



Original Article / 원저

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 지칭개 추출물의 항염 효과

김재광^{1#}, 박수영¹, 최화영¹, 장미희², 정대화², 김상찬^{1*}, 조일제^{1**}

¹대구한의대학교 한의과대학, ²한의바이오

Anti-inflammatory effect of *Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge) on LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells

Jae Kwang Kim^{1#}, Su Young Park¹, Hwa Young Choi¹, Mi Hee Jang², Dae Hwa Jung²,
Sang Chan Kim^{1*}, Il Je Cho^{1**}

¹College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan, Republic of Korea, ²HaniBio Co., Ltd, Gyeongsan, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : *Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge) has been used for treating wound, hemorrhage, fever in Korean traditional medicine. Present study investigated anti-inflammatory effect of *H. lyrata* chloroform extract (HLE) and its molecular mechanism involved.

Methods : To assess anti-inflammatory effect of HLE, production of nitric oxide (NO) and expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and pro-inflammatory cytokines were measured on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway was examined to elucidate its molecular mechanism.

Results : Pretreatment of HLE inhibited NO production in a concentration dependent manner. HLE also decreased expression of iNOS and COX-2, and alleviated expressions of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, HLE pretreatment inhibited phosphorylation of inhibitory- κ B α and p65.

Conclusions : These results suggest that HLE exhibits anti-inflammatory effect via inhibition of NF- κ B.

Key words : *Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge), RAW 264.7 cells, Inflammation, Nuclear factor- κ B (NF- κ B).

I. 서론

염증 (inflammation)은 물리적 손상, 유해 화합물, 병원체의 침입 등에 대항하는 인체의 정상적 방어 기전이다¹⁾. 인체는 염증반응을 통하여 침입한 외래인자와 손상/변형된 세포를 격리 또는 제거하여 조직의 추가적인 손상을 방지한다. 하지만 과도하거나 만성적인 염증이 지속되는 경우, 정상 세포 및 조직의 피사가 심화되어 류마티스 관절염, 심장질환, 궤양, 염증성질환, 다발성 경화증 등의 만성적 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다²⁾. 선천 면역에서 대식세포는 병원체 표면에 존재하는 내독소 (endotoxin)를 인지하여 탐식작용과 함께 주변 조직으로 nitric oxide (NO), prostaglandin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), 및 interleukin (IL)-1 β 등의 다양한 염증 매개 물질들을 유리하여 염증반응을 촉진하는 역할을 담당한다³⁾.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)는 대식세포를 포함한 다양한 선천 면역 세포에서 염증 매개 물질들의 발현을 조절하는 세포 내 핵심 신호 전달분자로 알려져 있다. 특히 그람 음성균의 세포벽에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS) 등의 병원체-연관 분자양식 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP)들이 선천 면역 세포의 세포막에 존재하는 Toll-유사 수용체 (Toll-like receptor)와 결합하면 myeloid differentiation primary response gene 88와 TIR-containing adaptor inducing interferon β 등의 부속 분자들의 활성화를 경유하여 NF- κ B를 활성화시킨다⁴⁾. 활성화된 NF- κ B는 핵 안으로 이동하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 염증성 cytokine을 포함한 다양한 염증 매개 물질들의 전사를 촉진한다. 따라서 NF- κ B 신호분자의 조절은 선천 면역반응을 조절하기 위한 주요한 약물 작용점으로써, 이를 제어할 수 있는 다양한 천연 유래 약물들에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다.

