대한한의학 방제학회지 제27권 제4호
Herbal Formula Science
2019;27(4):245~255
pISSN 1229-1218, eISSN 2288-5641 https://doi.org/10.14374/HFS.2019.27.4.245
Official Journal of The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
Available at http://www.formulastudy.com HFS

Original Article / 원저

LPS로 유도된 대식세포에서 수치 치자의 항염효과

안이슬[1], 김상찬[2], 변성희[2], 이종록[1], 박숙자[1*]

[1]대구한의대학교 제약공학과, [2]대구한의대학교 한의과대학

Anti-inflammatory Effect of the Processed Gardeniae Fructus in LPS-induced Macrophages

Iseul An[1], Sang Chan Kim[2], Sung Hui Byun[2], Jong Rok Lee[1], Sook Jahr Park[1*]

[1]Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University,
[2]College of Korean medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objective : Herbal processing is one of the traditional techniques used in Korean medicine to increase the effectiveness of herbs or reduce their toxicity. In this study, Gardeniae Fructus processed with ginger juice and alcohol was prepared to evaluate the anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages.

Methods : The processing of Gardeniae Fructus was performed by adding 40 % ginger juice or 10% alcohol to the total weight of Gardeniae Fructus and then roasting at 150℃ for 5 minutes. Cell viability was determined by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. To detect nitric oxide (NO) production, culture media were mixed with Griess reagent and measured the absorbance at 540 nm. Prostaglandin E_2 (PGE_2) and pro-inflammatory cytokines were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was applied to monitor protein expression levels.

Results : LPS-induced NO, PGE_2 and inflammatory cytokines were decreased by the treatment of normal or processed Gardeniae Fructus ethanol extracts (GFE). Compared to normal GFE, the processed GFE showed a stronger inhibitory effect on the production of NO and PGE_2. These inhibitory effect of GFE was due to the suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) mediated from the inhibition of nuclear factor kappa B (NF-κB). Furthermore, processed GFE showed more suppressive effects on the expression of iNOS, COX-2 and IκBα

ⓒ 2019 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
This paper is available at http://www.formulastudy.com which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

proteins than normal GFE.

Conclusion : From these results, it was concluded that GFE had an improved anti-inflammatory effect compared to normal GFE. These results provide an objective evidences for the use of herbal processing in Korean medicine.

Key words : Herbal processing, Gardeniae Fructus, Ginger juice, Anti-inflammatory, NO, PGE_2.

Ⅰ. 서론

본초(本草)는 식물에서 기원한 약재로 인류 역사상 식품, 화장품 및 건강 산업에서 널리 사용되어져 왔다. 이는 본초가 함유하고 있는 화학성분들(phytochemicals)이 유익한 효과를 발휘하기 때문이며, 식물 화학성분들은 단독 혹은 협동적으로 생리활성을 발휘하게 된다[1]. 건강과 수명연장에 대한 관심으로 한약재를 활용한 제품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 최근 세계보건기구(WHO)는 전 세계 인구의 약 80%인 55억 명이 1차 건강관리를 위해 식물 유래 천연물제품을 사용하고 있다는 보고서를 발표하였다[2]. 천연물 제품에 대한 수요 증가로 유효한 화학성분의 함량을 높일 수 있는 약재의 가공 및 추출법에 대한 연구도 관심을 받고 있다.

전통적으로 한의학에서는 수치(修治)라고 하는 약재 가공 공정이 사용되어져 왔다. 수치는 약재를 필요한 형태로 가공하는 공정을 의미하며, 약재의 효능을 높이거나 독성을 줄일 수 있는 처리 원칙을 기본으로 하고 있다[3]. 수치법에는 균일한 화력으로 볶는 초(炒)법, 보료가 스며들게 하여 볶는 자(炙)법, 용기에 넣고 찌는 증(蒸)법 등이 있으며, 이 과정을 통해 약재의 성질이 인체에 더 나은 방향으로 변하게 된다. 이러한 약성의 변화는 약재에 함유되어 있는 화학성분의 변화로 설명할 수 있다. 현호색을 초(炒)함으로써 dehydrochorydaline의 함량 변화와 항균 활성이 증진됨이 보고되었고[4] 보료(輔料)를 가하여 초(炒)한 감초에서는 생리활성 물질인 liquiritigenin의 함량이 높아지는 것이 확인되었다[5].

