

# 자화지정 추출물이 LPS로 유발된 대식세포의 염증인자에 미치는 영향

한효상  
중부대학교 보건행정학과

## Effect of *Violae Herba* Water Extract on the Proinflammatory Factors of LPS-Induced Macrophages

Hyo-Sang Han

Department of Health Administration, Joongbu University

요 약 본 연구는 지질다당류에 의해 유도된 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 자화지정 추출물이 염증 매개체 생성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 자화지정 추출물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 세포 생존 능력에 미치는 영향을 조사 하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 또한, Bio-Plex 사이토카인 분석(cytokine assay)을 통하여 NO, 인터루킨 (IL)-1 $\beta$ , 종양 괴사 인자(TNF- $\alpha$ ) 및 IL-6와 같은 다양한 사이토카인(cytokine)의 농도에 의한 자화지정 추출물의 항염증 효과를 조사 하였다. 자화지정 추출물은 LPS로 유도 된 대식세포에서 NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-6의 농도를 25 $\mu$ g / mL 이상으로 유의하게 저해하였으며 세포 생존율에는 변화가 없었다. 이러한 결과는 자화지정 추출물이 LPS로 유도된 대식세포에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인(cytokine)의 억제와 관련된 항염증 효과를 갖는다는 것을 시사한다. 앞으로 자화지정을 이용한 염증질환에 관련된 치료제개발에 새로운 연구가 더 필요한 바이다.

주제어 : 자화지정, 사이토카인, 산화질소, 항염증효과, 대식세포

**Abstract** The purpose of this study was to investigate the effects of *Violae Herba* Water Extract (VH) on the proinflammatory factors of lipopolysaccharide (LPS)-induced on the production of inflammatory mediators in RAW 264.7 mouse macrophages cells. We examined effect of *Violae Herba* Water Extract on the cell viability of RAW 264.7 mouse macrophages cells. Futhermore, After 24 hours treatment we investigated anti-inflammatory effect of *Violae Herba* Water Extract by the production of Bio-Plex cytokine assay, concentrations of various cytokines such NO, interleukin(IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) and IL-6. The water extract of *Violae Herba* significantly inhibited the production of NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 at the concentration of 25, 50, 100 and 200  $\mu$ g/mL in the LPS-induced RAW 264.7 mouse macrophages cells with no changes in the cell viability of them. These results suggest that water extract of *Violae Herba* has anti-inflammatory effect related with its inhibition of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in the LPS-induced RAW 264.7 mouse macrophages cells. Further research is needed to develop therapeutic agents for inflammatory diseases using *Violae Herba*.

**Key Words** : *Violae Herba*, Cytokine, Nitric oxide, Anti-inflammatory effect, Macrophage

\*This paper was supported by Joongbu University Research & Development Fund in 2018.

(이 논문은 2018년도 중부대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.)

\*Corresponding Author : Hyo-Sang Han(hanhs@joongbu.ac.kr)

Received April 27, 2018

Revised May 31, 2018

Accepted July 20, 2018

Published July 28, 2018

## 1. 서론

자화지정은 『본초강목』에 처음 기록된 이래 淸熱解毒, 涼血消腫의 효능이 있어, 疔瘡腫毒, 癰疽發背, 丹毒, 毒蛇咬傷 등을 치료하는 약물로 사용되어 왔다[1]. 자화지정의 기원은 대한민국약전의한약(생약)규격집[2]에 “제비꽃 *Viola mandshurica* Baker 또는 호제비꽃 *Viola yedoensis* Makino (제비꽃과 Violaceae)의 전초”라고 기재되어 있다.

자화지정의 성분으로 전초에는 배당체(glycoside), 플라보노이드(flavonoid) 등이 함유되어 있다. 꽃에는 랍(wax)이 함유되어 있고, 그 속에는 불포화 지방산 5.8%, 알콜류 10.3%, 포화 지방산 34.9%, 탄화수소 약 47%가 포함되어 있다[1]. 약리작용으로는 항산화 효능[3], 뇌세포 보호 효과[4], 항진척 효과[5], 아토피성 피부염에 대한 항염증 효과[6], 항비만 효과[7], 류마티스 관절염 치료효과[8] 등이 보고되어 있다.