지칭개 [*Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge)]는 국

화과 식물로 한반도 전역에 걸쳐 자생하며 민간에서는 주로 산나물로 식용되는 대표적인 산야초 중 하나이다. 한의학에서 지칭개는 泥胡菜, 苦馬菜 등으로 불리우며, 《貴州本草》에서는 清熱解毒, 祛瘀生肌하는 효능이 있으며 骨折 또는 刺傷의 치료에 찢어 바르며, 《救荒本草》에서는 痔漏, 疔瘡 등에 달여서 內服하거나 湯液으로 씻는다고 기록되어 있다^{5,6)}. 현재까지 지칭개에 관한 연구로는 지칭개 및 지칭개 꽃의 성분 연구⁷⁻¹⁰⁾, 지칭개에서 분리한 sesquiterpene lactone류의 항균 효과^{11,12)} 및 세포 수준의 항암 효능⁸⁾이 보고되었다. 특히, 본 연구실에서는 최근 지칭개로부터 분리한 hemistepsin A가 염증성 간염을 억제할 수 있음을 보고하였다¹³⁾. 그러나, 지칭개 추출물 자체의 약리 효능과 관련된 연구는 상대적으로 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 활용하여 지칭개 클로로폼 추출물 (*H. lyrata* chloroform extract, HLE)이 LPS에 의한 염증 매개인자들의 생성과 NF- κ B 중심 신호 전달과정에 미치는 영향을 연구하였으며, 이를 통하여 지칭개 추출물의 신규 약리 효능을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Anti-iNOS, anti-COX-2 및 anti-p65 항체는 각각 BD Biosciences (San Diego, CA, USA), Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Anti-phospho-inhibitory κ Ba (I κ B α), anti-phospho-p65 항체와 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 와 dimethyl sulfoxide는 각각 Amresco (Solon, OH, USA)와 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서

*Corresponding author : Sang Chan Kim. Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Formulation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

**Corresponding author : Il Je Cho. Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Formulation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1295, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : skek023@dhu.ac.kr

• Received : December 31, 2018 / Accepted : January 24, 2019



구입하였다. Anti- β -actin 항체, LPS와 기타 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 지칭개 추출물의 제조

지칭개 추출물 (HLE) 제조를 위하여 경북 경산시 유곡동 일대에 자생하고 있는 지칭개를 채취하여 음건하였으며, 건조된 지칭개 쏘草 50 g에 0.5 L의 클로로포름을 가하여 상온에서 72시간 동안 추출하여 Whatman No.2 filter paper (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과한 후, 진공회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)을 이용하여 농축하였다. 동결건조 (Labconco, Kansas, MO, USA)를 진행한 이후 지칭개 추출물의 최종 수율은 5.25%였으며 실험 시 dimethyl sulfoxide에 용해하여 사용하였다.

3. 세포 배양

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 분양받아 10% Fetal bovine serum과 Penicillin-Streptomycin (Gibco, Rockville, MD, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (HyClone Laboratories, Logan, USA) 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 계대 배양하였다.

4. NO 생성 억제능 측정

LPS 처치에 의해 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 NO의 양을 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-[1-naphthyl]-ethylene diamine dihydrochloride, 5% phosphoric acid)를 이용하여 측정하였다. 처치된 50 μ L의 배지에 동량의 Griess reagent를 넣고 10분간 상온에서 반응시킨 뒤 microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성은 무처리 대조군 대비 처치군의 비로 나타내었다.

5. 세포생존율 측정

MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 처치가 완료된 세포와 0.2 mg/mL의 MTT 용액이 2시간 동안 반응하여 생성된 formazan crystal을 200 μ L의 dimethyl sulfoxide에 용해시킨 뒤 microplate reader (Tecan)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리 대조군 대비 처치군 흡광도의 비

율을 상대적 세포생존율로 나타내었다.

6. 전세포 단백질 조추출액의 제조 및 면역 화학 분석

전세포 단백질 조추출액 (whole cell crude lysates)을 제조하기 위하여 처치된 세포를 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT, Barker, TX, USA)가 포함된 radioimmunoprecipitation buffer에 4°C에서 10분마다 교반하며 40분간 반응시켜 용해시킨 후 15,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 전세포 단백질 조추출액으로 이용하였다. 이후 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 후, polyvinylidene flouride membrane (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)에 전이하고 membrane을 1차 항체와 4°C에서 12시간 이상 반응시켰다. Membrane을 2차 항체 (Cell Signaling Technology)와 상온에서 1.5시간 이상 반응시킨 뒤, Enhanced Chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)와 반응하여 생성된 빛을 x-ray film (Agfa, Mortsel, Belgium)에 감광하였다. Image J software (NIH; <http://imagej.nih.gov/ij>)을 이용하여 각 단백질의 상대적인 발현 정도에 대한 분석을 수행하였다.

7. 염증성 cytokine 측정

처치 후 배지에 유리된 TNF- α , IL-1 β , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)의 양을 BD OptEIA™ ELISA Kit (BD Biosciences)를 이용하여 제조사의 표준 방법에 따라 측정하였다.