치자는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 잘 익은 열매로서 주요 성분으로는 iridoid glycoside인 geniposide, shanzhiside, gardoside를 비롯하여 chlorogenic acid, gardenin, crocin, crocetin 등이 함유되어 있으며[6], 생리활성 연구로는 항산화[7], 항균[8], 항염[9], 항바이러스 활성[10], 아질산염 소거능[11], 암세포증식 억제 활성[12] 등이 보고되었다, 한의학에서 치자는 간담(肝膽)의 습열(濕熱)을 제거함으로써, 황달, 간장 질환 등을 치료하는데 사용되어져 왔다[13]. 하지만 위장이 약한 환자에게는 고한(苦寒)한 성미의 치자가 위를 상하게 하는 부작용을 만들 수 있기에 전통적으로 강즙(薑汁)을 보료(輔料)로 하여 볶는(炒) 수치과정을 거쳐 처방되어져 왔다. 또한 지혈 작용을 더 높이기 위해 태우듯이 볶은 치자를 사용하기도 하였다[14]. 수치에 의한 생리활성의 변화를 살펴보기 위해 일반 건조 치자와 수치 치자 사이에서 사하작용과 항산화 활성의 차이에 대한 연구[14,15]는 진행되었으나, NO, PGE_2와 같은 염증 매개인자의 생성을 중심으로 항염 활성을 비교한 연구는 현재까지 발표되지 않았다. 본 연구에서는 강즙과 주정(酒精)을 각각 보료로 사용하여 볶은 강즙초 치자와 주초 치자를 준비하였으며, 단순히 건조된 일반 치자와 수치 치자 사이에서 항염 활성에 차이가 나타나는지 살펴보고자 하였다. 세포의 염증반응은 Raw264.7 대식세포에 세균의 내독소인 LPS를 처리하여 유발하였고 염증인자 생성에 대한 저해력으로 항염 활성을 판단하였으며, 항염 활성에 대한 기전을 조사하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin는 Gibco (Rockville, MD, USA)제품을 사용하였고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

*Corresponding author : Sook Jahr Park, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.
Tel : +82-53-819-1298, E-mail : hanny@dhu.ac.kr.
•Received : November 6, 2019 / Revised : November 13, 2019 / Accepted : November 18, 2019

diphenyltetrazoleum (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), LPS는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다 TNF-α, IL-1β와 IL-6 ELISA kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였고 PGE_2 assay kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다. Actin, lamin A/C 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Bergheimer, Germany)에서 구입하였고, iNOS, COX-2, inhibitor of kappa B (IκBα), NF-κB 항체는 Cell Signalling Technology (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 약재

건조 치자는 전남생약농협협동조합(전남 화순)에서 구입하였다. 생강즙은 봉동 생강(전라도 완주)을 세척하여 착즙기로 즙을 낸 후 그 찌꺼기에 물을 첨가하여 다시 즙을 내는 과정을 반복하여 생강 무게의 2배에 해당되는 양으로 준비하였고, 주정(pretanol A, 95%)은 덕산종합과학(서울)에서 구입하여 사용하였다.

3. 치자 수치(修治) 방법

치자 수치 방법은 보료의 함량, 가열 온도 및 시간 등 수치 조건의 변화에 따라 나타나는 항산화 활성을 기준으로 40% 생강즙과 10% 주정을 보료로 사용하여 150℃에서 5분간 볶는 방법을 선택하였다[16]. 건조 치자 8 g을 50 ml conical tube에 담고 치자 질량의 40% (3.2 ml)에 해당되는 부피의 생강즙과 10% (0.8 ml)에 해당되는 주정을 균일하게 도포하였다. 각 치자 시료는 orbital shaker 위에서 24 시간 방치하여 건조한 후에 150℃ (140~160℃ 사이)에서 5분 동안 볶아 수치 치자로 준비하였다.

4. 수치 치자의 에탄올추출물 준비

일반 치자 및 수치 치자 각 4 g에 20 ml의 에탄올을 첨가하여 실온에서 72시간 동안 정치하여 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman, No.2)로 여과하고 60±2℃에서 회전 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 후 질소 가스로 건조하여 최종적으로 수치 치자 에탄올추출물(Gardeniae Fructus Extract, GFE)을 준비하였다.

5. MTT assay

일반 및 수치된 GFE를 각각 50 μg/ml의 농도로 세포에 전처치하고 LPS (0.2 μg/ml)로 세포를 활성화시킨 후에 배양배지는 걷어내고 PBS로 세척하였다. 세척된 배양세포에 MTT (0.1 ㎎/㎖)시약을 넣고 4시간 동안 처리하여 생성된 dark formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 사용하여 570 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

6. 산화질소(nitric oxide, NO) 생성량 측정

NO는 세포 배양액 중에 존재하는 nitrite ion (NO_2^-)의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 50 μl와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H_2O) 50 μl를 96 well plates에 혼합하여 넣고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

7. PGE_2 및 cytokines의 분석

PGE_2와 cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6)은 ELISA kit를 사용하여 분석하였다. PGE_2는 Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서, cytokine은 Invitrogen (Grand Island, NY, USA)에서 kit를 구입하여 manufacturer's instruction에 따라 실험하였다. 각 시료와 표준물질의 흡광도는 405 ㎚ (PGE_2)와 450 ㎚ (cytokines)에서 측정되었으며, 표준곡선에 따라 각각의 함량을 결정하였다.

8. Total cell lysates 및 핵 분획물의 준비

배양 세포는 10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.2 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), proteinase inhibitor cocktail을 함유하는 buffer로 lysis한 후, 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상등액을 취하여 total cell lysate로 사용하였다. 핵 분획물은 시판되는 nuclear extraction reagent (Pierce biotechnology, Rockford, lL, USA)를 이용하여 준비하였으며, NF-κB의 발현 측정에 사용하였다.

