RNA Mini Kit를 이용하여 추출하고 The Qubit 2.0 Fluorometer로 정량하였다. cDNA를 합성하기 위하여 RNA 1 μ g에 dNTP mix (10 mM) 1 μ l, Random Hexamer (100 pmol/ μ l) 1 μ l를 넣은 후 DEPC-treated water로 총 부피 10 μ l가 되도록 조정하였다. 65 $^{\circ}$ C에서 5 분간 반응시킨 후 바로 얼음에 냉각시킨 다음 M-MLV reverse transcriptase 1 μ l, 5X M-MLV RT reaction buffer 4 μ l, DEPC-treated water 4 μ l, RNase inhibitor 1 μ l를 추가적으로 첨가하였다. 혼합된 반응물을 10 분간 실온에서 방치한 뒤에 50 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켜 cDNA를 만들었다. 이후 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 이용해 교차하였다. 합성한 cDNA를 증류수로 1/5로 희석시킨 뒤 5 μ l를 nuclease free water 2 μ l, 2X Prime Q-mater Mix 10 μ l, 10 pmol/ μ l forward primer 1.5 μ l, 10 pmol/ μ l reverse primer 1.5 μ l 와 섞고 AriaMx를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다.

2.3 통계처리

대조군과 실험군의 평균 차이는 student's t-test로 분석하여 p-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과

3.1 RAW 264.7 대식세포의 증식에 미치는 영향

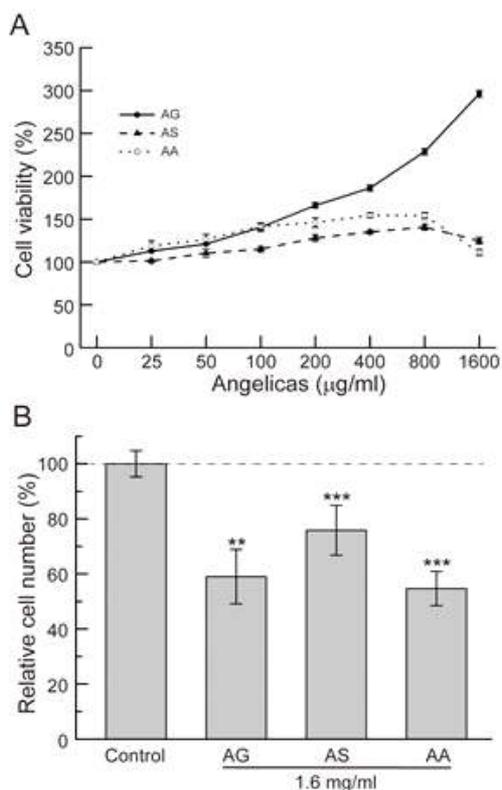
MTS는 세포내 미토콘드리아에서 생성되는 NADH, NADPH가 주된 reducing agent로 작용하여 반응한 뒤 formazan을 생성한다[25]. MTS assay는 MTS 용액을 세포에 처리한 뒤 생성되는 formazan을 흡광도를 측정하여 세포활성도를 확인하는 방법이다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 세포활성도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 농도별로 RAW 264.7 대식세포에 처리하고 24 시간 반응시킨 뒤 MTS assay를 수행하였다. 그 결과 중국당귀 열수 추출물의 1,600 μ g/ml 농도에서 세포활성도는 124% 까지 증가시켰고, 일당귀 열수 추출물은 111% 까지 증가시켰으며, 참당귀 열수 추출물은 296%로 매우 높게 증가시켰다. 이러한 세포활성도 증가와 세포 수 변화의 상관관계를 확인하기 위하여, RAW 264.7 대식세포에 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 1,600 μ g/ml 농도로 24 시간 처리한 후 세포 수를 측정된 결과, 참당귀, 일당귀 열수 추출물은 RAW 264.7 대식세포의 세포 수를 대조군 대비 60% 이하로 감소시켰으며, 중국당귀 열수 추출물 또한 76% 이하로 감소시켰다.

3.2 RAW 264.7 대식세포의 염증 반응에 미치는 영향

참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 LPS 처리 없이 RAW 264.7 대식세포에 처리하였을 때 면역 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포 독성을 보이지 않으며 세포활성도에 미치는 반응의 차이가 잘 드러나는

<Table 1> Primer sequences

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. ($^{\circ}$ C)
IL-1 β	F	AGG TCA AAG GTT TGG AAG CA	129	58
	R	TGA AGC AGC TAT GGC AAC TG		
TNF- α	F	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	103	58
	R	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC		
iNOS	F	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT	95	58
	R	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG		
GAPDH	F	CCA TGG AGA AGG CTG GGG	195	58
	R	CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC		



[Fig. 1] The effect of AG, AS, and AA on cell viability.