8. RNA의 분리, cDNA 합성 및 real-time polymerase chain reaction (PCR) 분석

처치가 완료된 세포로부터 total RNA를 Tri-solution (Bioscience Technology, Daegu, Korea)으로 분리한 뒤 oligo(dT)₁₆ primer, Accupower RT premix (Bioneer, Daejeon, Korea)와 Mastercycler nexus GSX1 Thermal cycler (Eppendorf, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. HLE 처치에 의한 염증성 cytokine 유전자들의 발현을 상대 정량하기 위하여 SYBR green premix (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)와 각 유전자 특이적 primer를 이용하여 real-time PCR (CFX-96, Bio-rad, Hercules, CA, USA) 분석을 수행하였다. 각 유전자의 발현량은 *glyceraldehyde-3-phosphate*

*dehydrogenase (GAPDH)*의 상대적 발현양으로 보정하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 산출하였다¹⁴⁾. Real-time PCR에 사용된 primer는 Bioneer에서 합성하였으며 염기 서열 정보는 다음과 같다. mouse *iNOS*, forward 5'-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3', backward 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3', PCR product 199 bp; *COX-2*, forward 5'-TCCAGATCACATTTGATTGA-3', backward 5'-TCTTTGACTGTGGGAGGATA-3', PCR product 449 bp; *TNF- α* , forward 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGAT-3', backward 5'-TACAGGCTTGTCACTCGAAT-3', PCR product 276 bp; *IL-1 β* , forward 5'-ATGGCAACTGTTCTGAACT-3', backward 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTT-3', PCR product 563 bp; *IL-6*, forward 5'-TTCCATCCAGTTGCCCTTCTT-3', backward 5'-ATTTCCACGATTTCCAGAG-3', PCR product 170 bp; *MCP-1*, forward 5'-TGATCCCAATGAGTAGGCTGG-3', backward 5'-ATGCTGGACCCATTCCTTCT-3', PCR product 132 bp; *GAPDH*, forward 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3', backward, 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3', PCR product 191 bp.

9. 통계적 분석

그룹간의 평균 비교를 위하여 일원분산분석 (one-way analysis of variance)을 수행하고 분산의 동질성 여부에 따라 Tukey HSD 또는 Dunnett T3로 사후 검정하였다. 모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며 $P < 0.05$ 를 기준으로 통계적 유의성을 검정하였다.

III. 연구 결과

1. HLE의 NO 생성 억제 효과

본 연구실의 선행 연구에서 열수, 에탄올, 메탄올, 또는 클로로포름으로 추출된 지칭개 추출물의 NO 생성에 미치는 영향을 연구한 결과, 클로로포름 추출물에서 가장 우수한 NO 생성 억제 효능이 있음을 보고하였다¹³⁾. 따라서 본 연구에서는 지칭개 클로로포름 추출물 (HLE)에 대한 염증 억제 효능 및 이와 관련된 기전을 연구하고자 우선 0.3-3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE를 1시간 전처치한 RAW 264.7 세포에 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 18시간 처치하여 회수한 세포 배양액과 Griess reagent를 반응시켜 배양액 내 유리된 NO 함량을 측

정하였다. LPS는 무처치 대조군 대비 8.47 ± 0.74 배 NO 생성을 증가시켰으나, 1 또는 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 전처치에 의하여 NO 생성이 무처치 대조세포의 4.37 ± 0.67 배와 1.09 ± 0.09 배로 LPS 단독 처치 세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Figure 1A). HLE가 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$, 18 h) 처치는 세포생존율을 무처치 대조군의 0.67 ± 0.06 배로 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, 0.3-3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 전처치는 LPS에 의하여 감소한 세포생존율을 변화시키지 않았다 (Figure 1B). 이상의 연구 결과를 통하여 HLE (1-3 $\mu\text{g/mL}$)가 RAW 264.7 세포의 독성과 무관하게 LPS에 의하여 증가한 NO 생성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