9. 단백질 정량 및 Western blot analysis

단백질 농도는 Micro BCA protein assay reagent

kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 570 ㎚에서 흡광도로 측정하여 정량하였다. Total cell lysate 및 핵 분획물은 20 ㎍/lane의 단백질 양으로 10% SDS-PAGE를 실시하여 nitrocellulose membrane으로 이전하였다. Nitrocellulose membrane은 iNOS, COX-2, IκBα, NF-κB, actin, lamin A/C 등의 1차 antibody를 가하여 반응시킨 후에 2차 antibody로 처리하였다. 면역반응성 단백질은 enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 확인하였다.

10. 통계처리

모든 data는 평균±표준편차로 나타내었으며, student t-test 및 ANOVA test로 $p < 0.05$ 수준에서 시료간의 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. 수치 치자가 LPS로 과다 생성된 NO에 미치는 영향

NO는 대식세포에서 LPS와 같은 내독소에 의해 과다 생성되어 급성 및 만성 염증과 관련된 조직 손상을 유도하는 염증매개인자로 작용한다[17]. 따라서 세포독성을 유발하지 않는 농도(50 ㎍/㎖)에서 각 치자 추출물(GFE)이 LPS에 의해 증가된 NO 생성에 미치는 영향을 살펴봄으로써 항염 활성을 조사하였다. 그 결과, LPS는 대조군(CON) 비하여 2배 이상 증가된 NO 수준을 보여주었으며 일반 및 수치 GFE는 NO 억제 효과를 보였다. 특히, 수치 GFE 중에서 강즙초 치자가 일반 치자와 비교하여 NO 저해 활성이 유의하게($p < 0.01$) 증가됨을 확인할 수 있었다. 주초 치자는 일반 치자와 비교하여 NO 저해 활성에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig.1A). NO 저해 효과가 세포 생존율의 감소에 기인하는지 확인하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, 세포 생존율은 NO 생성 감소에 영향을 주지 않았다. 또한 LPS의 처리가 세포 생존율 감소를 유도하였으나 GFE에 의해 대식세포의 생존율이 회복되었으며, 일반 GFE에 비해 수치 GFE의 세포 보호 활성이 유의적으로($p < 0.05$) 높게 나타났다(Fig. 1B).

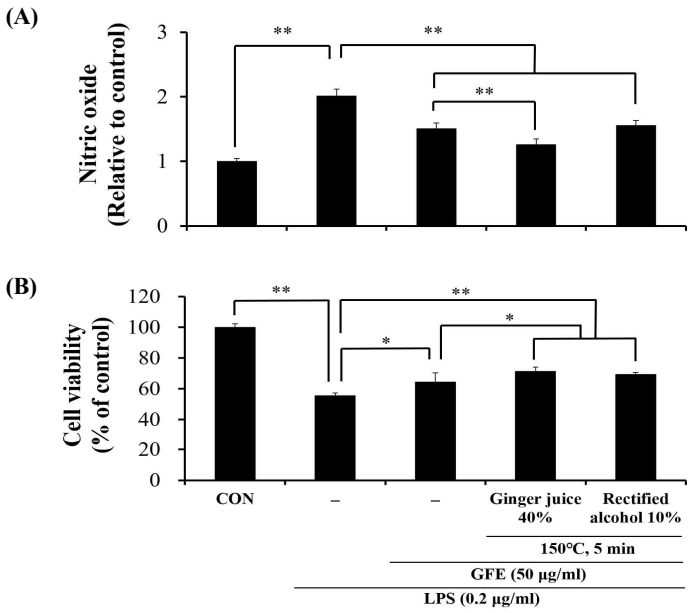

Fig. 1. Effect of Gardeniae Fructus ethanol extracts (GFE) on NO production and cell viability in LPS stimulated Raw264.7 cells.
Cells were treated with various concentrations of GFE plus LPS for 24 h, and then the medium were collected to detect the levels of NO (A). Cell viability was assessed by MTT assay (B). Data represent the mean ± SD of three separate experiments (t-test, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

2. 수치 치자가 LPS에 의해 증가된 PGE_2 생성에 미치는 영향

Arachidonic acid로부터 PGG_2, PGH_2를 거쳐 생성되는 PGE_2는 염증, 부종, 통증 및 발열 등의 증상을 일으키며, 염증 반응시 PGE_2는 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시키는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[18]. 본 실험의 대식세포주에서도 LPS 처리에 의해 과도한 PGE_2의 생성이 확인되었으나 GFE에 의해 PGE_2 생성이 억제되었다. 일반 치자와 수치 치자를 비교해 보면, 일반 무처치 치자에 비해 강즙초 치자와 주초 치자가 PGE_2의 생성을 유의하게($p < 0.05$) 더 감소시켰음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