염증은 한의학적으로 瘡瘍(여러 가지 외과적 질병과 피부 질병)의 범주에 속하며, 넓은 의미로는 기혈이 머물러 있어서 영위가 소통되지 못하고 안에서 맺히거나 또는 여러 종류의 외적인 손상에 의한 체표의 병증이며 악성 종기를 포함하는 개념이며, 좁은 의미로는 감염성 질환으로부터 발생하는 피부의 질병과 같은 염증성 질환을 말한다[9].

LPS는 대표적으로 대식세포(macrophage) 또는 단핵구(monocyte)의 toll-like receptor4(TLR4)를 자극하며, interleukin(IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 및 IL-6를 포함한 pro-inflammatory cytokine, nitric oxide(NO) 및 eicosanoid의 분비를 촉진한다. 이러한 염증매개성 물질들이 급성으로 일어나거나 과도한 반응이 이어지게 되면 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있으며, 염증반응 초기에는 사이토카인(cytokine)과 산화질소(nitric oxide)를 생산하여 생체방어에 중요한 역할을 한다[10].

최근 면역 매개물질인 사이토카인의 염증 및 면역 반응 조절기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 cytokine의 생물학적 효과가 표적 세포나 조직을 상당히 변화시키고 어떤 cytokine은 다른 cytokine의 작용을 억제하기도 하며, 또한 특정 cytokine의 작용을 선택적으로 차단하는 억제제가 자연계에 존재 하는 것으로 알려져 있으며 염증 매개물질(IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 등)을

억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 다양한 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다[11-13].

여러 학자들에 의해 한약제들에 관한 실험 연구들은 진행되어 왔다[14-18]. 또한 자화지정의 약리 효과 중 다양한 질환별에 해당되는 항염효과 대한 면역매개인자들에 대한 연구는 보고되었으나 대표적인 염증유도인자들에 대한 자화지정 추출물 연구는 자세히 알려져 있지 않은 것으로 사료되었다.

이에 본 연구에서는 자화지정의 항염효능에 대하여 알아보기 위하여 자화지정을 물추출하여 제조한 시료(VH = *Violae Herba*)를 대상으로 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 세포생존율(cell viability)과 LPS(lipopolysaccharide)로 유발된 NO(nitric oxide) 그리고 IL(interleukin)-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-3 등의 사이토카인(cytokine) 생성증가에 대한 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료

#### 2.1.1 약재

실험에 사용된 자화지정(*Violae Herba*)은 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2017년 6월에 구입(NO: 2017-006)하였으며, 약재는 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고 실험에 사용한 약재는 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 깨끗하게 없애고 실험에 사용하였다.

#### 2.1.2 세포주

실험에 사용된 세포주는 RAW 264.7 세포(mouse macrophage)로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

#### 2.1.3 시약 및 기기

본 실험을 위해서 MTT assay kit(Sigma, USA), NO assay kit(Sigma, USA), FBS(Sigma, USA), DMEM(Sigma, USA), penicillin(Sigma, USA), streptomycin(Sigma, USA), ethyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), methyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), EDTA(Sigma, USA), DMSO(Sigma, USA), 1 $\times$ PBS(Sigma, USA),

Trypsin-EDTA(Sigma, USA), Bio-Plex cytokine assay kit(Panomics, USA), Fluo-4 calcium assay kit(Molecular Probes, USA) 등이 사용되었다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 Bio-Plex 200(Bio-Rad, USA), microplate reader (Bio-Rad, USA), CO<sub>2</sub> incubator (Nuair, USA), water bath (Intron Biotech, Korea), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), research microscope (Becton dickinson, USA), fume hood (Hanil, Korea), centrifuge (Hanil, Korea), clean bench (Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner (Branson, USA), ice-maker (Vision Scientific Co, Korea), spectrofluorometer(Dynex, UK) vortex mixer (Vision Scientific Co, Korea) 등이다.