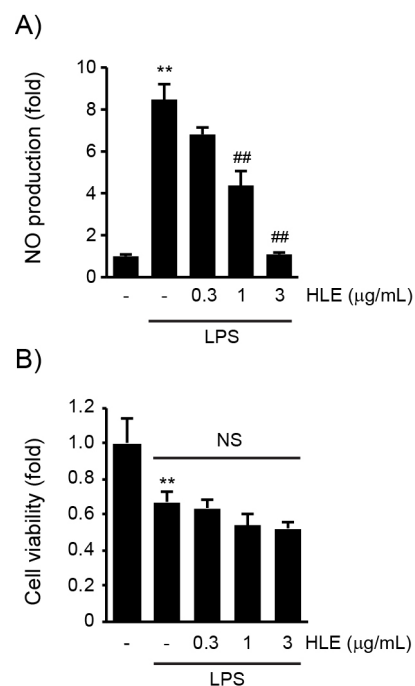


Figure 1. Inhibitory effect of HLE on LPS-mediated NO production in RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with HLE (0.3-3 $\mu\text{g/mL}$) for 1 h, and exposed to LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 18 h. A) NO production in conditioned media was detected by adding Griess reagent. B) Cell viability was measured by MTT assay. Significant vs untreated control group, ** $P < 0.01$; Significant vs LPS

only treated group, $^{##}P < 0.01$; NS, not significant.

2. HLE의 iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과

iNOS와 COX-2는 각각 염증 매개 물질인 NO와 prostaglandin/thromboxane을 생성하는데 관여하는 효소로서 이들 단백질의 발현 조절은 염증의 치료 및 예방에 있어서 주요한 표적이다. HLE의 항염 효능에 있어서 iNOS 및 COX-2의 발현 억제가 관여하는지 확인하기 위하여 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 면역 화학 분석으로 확인하였다 (Figure 2A). RAW 264.7 세포에서 LPS의 처리는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 무처리 대조군 대비 각각 3.61 ± 0.56 배와 12.87 ± 1.31 배로 증가시켰으며, 1 또는 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 전처치는 iNOS 발현을 무처리 대조군 대비 2.00 ± 0.27 배와 1.13 ± 0.30 배로 감소시켰으며, COX-2 발현은 9.76 ± 0.97 배와 5.71 ± 0.88 배로 모두 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 또한 HLE의 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제 과정에 이들 유전자들의 전사 조절이 관여하는지 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 1 또는 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE를 1시간 동안 전처치하고 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 12시간 처리하여 추출한 total RNA를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다 (Figure 2B). LPS 처리에 의하여 증가한 iNOS mRNA는 1 또는 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 전처치에 의하여 감소하는 경향을 나타내었으며, 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 전처치에 의한 iNOS mRNA의 감소는 LPS 단독 처리 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하였다. 또한 1 또는 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 전처치는 COX-2 mRNA를 LPS 단독 처리와 비교하여 통계적으로 유의하게 감소시켰다. LPS, LPS + 1 $\mu\text{g/mL}$ HLE, LPS + 3 $\mu\text{g/mL}$ HLE에 의한 iNOS mRNA의 변화는 무처리 대조세포의 77.61 ± 15.28 , 48.50 ± 14.85 , 31.65 ± 5.36 배였으며, COX-2 mRNA는 무처리 대조세포의 112292.38 ± 33311.37 , 56873.65 ± 35342.28 , 56256.63 ± 3690.74 배였다. 따라서 이상의 연구 결과를 통하여 HLE (1-3 $\mu\text{g/mL}$)가 RAW 264.7 세포에서 전사 조절을 통하여 iNOS와 COX-2의 발현을 억제할 수 있음을 확인하였다.