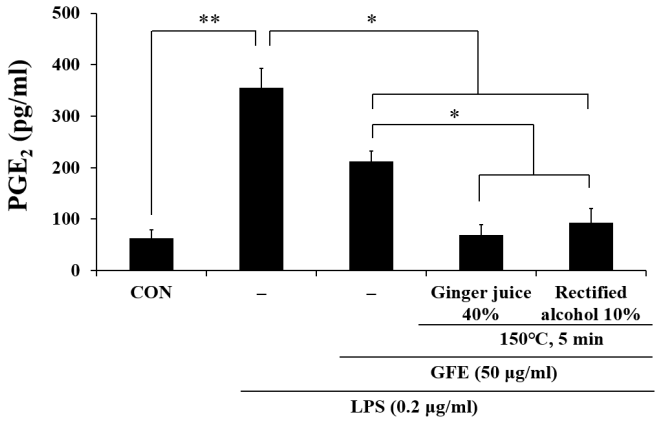

Fig. 2. Effects of Gardeniae Fructus ethanol extracts (GFE) on the production of PGE_2 in LPS stimulated Raw264.7 cells.
The cells were treated with GFE for 1 h prior to the addition of LPS, and then further incubated for 18 h. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE_2 as described in Methods. Data represent the mean ± SD of three separate experiments (t-test, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

3. 수치 치자가 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

NO는 LPS에 의해 유도되는 iNOS에 의해 L-arginine으로부터 생성되고, PGE_2는 arachidonic acid로부터 COX-2의 촉매 작용에 의해 생성된다. 따라서 GFE에 의한 NO 및 PGE_2의 생성 억제가 이 효소 단백질들의 발현 감소에 기인하는지를 조사하기 위하여 Western blot analysis를 실시하였다. 그 결과, LPS 처치 시에는 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 유의하게 증가되었으나, GFE에 의해 단백질 발현이 유의하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 특히, COX-2의 경우, 일반 치자에 비교하여 강즙초 치자와 주초 치자에 의한 발현 감소 효과가 유의하게($p < 0.05$) 더 우수함을 확인하였다. iNOS의 경우에는 수치 치자 중에서 강즙초 치자만이 일반 치자보다 유의하게($p < 0.05$) 뛰어난 단백질 발현 저해 효과를 나타내었다.

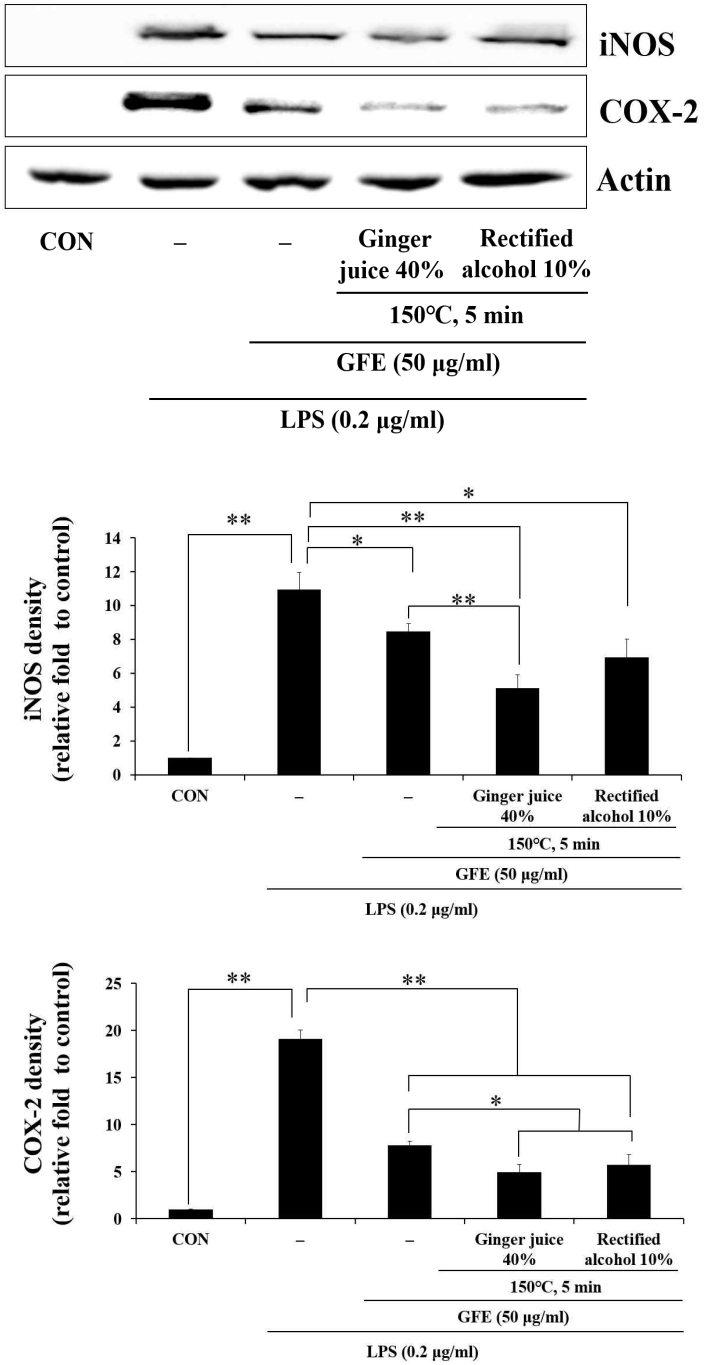

Fig. 3. Inhibitory effects of Gardeniae Fructus ethanol extracts (GFE) on the expression of iNOS and COX-2.