## 2.2 방법

### 2.2.1 시료의 제조

자화지정을 정확하게 50 g 중량을 측정하고 1 차 멸균 수 2 L와 함께 환류추출기에 넣은 뒤 가열하여 2 시간 동안 추출하였다. 추출액을 filter paper (Advantec No.2, Japan)를 사용하여 감압 여과한 후 농축액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 얻었다. 이 농축액을 건조한 분말로 사용하기 위해 동결건조기를 이용하였다. 동결건조 추출물은 14.8 g (수율 29.6%)을 얻었다.

### 2.2.2 Cell culture

대식세포주인 RAW 264.7 세포를 streptomycin (100 µg/mL), penicillin (100 U/mL), FBS가 첨가된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양되었다. 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 flask (75 cm<sup>2</sup> 크기)에서 콜고루 증식한 후 3일 간격으로 배양세포 표면을 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 깨끗이 씻어준 다음 각 flask 당 0.25% trypsin-EDTA용액 (1 mL)을 넣고 상온에서 1 분간 처리한 후 trypsin-EDTA용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 떨어뜨려 계대 배양하였다. 떨어트린 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지 10 mL를 첨가하여 부유시킨 후 50 mL culture flask로 옮겨 1 : 2의 비율로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

### 2.2.3 Cytotoxicity assay

자화지정 추출물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 처리하여 세포독성이 어느 정도 있는지를 알아보기 위하여 Mosmann[19]의 방법을 응용하여 MTT assay를 실시

하였다. 1×10<sup>4</sup> cells을 96 well에 100µl씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양시간을 24 시간으로 하여 오래된 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 세포 표면을 씻어주었다. 배양을 24시간 한 후 동량의 세포배양배지와 PBS에 녹인 자화지정 추출물을 농도별 (25, 50, 100, 200 µg/mL)로 각 well에 처리하였다. 세포배양을 마친 후 PBS에 녹여 100µl씩 각 well에 1 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 처리한 후 빛을 막기 위하여 알루미늄호일로 덮어 같은 조건하에 2시간 동안 추가 배양하였다. 세포배양액을 완전히 제거하여 DMSO를 100µl 처리한 후 37°C 배양기에서 2시간 정도 추가 배양하여 흡광도(490 nm)로 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포생존율은 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{세포생존율(\%)} = 100 \times \frac{\text{absorbance of control}}{\text{absorbance of tested extract solution}}$$

### 2.2.4 Nitric oxide production measurement

1 µg/mL의 LPS를 단독처리하거나 혹은 다양한 농도 (25, 50, 100, 200 µg/mL)별로 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 µl을 채취하여 여기에 그리스 시약(Griess reagent) 100 µl을 혼합하여 15분 동안 반응시키고 흡광도(540nm)로 Microplate Reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포의 일산화질소 생성은 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{일산화질소 생성(\%)} = 100 \times \frac{\text{absorbance of control}}{\text{absorbance of tested extract solution}}$$

### 2.2.5 Cytokine secretion measurement

측정하고자 하는 사이토카인(cytokine)의 분비량과 자화지정 추출물의 상관관계를 알아보기 위하여 Politch 등 [20]의 방법을 응용하여 Bio-Plex Cytokine Assay를 다음과 같이 시행하였다. 1×10<sup>5</sup> cells을 96 well에 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양시간을 24 시간으로 하여 오래된 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 후 각 well에 1 µg/mL의 LLPS를 단독처리 (1 µg/mL)하거나 혹은 다양한 농도(25, 50, 100, 200 µg/mL)별로 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액(cell culture supernatant)을 채취하여 filter plate(96 well type)에 미리 준비되어

있던 antibody-conjugated capture beads와 결합시킨 뒤 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150  $\mu$ l의 wash buffer로 깨끗이 세척한다. 세척이 끝난 뒤 각 well에 30 분간 detection antibody를 추가 배양한다. 배양이 완료되면 3회 세척(wash buffer)한 뒤 각 well에 streptavidin-PE를 분주하고 실온에서 30 분간 300~500 rSB의 조건으로 진동배양한다. 배양이 완료되면 3회 세척(wash buffer)한 후 각 well에 120  $\mu$ l의 reading buffer를 분주하고 실온에서 5 분간 300~500 rSB의 조건으로 진동배양한 뒤 bio-plex array reader(Bio-Plex 200)를 이용하여 사이토카인(cytokine)류의 발현에 대한 영향을 계산 및 비교하였다.