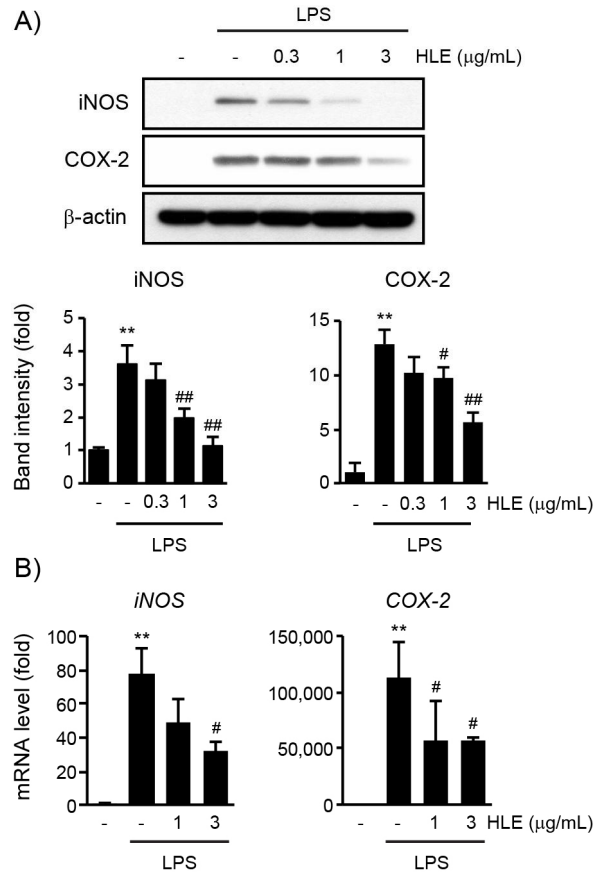


Figure 2. Inhibitory effect of HLE on LPS-mediated iNOS and COX-2 induction in RAW 264.7 cells. The cells were treated with HLE and LPS as described in figure 1. A) Protein levels of iNOS and COX-2 in whole cell lysates were determined using immunoblot analysis. Equal protein loading was verified with β -actin immunoblotting. B) mRNA levels of iNOS and COX-2 were measured using real-time PCR. Significant vs untreated control group, $^{**}P < 0.01$; Significant vs LPS only treated group, $^{##}P < 0.01$, $^{\#}P < 0.05$.

3. HLE의 염증성 cytokine 생성 억제 효과

LPS는 대식세포의 세포막에 존재하는 Toll-유사 수용체 4를 통한 신호 전달과정으로 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 MCP-1을 포함한 다양한 염증성 cytokine의 생성을 증가시키며 이는 정상조직의 만성염증과 과도한 손상을 유발한다²⁾. HLE가 LPS로 활성화된

RAW 264.7 세포에서 증가한 염증성 cytokine에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 0.3-3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE를 1시간 동안 전처리한 후 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 18시간 동안 처리하여 얻은 세포 배양액 내 유리된 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 및 MCP-1 의 양을 효소면역측정법으로 측정하였다. LPS 처리에 의하여 배양액 내 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 및 MCP-1 의 유리가 통계적으로 유의하게 증가하였다. 그러나, HLE 전처리에 의하여 염증성 cytokine의 생성이 처리 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 처리에 의한 $\text{TNF-}\alpha$ 의 감소, 1-3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 처리에 의한 IL-6 의 감소와 0.3-3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE 처리에 의한 MCP-1 의 감소가 LPS 단독 처리와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Figure 3A). 또

한 HLE의 염증성 cytokine 억제에 이들 유전자들의 전사 조절이 관여하는지 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 1 또는 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE를 1시간 동안 전처리하고 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 12시간 처리하여 추출한 total RNA를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. LPS 처리는 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 및 MCP-1 mRNA를 증가시켰으며, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 HLE를 1시간 동안 전처리에 의한 $\text{IL-1}\beta$ mRNA의 변화를 제외하고 모든 HLE의 전처리 그룹에서의 염증성 cytokine의 감소는 LPS 단독 처리 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Figure 3B). 따라서 이상의 연구 결과를 통하여 HLE가 전사 조절을 통하여 염증성 cytokine의 발현을 억제할 수 있음을 확인하였다.