The expressions of iNOS and COX-2 protein were monitored 18 h after GFE plus LPS (0.2 μg/ml) treatment. Equal amounts (20 μg/lane) of total protein were resolved by SDS-PAGE. Actin was used as a loading control. Bar graphs show the density of blot from all experiments in each group. Data represent the mean ± SD of three separate experiments (t-test, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

4. 수치 치자가 LPS로 증가된 사이토카인(cytokine) 조절에 미치는 영향

마우스 대식세포에서 염증 반응 관련 cytokine인 TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 과도한 분비에 대한 GPE의 효과를 살펴보기 위해 LPS로 유도된 대식세포에 GPE를 농도별(25, 50, 100 ㎍/㎖)로 처리한 후에 배양 상층액에 함유되어 있는 TNF-α, IL-1β, IL-6의 양을 조사하였다. 그 결과, GPE는 LPS 단독과 비교하여 평균적으로 TNF-α를 저해하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 하지만 IL-1β, IL-6에 대하여 GFE는 LPS 단독과 비교하여 유의한($p < 0.05$) 억제 효과를 보였다(Fig. 4). 또한 강즙초 치자는 일반 치자와 비교하여 두 사이토카인을 유의하게($p < 0.05$) 더 저해하였으며, 주초 치자는 평균적으로 일반 치자에 비해 높은 저해 활성을 보였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 4B, C).

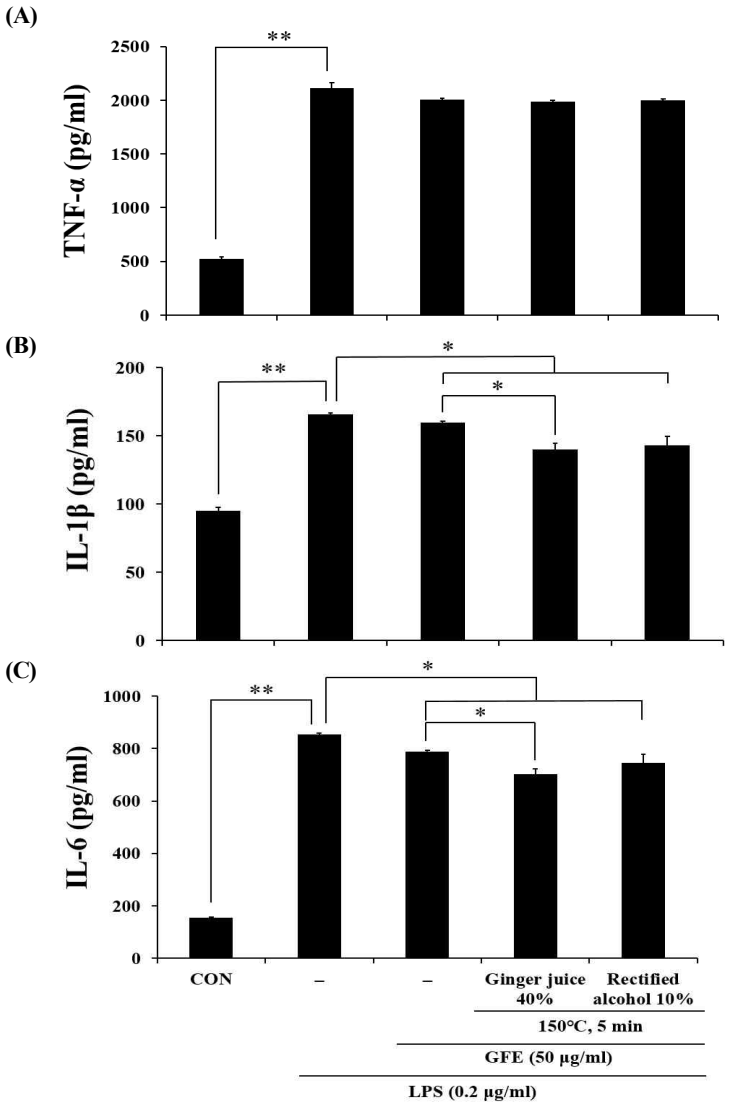

Fig. 4. Inhibitory effects of Gardeniae Fructus ethanol extracts (GFE) on production of inflammatory cytokines.
Cells were incubated with GFE plus LPS for 18 h. TNF-α (A), IL-1β (B) and IL-6 (C) in the medium were determined by ELISA kit. Data represent the mean ± SD of three separate experiments (t-test, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