(A) RAW 264.7 cells were treated with indicated concentrations of AG, AS, and AA for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay.

(B) Cell numbers were determined by direct counting with a hemocytometer.

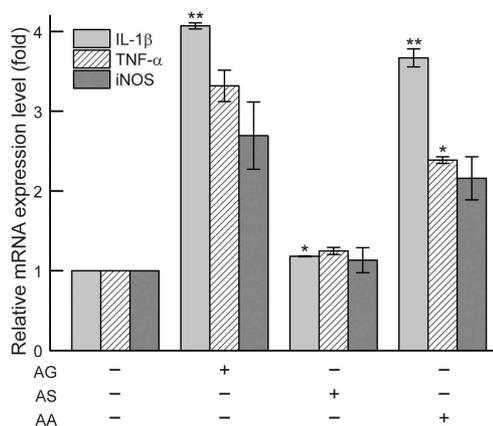
** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

200 µg/ml 농도로 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 RAW 264.7 대식세포에 6 시간 처리한 뒤 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 발현을 확인하였다. 그 결과 참당귀 열수 추출물과 일당귀 열수 추출물을 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 IL-1 β 발현을 유의미하게 증가시켰다. 반면 중국당귀 열수 추출물은 염증 반응에 큰 영향을 미치지 않았다.

3.3 LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포의

염증 반응에 미치는 영향

참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 LPS 처리를 통해 염증 반응이 유도된 RAW 264.7 대식세포에 미치는



[Fig. 2] The mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokine IL-1 β , TNF- α , and iNOS.

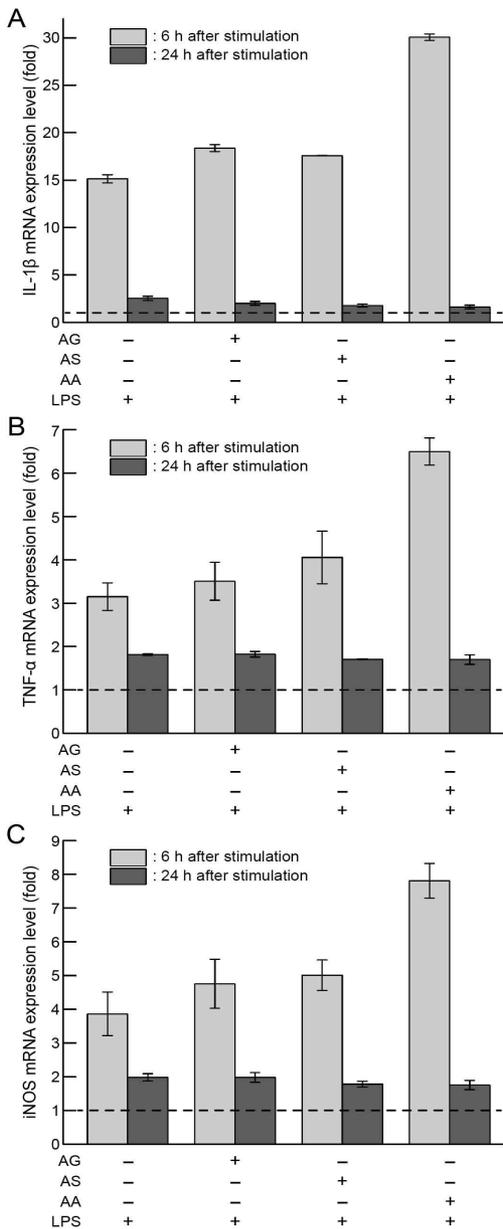
RAW 264.7 cells were treated with AG, AS, and AA (200 µg/ml) for 6 h. Total RNA was isolated and analyzed for mRNA expression with qRT-PCR.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

영향을 확인하기 위하여, 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 200 µg/ml 농도에서 LPS와 같이 RAW 264.7 대식세포에 6 시간, 24 시간 반응시킨 뒤 IL-1 β , TNF- α , iNOS mRNA 발현 변화를 qRT-PCR로 확인하였다. 6 시간 동안 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 각각 RAW 264.7 대식세포에 LPS와 같이 처리한 결과, LPS만 처리한 RAW 264.7 대식세포보다 IL-1 β , TNF- α , iNOS mRNA 발현이 높은 수치로 증가하였다. 이러한 영향은 일당귀 열수 추출물을 처리한 경우에서 가장 크게 나타났다. 반면 LPS를 유도시킨 RAW 264.7 대식세포에 24 시간 동안 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 200 µg/ml 농도로 반응시킨 결과 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현이 LPS만 처리한 RAW 264.7 대식세포에 대비하여 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