### 2.3 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, ANOVA test와 Student's t-test로 분석하였다. p-값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있다는 것으로 판정하였다.

## 3. 결과

### 3.1 세포독성에 대한 효과

자화지정 추출물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 자화지정 추출물을 처리한 결과(24 시간) 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도에 따른 세포생존율이 증가하였다.

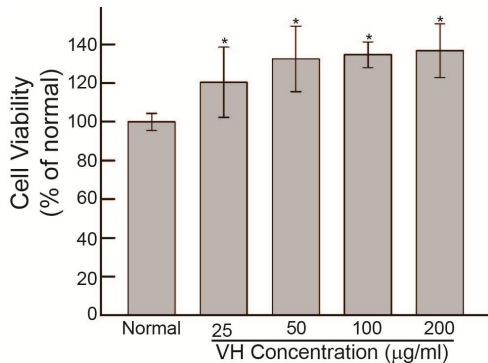


Fig. 1. The effect of VH on cell viability in RAW 264.7 mouse macrophages cells.

Cells were cultured for 24 hrs. Values are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. VH : Violae Herba water extract. Normal :Treated with media only. \* represents P < 0.05 compared to the normal.

### 3.2 LPS로 유발된 NO 생성증가에 대한 효과

자화지정 추출물이 LPS로 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 NO 생성증가에 대한 효과를 알아보기 위하여 LPS(1  $\mu$ g/mL)와 함께 자화지정 추출물을 처리한 결과(24 시간) 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의성(P<0.05) 있게 억제하였다.

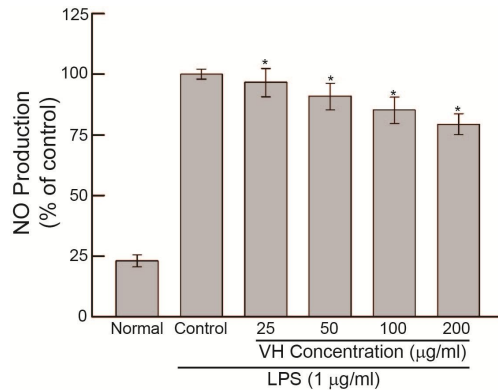


Fig. 2. The effect of VH on the nitric oxide production in RAW 264.7 mouse macrophages cells treated with LPS (1  $\mu$ g/mL).

Cells were cultured for 24 hrs. The value is the mean  $\pm$  SD for three independent experiments. VH : Violae Herba water extract. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents P < 0.05 compared to the normal.

### 3.3 IL-1 $\beta$ 생성에 대한 효과

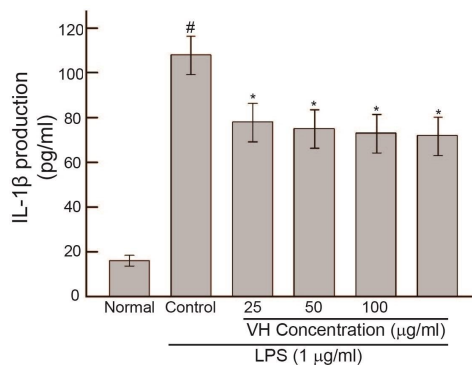


Fig. 3. The effect of VH on the IL-1 $\beta$  production in RAW 264.7 mouse macrophages cells treated with LPS (1  $\mu$ g/mL).

Cells were cultured for 24 hrs. The value is the mean  $\pm$  SD for three independent experiments. VH : Violae Herba water extract. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents P < 0.05 compared to the normal. \* represents P < 0.05 compared to the control.

자화지정 추출물이 LPS로 활성화된 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 IL-1 $\beta$  생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1  $\mu$ g/mL)와 함께 자화지정 추출물을 처리한 결과(24 시간) 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS에 의한 IL-1 $\beta$  생성증가를 유의성 있게 억제하였다.

### 3.4 TNF- $\alpha$ 생성에 대한 효과

자화지정 추출물이 LPS로 활성화된 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$  생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1  $\mu$ g/mL)와 함께 자화지정 추출물을 처리한 결과(24 시간) 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성증가를 유의성 있게 억제하였다.