5. 수치 치자가 NF-κB 신호전달계에 미치는 영향

전사인자인 NF-κB는 LPS와 같은 염증 신호에 의해 억제 단백질인 IκB로부터 분리 되면 핵으로 이동하여 NO, PGE_2 및 cytokine의 생산을 조절할 수 있다. 마우스 대식세포에서 수치 치자의 염증 인자들에 대한 저해 효과가 NF-κB 신호전달계와 관련이 있는지 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, LPS에 의해 억제단백질인 IκBα의 발현이 감소하고 핵에서 NF-κB의 발현은 증가하였지만 이러한 효과는 GFE에 의해 상쇄되었다. 특히 IκBα 분해에 서 강 즙초 치자와 주초 치자가 일반 치자에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 더 우수한 저해 효과를 가지는 것으로 확인되었다. NF-κB의 경우, 일반 치자와 수치 치자를 비교하면 수치 치자에 의한 저해 효과가 평균적으로 더 우수하게 확인되었지만 통계적 유의성은 t-test에서 나타나지 않았다.

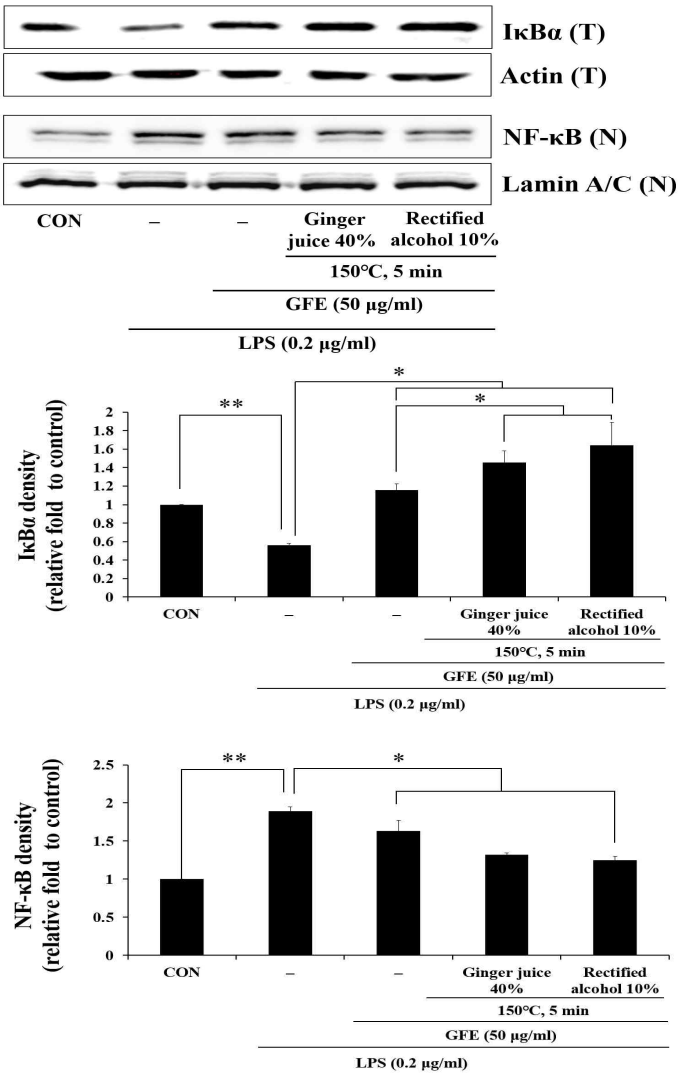

Fig. 5. Effect of Gardeniae Fructus ethanol extracts (GFE) on the expression of NF-κB and IκBα protein. The expression levels of proteins were monitored 15 min (IκBα) and 60 min (NF-κB) after treatment of cells with LPS with or without GFE. Actin was used as a loading control for total cell lysate (T) and lamin A/C was used as nuclear (N) loading control. Bar graphs show the density of blot from all experiments in each group. Data represent the mean ± SD of three separate experiments (t-test, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

Ⅳ. 고찰

염증은 외부적 요인에 의한 세포 손상에서 일어나는 면역반응의 하나로 이 과정에서 분비되는 케모카인(chemokine)이 손상 부위로 백혈구를 모이게 함으로써 상처를 치유하게 된다[19]. 따라서 염증은 적절히 조절되면 체내 면역시스템을 통해 세포 보호 효과를 발휘할 수 있지만, 오래 지속되거나 과도하게 진행되는 염증반응은 암, 천식, 자가면역과 같은 질환의 원인이 될 수 있다. 마우스 대식세포에서 세균내독소인 LPS는 TLR4와 결합하여 과도한 염증 반응을 유발하여 다양한 염증 매개인자의 생성을 촉진하게 한다[20]. 염증 반응에서 주요한 역할을 담당하는 전사인자는 NF-κB이며, 정상 상태에서 NF-κB는 억제 단백질인 IκB와 결합하여 세포질에 존재하게 된다[21]. 하지만 염증신호가 오면 IκB의 발현이 감소되고 이 억제단백질로부터 자유로워진 NF-κB는 핵으로 이동하여 염증매개인자의 생성을 촉진하게 된다[22]. IκB는 IκBα, IκBβ, IκBε등의 여러 종류가 있으며, 이 중에서 IκBα가 세포내에서 가장 풍부한 NF-κB의 억제단백질로 알려져 있다[22]. 따라서 본 연구에서는 일반 치자와 수치 치자의 항염 활성을 비교하기 위하여 마우스 대식세포에서 LPS로 과다 생성된 NO와 PGE_2 등의 염증 매개인자에 대한 치자 및 수치 치자의 저해 효과를 조사하였으며, 수치 치자가 염증 반응에 주요한 기전 중의 하나인 NF-κB signaling에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다.