4. 고찰

현재 재배되어 한국, 중국, 일본에서 한약재로 사용하는 당귀는 현재 그 기원식물이 각각 다르다. *Angelica gigas* Nakai의 뿌리를 한국에서 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels의 뿌리를 중국에서 大和當歸 *Angelica acutiloba* Kitag의 뿌리를 일본에서 사용하고 있다. 자국



[Fig. 3] The effect of AG, AS, and AA on mRNA expression level of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , TNF- α , and iNOS genes. RAW 264.7 cells were treated with AG, AS, AA (200 μ g/ml) and LPS (1 μ g/ml) for 6 h and 24 h.

(A) The IL-1 β expression level.
 (B) The TNF- α expression level.
 (C) The iNOS expression level. Total RNA was isolated and analyzed for mRNA expression by qRT-PCR.

의 약전에 규정하고 있는 실정이며 당귀의 기원에 따른 화학조성 및 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다 [11].

당귀의 함유성분으로는 decursin, decursinol angelate 와 nodakentin, umbelliferon, β -sitosterol 등[30]으로 참당귀의 주성분은 decursin으로 주로 빈혈증, 월경불순, 월경곤란, 월경통, 기타 부인의 갱년기장애, 복통, 신체동통 등에 응용한다. 중국당귀의 주요성분은 butylidene phthalide, N-valerophenone-O-carboxylic acid 및 Δ 2,4-dihydrophthalic anhydride로 부인과 질환 중 월경불순이나 폐경에 특히 많이 쓰인다. 일본당귀 주요성분으로 ligustilide, butylidene phthalide, cnidilide, isocnidilide 등이 있으며 빈혈, 월경불순, 신체허약, 요슬냉통, 두통, 신체동통 등에 사용하고 있다[31].

당귀의 약리학적인 연구가 가장 활발하게 진행된 주제는 심혈관계, 중추신경계, 항암 작용 분야이며, 그 외에 항염증, 면역, 항산화, 항미생물, 간보호, 조혈, 상처회복 등의 분야에서도 지속적인 연구가 진행되어 왔다[32].

참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 세포활성도에 미치는 영향을 확인하기 위해 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 농도별로 RAW 264.7 대식세포에 처리하고 24 시간 뒤 MTS assay를 수행한 결과, 중국당귀 열수 추출물을 1,600 μ g/ml 농도로 한 세포활성도는 124% 까지 증가시켰고, 일당귀 열수 추출물은 111% 까지 증가시켰으며, 참당귀 열수 추출물은 296%로 매우 높게 증가시켰다[Fig. 1A]. MTS assay에 의해 측정되는 값은 주로 세포 내 NADP, NADPH 양에 의해 나타난다. MTS assay를 통해 확인된 세포활성도 증가는 세포증식이 촉진되어 세포 수가 증가한 경우에서 나타날 수 있으며 또한 세포 내 NADH, NADPH의 생성량이 증가한 경우에서 나타날 수 있다. 이러한 세포활성도 증가와 세포 수 변화의 상관관계를 확인하기 위하여, RAW 264.7 대식세포에 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 1,600 μ g/ml 농도로 24 시간 처리한 후 세포 수를 측정하였고 그 결과, 참당귀, 일당귀 열수 추출물은 RAW 264.7 대식세포의 세포 수를 대조군 대비 60% 이하로 감소시켰으며, 중국당귀 열수 추출물은 76% 이하로 감소시켰다[Fig. 1B]. 따라서 1,600 μ g/ml 농도에서 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물 모두 RAW 264.7 대식세포에 작용하여 NADH, NADPH의 생성을 촉진한 것으

로 생각된다. 대식세포에 염증 반응을 유도시킨 경우 박테리아에 대한 방어를 위해 ROS의 생성을 촉진하며, 이 ROS는 NADPH에 의해 생성된다. 이를 위해 대식세포는 TCA 회로에 의한 ATP 생성을 감소시키고, 5탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway, PPP)를 증가시키며 NADPH의 생성을 촉진시킨다[33]. 이러한 이유로 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물에 의한 RAW 264.7 대식세포의 세포활성도 증가는 염증 반응 촉진에 의해 나타났을 가능성이 있다.