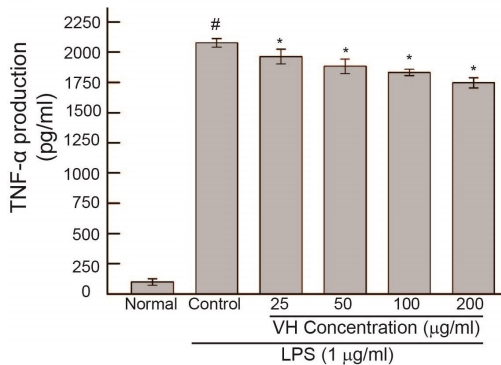


Fig. 4. The effect of VH on the TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 mouse macrophages cells treated with LPS (1  $\mu$ g/mL).

Cells were cultured for 24 hrs. The value is the mean  $\pm$  SD for three independent experiments. VH : *Viola* Herba water extract. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

### 3.5 IL-6 생성에 대한 효과

자화지정 추출물이 LPS로 활성화된 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 IL-6 생성 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS(1  $\mu$ g/mL)와 함께 자화지정 추출물을 처리한 결과(24 시간) 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의성 있게 억제하였다.

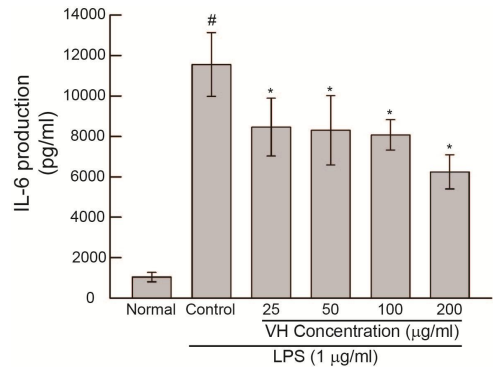


Fig. 5. The effect of VH on the IL-6 production in RAW 264.7 mouse macrophages cells treated with LPS (1  $\mu$ g/mL).

Cells were cultured for 24 hrs. The value is the mean  $\pm$  SD for three independent experiments. VH : *Viola* Herba water extract. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents  $P < 0.0$  compared to the normal.

## 4. 고찰

자화지정은 전초로 줄기가 없이 뿌리에서 바로 잎이 나며 잎몸, 잎자루, 꽃자루 및 뿌리부분으로 되어있다. 잎은 뾰족한 모양 또는 긴 세모모양 ~ 타원형모양이고 가장자리는 둔한 톱니모양이 있다. 잎 끝부분은 둔하고 너비 1 ~ 3 cm, 길이 3 ~ 6 cm이며, 뒷쪽면은 녹색 ~ 연한 갈색이다. 잎자루는 길이 3 ~ 8 cm로 위로 올라갈수록 날개 모양으로 넓혀져 있고 약간 구부러져 있다[2].

자화지정은 살리실산(Salicylic acid), 메틸배당체(methylglycoside), 알칼로이드(alkaloid) 및 다양한 종류의 사포닌(saponin)을 함유하고 있으며 폴리페놀(polyphenol) 화합물의 다양한 항산화 성분을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[21-23].

이와 같이 자화지정은 항산화 효과를 가지고 있지만, 한의학에서 쓰이는 자화지정의 물 추출물에 의한 자화지정의 항염 효과에 관한 연구는 아직 보고되지 않아, 이에 대한 검증을 할 필요가 있다고 판단되었다.

이에 본 연구에서는 자화지정을 물추출하여 얻은 시료(VH)를 대상으로 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 세포생존율과 LPS로 유발된 NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6의 다양한 사이토카인(cytokine)의 생성증가에 대한 영향을 측정하였다.