치자는 생활 속에서 옷감이나 음식의 색을 내기 위한 천연 염색제로 많이 활용되고 있으나 한의학에서는 청열사화(淸熱瀉火)의 효능이 있어 몸 안의 열을 내려주는 대표적인 약재로서 간, 심장, 위 등에 작용하여 황달, 충혈 및 소염 등의 치료에 사용되어져 왔다[13]. 또한 상초(上焦)의 열을 내리는데 효능이 있어 가슴이 답답한 증상을 치료하는데도 사용되었으며, 상한론에는 치자를 사용한 8가지 처방이 소개되고 있다[23]. 치자에 대한 생리활성 연구로는 항산화 활성[5], 항균 활성[6], 항바이러스 활성[7] 등이 보고되었으며, 마우스 대식세포에서는 염증매개 인자인 NO, PGE_2, cytokine의 생성을 억제한다고 보고되었다[24,25]. 본 연구에서도 치자와 수치 치자는 LPS에 의해 생성이 증대된 염증인자에 대한 억제 효과를 보였으며, 일반 치자에 비해 수치 치자가 유의하게 더 높은 저해효과를 나타내었다. 현재까지 일반 치자와 수치 치자의 항염 활성을 비교한 연구는 없었으며, 더불어 본 연구에서는 치자의 항염 활성에 대한 기전 연구도 수행하여 수치 치자가 억제단백질인 IκBα의 발현 감소 억제와 전사인자인 NF-κB의 핵전이를 저해함으로써 항염 활성을 나타냄을 확인하였다.

맵고 차가운 성질의 약재인 치자는 전통적으로 강즙을 가하거나 가열함으로써 그 성질을 보하고자 하는 수치법이 사용되어 왔다[14]. 이런 수치법을 통해 위장이 허약한 환자에게도 치자를 처방할 수 있었으니, 수치라고 하는 한약재 가공과정은 약재의 활용 다양성면에서 그 의미가 큰 분야라 할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 천연색소로 널리 알려져 있는 치자의 본초학적 가치와 활용 다양성을 찾기 위해 생강즙과 주정을 보료로 사용하여 초(炒)한 수치 치자를 준비하여 항염증 활성을 조사하였다. 또한, 수치 치자와 일반 무처치 치자의 활성을 비교함으로써 한의학에서 수치가 사용되어져 온 의의를 찾아보고자 하였다. 그 결과 LPS를 처리한 마우스 대식세포에서 수치 치자는 NO, PGE_2와 같은 염증매개인자들을 저해함으로써 항염증 활성을 나타내었고 이러한 수치 치자의 활성은 일반 치자에 비하여 유의하게 높게 나타남을 확인하였다. 특히, 수치 치자는 주정보다는 강즙을 보료로 사용한 것이 NO, PGE_2 및 cytokine (IL-6, IL-1β)에서 유의하게 더 높은 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 전통적으로 강즙을 보료로 사용하여 가열한 수치 치자를 사용함으로써 치자의 활용도를 높였던 한의학적 기록들에 대한 객관적이고 과학적인 설명을 제공할 수 있게 한다. 홍 등은 치자의 열처리 과정에서 항산화 활성과 crocetin의 함량이 증가됨을 발표하였으며[15], crocetin 함량 증가는 치자의 구성 화합물로 배당체 형태인 crocin이 분해되었기 때문일 것이라 고찰하였다. 본 연구에서도 150℃, 가열 조건과 강즙의 처리에 의해 치자 성분화합물에 변화가 있었을 것으로 사료된다. 수치에 의한 치자의 항염 활성 증가가 성분화합물 변화에 기인하는지를 설명하기 위해서는 후속 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

Ⅴ. 결론

본 연구에서는 일반 치자와 강즙과 주정을 보료로

사용하여 볶은 2 종의 수치 치자(강즙초 치자, 주초 치자)에 대한 항염 활성을 비교하였으며, 일반 치자에 비해 수치 치자의 항염 활성이 더 우수함을 확인하였다. 수치 치자 중에서는 강즙초 치자가 주초 치자 보다 더 나은 항염 활성을 보였으며, 강즙초 치자는 IκBα의 분해를 억제하여 NF-κB signaling을 저해함으로써 iNOS, COX-2, cytokines 등을 억제하였다. 이러한 결과는 임상적으로 많이 활용되고 있는 치자 수치의 목적을 생리활성 증진의 측면에서 객관적으로 이해할 수 있게 하며, 염증 관련 질환에서 치자의 활용 가능성을 확대시켜 줄 수 있을 것이다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MOE) (No. 2017R1D1A3B03031863).