RAW 264.7 대식세포에 LPS를 이용하여 6 시간 동안 염증 반응을 유도한 경우 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA의 발현이 높은 수치로 증가한다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 염증 반응을 촉진시킬 수 있는 가능성을 확인하기 위하여 pro-inflammatory 사이토카인 발현이 강하게 유도되는 시간인 6 시간 동안 200 μ g/ml 농도로 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 RAW 264.7 대식세포에 반응시킨 후, IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 200 μ g/ml 농도의 참당귀, 일당귀 열수 추출물을 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 발현이 증가되었으나 중국당귀 열수 추출물은 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 발현에 큰 영향을 미치지 않았다[Fig. 2].

LPS에 의해 염증 반응이 강하게 유도되어 있는 RAW 264.7 대식세포에 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 반응시킬 경우 나타나는 염증 작용을 확인하기 위하여, 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 200 μ g/ml 농도에 LPS와 같이 RAW 264.7 대식세포에 6 시간 반응시킨 뒤 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA의 발현을 확인하였다. 그 결과 LPS 자극 없이 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 처리한 결과와 같이, LPS를 단독으로 처리한 RAW 264.7 대식세포와 대비하여 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 LPS와 같이 처리할 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 발현을 촉진시키는 것으로 확인되었으며 이 효과는 일당귀 열수 추출물을 처리한 경우에서 가장 크게 나타났다[Fig. 3]. 하지만 기존에 보고되어 있는 연구 결과는 LPS가 유도된 RAW 264.7 대식세포에 20시간 참당귀, 중국당귀, 일당귀를 반응시킨 경우 염증 억제 반응이 나타났다[34]. 이러한 이유로 LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포에 200 μ g/ml 농도의 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 24 시간 반응시킨 뒤 IL-1 β ,

TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 6 시간 처리했을 때와 다르게 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물 모두 RAW 264.7 대식세포의 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향은 미비하였다[Fig. 3].

에스트로젠은 LPS로 처리한 RAW 264.7 대식세포의 염증 반응을 감소시키며, 이에 대한 작용메커니즘은 SOCS3, STAT3 신호를 조절하여 빠른 pro-inflammatory phase의 유도 그리고 inflammatory phase의 빠른 완화를 유도하여 나타난다[35]. 이와 같이 염증이 유발된 후 시간에 따른 염증 반응의 조절은 염증 억제 작용에 있어 중요한 요소로 작용할 수 있다.

참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물은 6 시간 처리에 의해 RAW 264.7 대식세포의 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 더욱 강하게 촉진하였으며, 그 후 24 시간 한 경우 LPS로 촉진시킨 IL-1 β , TNF- α , iNOS mRNA 발현에 큰 영향을 미치지 않았다[Fig. 3].

이를 통해 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물은 박테리아나 바이러스와 같은 외부 항원에 대한 대식세포의 pro-inflammation phase를 강하게 촉진시킴으로써 효율적인 방어를 유도한 뒤, 이후 정상적인 resolution phase를 유도시킬 가능성 확인하였다. 향후 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 대식세포의 다양한 염증 반응 매커니즘에 미치는 작용을 확인하는 연구가 진행되어야 하며, 박테리아 및 다양한 병원균에 대한 방어기작에 미치는 영향 또한 깊은 연구가 필요하다. 뿐만 아니라 LPS 자극 없이도 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물이 여러 pro-inflammation 사이토카인의 발현을 유도하였기 때문에 부작용 발생 가능성도 확인해야 할 것으로 사료된다.

5. 결론

본 연구에서 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 RAW 264.7 대식세포에 처리하여 세포활성도 및 염증 반응에 미치는 영향을 연구하였으며 이를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RAW 264.7 대식세포에 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 1,600 μ g/ml 농도로 24 시간 처리한

결과 세포활성도를 100% 이상 증가시켰으나, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 참당귀, 일당귀 열수 추출물을 RAW 264.7 대식세포에 처리한 경우 세포 수를 감소시켰다.

2. RAW 264.7 대식세포에 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 6 시간 처리한 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현이 증가하였다.
3. LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 대식세포에 6 시간 동안 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 mRNA 발현을 증가시켰으며 이 효과는 일당귀 열수 추출물에서 가장 높게 나타났다.