염증반응은 외부자극에 대한 복잡하게 생체 내에서

일어나는 복구체계의 증강 및 손상의 감소를 위한 활성화 기전으로 임상적으로는 보통 종창, 발적, 동통, 발열, 기능장애 등의 증상이 나타난다. 염증반응에 관여하는 세포는 대식세포(macrophage), 림파구(lymphocyte), 단핵구(monocyte), 비만세포(mast cell), 혈소판(platelet), 섬유아세포(fibroblast) 등이 있으며 염증자극으로 히스타민(histamine), 세로토닌(serotonin), 아라키돈산(arachidonic acid) 대사체, 사이토카인(cytokine), 활성산소종(Reactive Oxygen Species) 등과 같은 염증매개 인자가 유리 및 생성된다[24].

본 실험에서는 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 자화지정 추출물을 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 후 37°C에서 24 시간동안 배양한 뒤, 세포의 증식을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과 자화지정 추출물은 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 유의한 독성을 유발하지 않았으며 이는 자화지정 추출물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 유의성 있게 독성 유발하지 않는 것을 알 수 있다.

NO는 생체내에서 신호전달, 혈소판응집, 혈압조절 등 다방면으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 특히 LPS (lipopolysaccharide)나 pro-inflammatroy 사이토카인(cytokine)은 면역세포에 작용하여 L-아르기닌(arginine)으로부터 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 작용으로 NO 생성을 증가시킨다. 많이 생성된 NO는 급성염증이 아닌 만성염증 관여하며 iNOS 활성화작을 통하여 만성염증을 조절하기 위해 NO 생합성 선택적 억제제 개발에 많은 관심을 가지고 있는 실정이다[25,26].

자화지정 추출물이 LPS로 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 NO 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 자화지정 추출물을 24 시간 동안 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의성 있게 억제하였다. 이와 같이 자화지정 추출물이 LPS로 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 NO 생성증가를 억제하는 것은 자화지정 추출물이 과도한 NO 생성에 의한 염증악화를 억제할 수 있는 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

사이토카인(cytokine)은 감염(infection), 면역반응(immune response), 염증반응(inflammation), 외상(trauma)에 대한 숙주반응을 조절하는 조절인자(regulator)로서 분자량 8 Da-40 kDa을 갖는 작은 비구조성 단백질이며 다양한

사이토카인(cytokine) 중에서, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등은 pro-inflammatory 사이토카인(cytokine)으로 염증반응을 촉진시키는 작용을 유도한다[27]. IL-1은 주로 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 형태를 가지며, IL-1 $\beta$ 은 염증초기에 분비되어 숙주면역반응의 염증을 매개자로서 역할로 작용하며, 주로 대식세포(macrophage)에서 합성되어 T cell에 대하여 림포카인(lymphokine)의 생성을 유발시키고 B cell의 성장 및 분화를 자극하며 항체(antibody)의 생산을 증진시키는 역할로 작용하고 염증반응(inflammatory response)을 일으키는데 아주 중요한 작용을 한다[28].

자화지정 추출물이 LPS로 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 IL-1 $\beta$  생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 자화지정 추출물을 24 시간 동안 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 LPS에 의한 IL-1 $\beta$  생성증가를 유의성 있게 억제하였다.

TNF- $\alpha$ 는 세포독성물질로서 T 림프구에 작용하여 T 림프구의 활성화와 성장을 조절하여 염증부위에서 생성이 증가되며[29], 주로 대식세포(macrophage)에서 생성되어 면역반응을 일으키고, 에너지유출 증가, 혈관 성장 자극, 감염, 종양에 항증식작용 및 염증과 창상 치유 촉진 작용을 하는 것으로 알려져 있다[30].

자화지정 추출물이 LPS로 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 TNF- $\alpha$  생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 자화지정 추출물을 24 시간 동안 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성증가를 유의성 있게 억제하였다.

IL-6은 간세포의 단백질 합성과 항암효과를 유도하고 조직 손상에 대한 발열반응을 일으키며, IL-1과 협력하여 B cell에서의 면역글로불린(immunoglobulin) 유리를 촉진시키고 가슴샘 cell과 T cell의 분화에 관여한다[31,32].

자화지정 추출물이 LPS로 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 IL-6 생성증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 LPS와 함께 자화지정 추출물을 24 시간 동안 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의성 있게 억제하였다.