References

1. Briskin DP. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiol. 2000;124(2):507-14.
2. World Health Organization (WHO). Traditional Medicine. Genova, Switzerland: WHO; 2003.
3. Han L, Wang R, Zhang X, Yu X, Zhou L, Song T, et al. Advances in processing and quality control of traditional Chinese medicine Coptidis rhizoma (Huanglian): A Review. J AOAC Int. 2019;102(3):699-707.
4. Lee JR, Park SJ, Kim YW, Cho IJ, Byun SH, Kim SC. Comparison of Antimicrobial effects of Corydalis tuber and processed Corydalis tuber against Propionibacterium acnes. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2011;24(3):17-26.
5. Lee JR, Jo MJ, Park SM, Kim SC, Park SJ. Establishment of UPLC method for analysis of liquiritigenin and studies on the processing of licorice for enhancement of liquiritigenin content. Herb Formula Sci. 2010;18(1):145-54.
6. Liu H, Chen YF, Li F, Zhang HY. Fructus Gardenia (Gardenia jasminoides J. Ellis) phytochemistry, pharmacology of cardiovascular, and safety with the perspective of new drugs development. J Asian Nat Prod Res. 2013; 15:94-110.
7. Debnath T, Park PJ, Deb Nath NC, Samad NB, Park HW, Lim BO. Antioxidant activity of Gardenia jasminoides Ellis fruit extracts. Food Chemistry. 2011;128(3):697-703.
8. Ryu EJ, Cho SH. Antimicroibal characteristics and safety test of Gardenia jasminoides extract. J Agric Life Sci. 2004;38(4):11-9.
9. Cha JH, Lim EM. Effects of Gardeniae Fructus on cytokines in mouse macrophage. J Korean Obstet Gynecol. 2014;27(1):1-16.
10. Lin YJ, Lai CC, Lai CH, Sue SC, Lin CW, Hung CH, et al. Inhibition of enterovirus 71 infections and viral IRES activity by Fructus gardeniae and geniposide. Eur J Med Chem. 2013;62:206-13.
11. Jeong HJ, Kim SA, Kwon JH, Kim HK. Physiological activities of Gardeniae Fructus extracts by microwave-assisted extraction as affected by solvents. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008;37(3):282-7.
12. Park MK, Yoon HJ, Lee HJ. Antioxidant effect and inhibitory activities of ethyl acetate fraction from Gardenia jasminoides extract on nitric oxide production and pancreatic cancer cell proliferation. Kor J Food Sci Technol. 2018;50(2):209-15.
13. Shin MK. Clinical herbalogical book. Seoul:Yeonglimsa. 2000:373.
14. Shin YW, Kim DH, Kim NJ. Studies on the processing of crude drugs(7) - On the constituents and biological activities of Gardeniae Fructus by processing. Kor J Pharmacogn. 2003;34(1):45-54.
15. Hong YJ, Kim HS, Lee JS, Ko SK, Shin JM, Chung AH, et al. Studies on the changes of constituents and biological activities of

Gardeniae Fructus by processing. Report of S.I.H.E. 2008;44:154-65.
16. Park SJ. Processing effect on cytoprotective activity of Gardeniae Fructus in gastric epithelial cells induced by tert-butyl hydroperoxide. J East-West Med. 2019;44(1): 9-16.
17. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Ann Rev Immunol. 1997;15:323-50.
18. Norberg JK, Sells E, Chang HH, Alla SR, Zhang S, Meuillet EJ. Targeting inflammation: multiple innovative ways to reduce prostaglandin E. Pharm Pat Anal. 2013;2(2):265-88.
19. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. Ther Immunol. 1994;1(4):229-46.
20. Marsh CB, Wewers MD. The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection. Clin Chest Med. 1996;17(2):183-97.
21. Li Q, Verma IM. NF-κB regulation in the immune system. Nat Rev Immunol. 2002;2: 725-34.
22. Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-κB (NF-κB). Curr Drug Targets. 2000;1:387-99.
23. Kim IR. A research on the origin and daily dose of Gardeniae Fructus in Shanghanlun. Kor J Herbol. 2011;26(4):155-161.
24. Son JH, Kim DC. In vitro anti-bacterial and anti-inflammatory effects of Trichosanthes Semen, Gardeniae Fructus, and Angelicae Dahuricae Radix aqueous extracts. J Korean Obstet Gynecol. 2013;26(1):41-58.
25. Cha JH, Lim EM. Effects of Gardeniae Fructus on cytokines in mouse macrophage. J Korean Obstet Gynecol. 2014;27(1):1-16.