참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 LPS로 염증 반응이 유발된 RAW 264.7 대식세포에 6 시간 처리한 경우 더욱 강한 염증 반응을 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 추후 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수 추출물을 이용한 염증 조절 영향 연구에 매우 중요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- [1] Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M, "Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action." *Bioorg Med Chem*, Vol. 11, No. 9. pp. 1995-2000, 2003.
- [2] Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. "Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules." *Planta Med*, Vol. 70, No. 2. pp. 93-103, 2004.
- [3] Peter Parham, "Myeonyeokhak." p. 235, LifeScience, 2006.
- [4] Daehanbyeongrihakhoe, "Byeongrihak." pp. 71-104, Komoonsa, 1995.
- [5] Cohen J, "The immunopathogenesis of sepsis." *Nature*, Vol. 420, No. 6917. pp. 885-891, 2002.
- [6] Cho HY, Noh KH, Cho MK, Jang JH, Lee MO, Kim SH, Song YS, "Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of Genistein in BALB/c Mice Injected with LPS." *J Kor Soc Food Sci Nutr*, Vol. 37, No. 9. pp. 1126-1135, 2008.
- [7] An HJ, Jeong HJ, Um JY, Kim HM, Hong SH, "Glechoma hederacea inhibits inflammatory mediator release in IFN- γ and LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages." *J Ethnopharmacol*, Vol. 106, No. 3. pp. 418-424, 2006.
- [8] Kim HS, "The Cytokines : An Overview." *Yeungnam Univ J of Med*, Vol. 27, No. 1. pp. 1-7, 2010.
- [9] Kim SA, Oh HK, Kim JY, Hong JW, Cho SI. "A Review of Pharmacological Effects of Angelica gigas, Angelica sinensis, Angelica acutiloba and their Bioactive Compounds." *J Korean Oriental Med*, Vol. 32, No. 4. pp. 1-24, 2011.
- [10] Wu B. "Shennongbencaojing.", p.64, Renminweishengchubanshe, 1982.
- [11] Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY, "Boncho-Hak." pp. 629-631, Young-Lim Press, 2007.
- [12] Yuansezhongguobencaotujianbianjiweiyuanhui. "Yuansezhongguobencaotujian." p.263, Renminweishengchubanshe, 1982.
- [13] Lee WC. "Wonsaeghanguggijunsigmuldogam." pp. 252-253, Akademiseojeog, 1996.
- [14] Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Lim JP, Hong SH, "Hanbangyakrihak." pp. 337-343, Shinilbukseu, 2007.
- [15] Kang, SA, Han, JA, Jang, KH, Choue, RW, "DPPH Radical Scavenger Activity and Antioxidant Effects of Cham - Dang - Gui(Angelica gigas)." *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol. 33, No. 7. pp. 1112-1118, 2004.
- [16] Choo, MH, Choi, HS, Seo, YN, Lee, MY, "Effects of n-Hexane Fraction of Angelica acutiloba on Antioxidative System and Lipid peroxidation in Ethanol-Induced Hepatotoxicity of rats." *Korean Journal of Food P reservation*, Vol. 11, No. 3. pp. 364-372, 2004.