이와 같이 자화지정 추출물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 독성을 주지 않았으며 LPS로 인해 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 각종 염증매개물질들

(inflammatory mediators) 생성증가를 통계적으로 유의성 있게 억제하였다. 결과적으로 자화지정 추출물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 염증에 관련된 물질의 과다한 배출로 인한 다양한 염증질환을 완화시킬 수 있는 항염효능이 있음을 시사한다.

이상의 결과, 자화지정 추출물은 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 유의한 세포독성을 유발하지 않으면서도 LPS로 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6의 생성증가를 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 유의성 있게 억제시키는 등 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 관련된 염증반응을 조절할 수 있는 항염효능이 있는 것으로 판단된다. 앞으로 자화지정을 이용한 염증질환에 관련된 치료제개발에 새로운 연구가 더 필요하다. 새로운 기능성화장품의 개발에는 원하는 활성을 보유한 다양한 식물들의 개발이 우선되어야 하며, 관심의 대상이 되는 친피부적인 효과로 미백, 항염증, 항산화 효과 등이 있다. 이러한 효과를 보유한 물질을 천연 소재에서 찾으려는 연구가 필요한 바이다.

### 5. 결론

본 연구에서는 자화지정 추출물(VH)을 대상으로 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 세포생존율과 LPS로 유발된 NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6의 다양한 사이토카인(cytokine)의 생성증가에 대한 효과를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, 자화지정 추출물은 25, 50, 100 및 200  $\mu$ g/mL 농도에서 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 통계적으로 유의성 있는 독성을 유발하지 않았다.

둘째, 자화지정 추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 NO 생성증가를 25, 50, 100 및 200  $\mu$ g/mL 농도에서 통계적으로 유의성 있게 억제시켰다.

셋째, 자화지정 추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 생성증가를 25, 50, 100 및 200  $\mu$ g/mL 농도에서 통계적으로 유의성 있게 억제시켰다.

이상의 결과, 자화지정 추출물은 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 유의한 세포독성을 유발하지 않으면서도 LPS로 유발된 대식세포의 NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6의

생성증가를 25, 50, 100 및 200  $\mu$ g/mL에서 통계적으로 유의성 있게 억제시켰다. 이러한 결과는 자화지정 추출물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 관련된 염증반응을 과도하게 줄이는 항염증효능이 있음을 시사하는 바이다.

### REFERENCES

- [1] I. R. Kim et al. *Boncho-Hak* Seoul : Young-Lim Press.
- [2] Korea Food and Drug Administration. *The Korean Herbal Pharmacopoeia*. Seoul : Korea Food and Drug Administration.
- [3] J. S. Ko. (2012). A Study on Antioxidant Effect of Methanol Extract from Viola Mandshurica. *Journal of The Korea Society of Cosmetology*, 18(5), 1082-1086.
- [4] D. S. DS et al. (2011). Neuronal Cytoprotective Effect of Viola Herba Origin Plants. *Kor J Oral Maxillofac Patho*, 35(4), 209-214.
- [5] M. Y. Lee et al. (2010). Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of Viola mandshurica W. Becker(VM) ethanolic (EtOH) extract on airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 159-164.
- [6] M. J. Rang. (2013). Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis ( Part II ). *J of Korean Oil Chemists' Soc*, 30(1), 173-182.
- [7] Y. Y. Sung, D. S. Kim & H. K. Kim. (2014). Viola mandshurica ethanolic extract prevents high-fat-diet-induced obesity in mice by activating AMP-activated protein kinase. *Environ Toxicol Pharmacol*, 38(1), 41-50.
- [8] B. W. Lee & D. H. Kim. (2003). Inhibitory effect of Viola herba extract on inflammatory cytokine production induced by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in cultured human synovial cells. *Kor J Herbology*, 18(3), 89-96.
- [9] S. S. No. (2006). *Wonsaek Pibugaw-Hak* Seoul : IBC Gihoek Press.
- [10] J. B. Jeong, S. C. Hong, H. J. Jeong & J. S. Koo. (2012). Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from Cnidium officinale Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J Plant Res*, 25(3), 299-307.
- [11] H. Matsuda, T. Morikawa, S. Ando, I. Toguchida & M. Yoshikawa. (2003). Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg Med Chem*, 11(9), 1995-2000.
- [12] J. B. Calixto, M. M. Campos, M. F. Otuki & A. R.

- Santos. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*, 70(2), 93-103.
- [13] W. P. Arend & J. M. Daye. (2005). Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 33(3), 305-15.
- [14] Y. B Lee et al. (2013). The Effect of Mulberry Leaf Extract on Blood biochemical parameters in White Rats Exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin(TCDD). *Journal of Digital Convergence*, 11(1), 299-308.
- [15] J. Kim. (2014). Antibacterial and anti-inflammatory effects of Platycodon grandiflorum extracts. *Journal of Digital Convergence*, 12(3), 359-366.
- [16] A. Y Jang, Y. C. Sueng & J. G. Ji. (2016). The comparative study on physiological activity of White ginseng, Red ginseng and Black ginseng extract. *Journal of Digital Convergence*, 14(5), 459-471.
- [17] M. S. Kim, S. H. Park & H. R. Park. (2016). Convergence Studies Vascular Relaxation and Safty Evaluation in Viscum Coloratumma, Chrysanthem Morifolium, Citri Percarpium, and Ophiopogonis Radix Mixture. *Journal of Digital Convergence*, 14(9), 479-484.
- [18] S. H. Park, B. J. Park & H. R. Park. (2016). Studies on Nutritional Analysis and Antioxidant activity of Oriental Medicines with Bloodstream Improvement. *Journal of Digital Convergence*, 14(10), 563-570.
- [19] T. Mosmann. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.
- [20] J. A. Politch, L. Tucker, F. P. Bowman & D. J. Anderson. (2007). Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod*, 22(11), 2928-2935.
- [21] B. B Lee et al. (2008). Antioxidant Activity and Inhibition Activity against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase of Viola mandshurica Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37(4), 405-409.
- [22] K. S. Ko. (2012). A study on Antioxidant Effect of Methanol Extract from Viola Mandshurica. *Journal of the korean society of Cosmetology*, 18(5), 1082-1086.
- [23] M. R. Lee, J. H. Hwang, J. H. Park, H. J. Kim, E. J. Park & H. R. Park. (2010). Antioxidant Activity and Protective Effects of 9-hydroxy- $\alpha$ -tocopherone from Viola mandshurica Extracts. *Kor J Pharmacogn*, 41(3), 166-173.
- [24] J. M. Mccord, K. Wong, S. H. Stokes, W. F. Petrone & D. English. (1980). Superoxide and inflammation: a mechanism for the anti-inflammatory activity of superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand Supp*, 492, 25-30.
- [25] J. N. Sharma, A. Al-Omran & S. S. Parvathy. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol*, 15(6), 252-259.
- [26] R. Korhonen, A. Lahti, H. Kankaanranta & E. Moilanen. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(4), 471-479.
- [27] C. A. Dinarello. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503-508.
- [28] W. P. Arend & J. M. Dayer. (1995). Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 38(2), 151-160.
- [29] F. R. Balkwill, M. S. Maylor & S. Malik. (1990). Tumor necrosis factor as an anti-cancer agent. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 26(5), 641-644.
- [30] G. E. Nedwin, L. P. Svedersky, T. S. Bringman, M. A. Jr. Palladino & D. V. Goeddel. (1985). Effect of interleukin 2, interferon-gamma and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol*, 135(4), 2492-2497.
- [31] M. Liu, J. Li, F. Kong, J. Lin & Y. Gao. (1998). Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology*, 40(3), 187-198.
- [32] C. A. Dinarello, S. Endres, S. N. Meydani, M. Meydani & M. K. Hellerstein. (1990). Interleukin-1, anorexia, and dietary fatty acids. *Ann N Y Acad Sci*, 587, 332-338.

한 효 상(Han, Hyo Sang)

[중신회원]



- 2003년 2월 : 경원대학교 보건관리학과(보건학사)
- 2005년 2월 : 경원대학교 한의학과(한의학석사)
- 2008년 8월 : 경원대학교 한의학과(한의학박사)

- 2012년 3월 ~ 현재 : 중부대학교 보건행정학과 교수
- 관심분야 : 한의학, 대체의학
- E-Mail : hanhs@joongbu.ac.kr