- [17] Yu, HS, Park, CH, Park, CG, Kim, YG, Park, HW, Seong, NS, "Growth Characteristics and Yield of the Three Species of Genus *Angelica*." *Korean J. Medicinal Crop Sci*, Vol. 12, No. 1. pp. 43-46, 2004.
- [18] Noh, BS, Oh, SY, Kim, SJ, "Pattern Analysis of Volatile Components for Domestic and Imported *Angelica gigas* Nakai Using GC Based on SAW Sensor." *Korean J Food Sci Technol*, Vol. 35, No. 1. pp. 144-148, 2003.
- [19] Cho, MG, Bang, JK, Chae, YA, "Comparison of Volatile Compounds in Plant Parts of *Angelica gigas* Nakai and *A. acutiloba* Kitagawa." *Korean J Medicinal Crop Sci*, Vol. 11, No. 5. pp. 352-357, 2003.
- [20] Sung, JS, Bang, KH, Park, CH, Park, CG, Yu, HS, Park, HW, Seong, NS, "Discrimination of *Angelicae Radix* Based on Anatomical Characters." *Korean J Medicinal Crop Sci*, Vol. 12, No. 1. pp. 67-72, 2004.
- [21] Kang, SA, Jang, KH, Lee, JE, Ahn, DK, Park, SK, "Differences of Hematopoietic Effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* Extract on Cyclophosphamide-induced Anemic Rats." *Korean J Food Sci Technol*, Vol. 35, No. 6. pp. 1204-1208, 2003.
- [22] Song, SH, Seo, BI, Kim, HG, Park, JH, "The Effects of *Angelicae Gigantis Radix*, *Angelicae Acutilobae Radix* and *Angelicae Sinensis Radix* Extract on Hydrocortisone Acetate-Induced Model of Blood Stasis." *Kor J Herbology*, Vol. 19, No. 1. pp. 13-21, 2004.
- [23] Lee YB, Bae SJ, Lee DK, Park SJ, Park JW, Kim BW, Whang SY, "The Effect of Mulberry Leaf Extract on Blood biochemical parameters in White Rats Exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)" *Journal of Digital Convergence*, Vol. 11, No. 1. pp. 299-308, 2013.
- [24] Kim J, "Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Platycodon grandiflorum* extracts" *Journal of Digital Convergence*, Vol. 12, No. 3. pp. 359-366, 2014.
- [25] Jang AY, Sueng YC, Ji JG, "The comparative study on physiological activity of White ginseng, Red ginseng and Black ginseng extract" *Journal of Digital Convergence*, Vol. 14, No. 5. pp. 459-471, 2016.
- [26] Kim MS, Park SH, Park HR, "Convergence Studies Vascular Relaxation and Safty Evaluation in *Viscum Coloratum*, *Chrysanthemum Morifolium*, *Citri Percarpium*, and *Ophiopogonis Radix* Mixture" *Journal of Digital Convergence*, Vol. 14, No. 9. pp. 479-484, 2016.
- [27] Park SH, Park BJ, Park HR, "Studies on Nutritional Analysis and Antioxidant activity of Oriental Medicines with Bloodstream Improvement" *Journal of Digital Convergence*, Vol. 14, No. 10. pp. 563-570, 2016.
- [28] Han, HS, "Anti-inflammatory Effect of *Angelicae Gigantis Radix* Water Extract on LPS-stimulated Mouse Macrophages." *J Herbology*, Vol. 28, No. 5. pp. 113-119, 2013.
- [29] Uto T, Tung NH, Taniyama R, Miyanowaki T, Morinaga O, Shoyama Y, "Anti-inflammatory Activity of Constituents Isolated from Aerial Part of *Angelica acutiloba* Kitagawa." *Phytother Res*, Vol. 29, No. 12. pp. 1956-1963, 2015.
- [30] Ahn, KS, Sim, WS, Kim, IH, "Decursin a cytotoxic agent and protein kinase c activator from the root of *angelica gigas*." *Planta Med*, Vol. 62, No. 1. pp. 7-9, 1995.
- [31] Kim, CM, Shin, MG, Lee, GS, Ahn DK, "Wanyeok Jungyakdaesajeon." pp. 1159-1168, Jeongdam, 1998.
- [32] Kim SA, Oh HK, Kim JY, Hong JW, Cho SI, "A Review of Pharmacological Effects of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and their Bioactive Compounds." *J Korean Oriental Med*, Vol. 32, No. 4. pp. 1-24, 2011.
- [33] Kelly B, O'Neill LA, "Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity." *Cell Research*, Vol. 25, No. 7. pp. 771-784, 2015.
- [34] Yoon TS, Cheon MS, Lee DY, Moon BC, Lee HW, Choo BK, Kim HK, "Effects of Root Extracts from

Angelica gigas and Angelica acutiloba on Inflammatory Mediators in Mouse Macrophages.” Journal of Applied Biological Chemistry, Vol. 50, No. 4. pp. 264-269, 2007.

- [35] Villa A, Rizzi N, Vegeto E, Ciana P, Maggi A, “Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells.” Sci Rep, Vol. 15, p. 15224, 2015.

한 효 상(Han, Hyo Sang)



- 2003년 2월 : 경원대학교 보건관리학과(보건학사)
- 2005년 2월 : 경원대학교 한의학과(한의학석사)
- 2017년 3월 ~ 현재 : 남부대학교 통합의학과 박사과정
- 관심분야 : 대체의학, 한의학
- E-Mail : langzhong@empas.com

홍 성 균(Hong, Seong Gyun)



- 1978년 2월 : 신구대학교 물리치료학과(물리치료학사)
- 2002년 2월 : 순천향대학교 보건학과(보건학석사)
- 2004년 2월 : 순천향대학교 보건학과(보건학박사)
- 2004년 3월 ~ 현재 : 남부대학교 대체의학과 교수
- 관심분야 : 대체의학, 의학
- E-Mail : brain@nambu.ac.kr