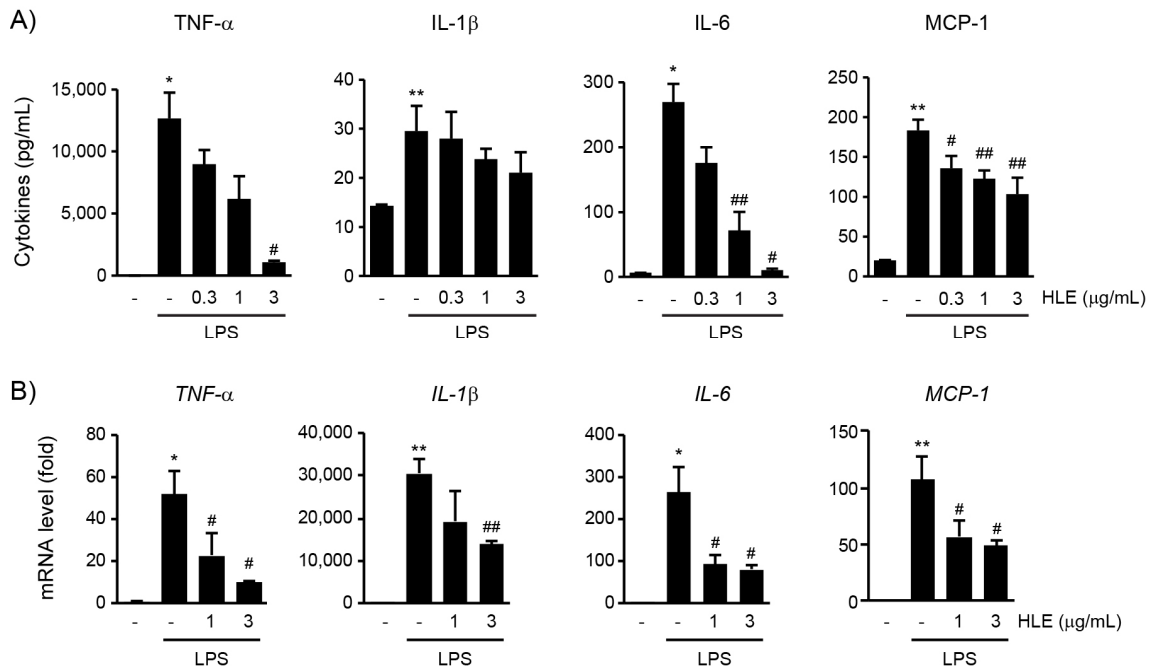


Figure 3. Inhibitory effect of HLE on LPS-mediated production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. The cells were treated with HLE and LPS as described in Figure 1. A) Pro-inflammatory cytokines in conditioned media were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. B) mRNA levels of pro-inflammatory cytokines were measured using real-time PCR. Significant vs untreated control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; Significant vs LPS only treated group, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$.

4. HLE의 NF-κB 신호 억제효과

NF-κB는 rel-homology domain을 갖는 단백질의 복합체로 구성되며, 정상상태에서 NF-κB는 주로 세포질 내에서 IκBα와 결합되어 비활성화된 상태로 존재한다¹⁵⁾. Toll-유사 수용체를 통한 염증 신호는 IκB kinase 활성화를 통하여 IκB가 인산화와 유비퀴틴화에 의해 분해되어 NF-κB를 복합체로부터 유리시키고, 핵으로 이동한 NF-κB는 전사인자로서 다양한 염증 관련 유전자들의 전사를 촉진한다^{2,13)}. 따라서 본 연구에서는 HLE의 염증 억제 과정에 NF-κB 신호분자들의 변화가 매개되는지 규명하기 위하여 RAW 264.7 세포에 0.3-3 μg/mL의 HLE를 1시간

전처치 후, 1 μg/mL의 LPS를 처치하여 얻은 전세포 단백질 추출액에 존재하는 IκBα와 p65 (NF-κB subunit) 인산화의 변화를 면역 화학 분석으로 연구하였다. RAW 264.7 세포에서 LPS 처치는 IκBα의 인산화를 무처치 대조군 대비 2.15±0.30배로 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 3 μg/mL HLE 전처치에 의하여 0.84±0.36배로 LPS 단독 처치 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Figure 4). 또한 LPS에 의하여 증가한 p65의 인산화도 1 또는 3 μg/mL의 HLE 전처치에 의하여 감소하였다. 따라서 이상의 결과는 HLE가 NF-κB 신호분자들의 인산화 억제를 통하여 항염 효능을 나타낼 수 있음을 나타낸다.

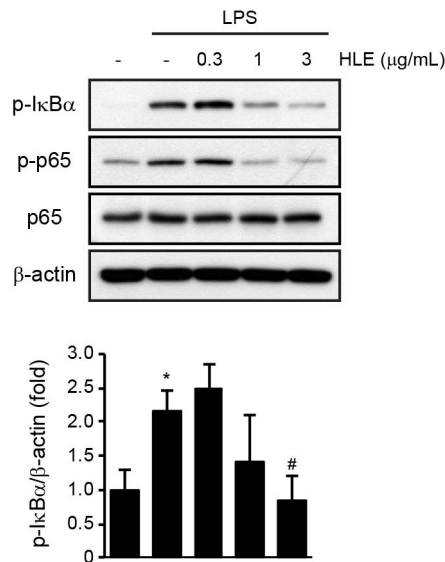


Figure 4. Inhibitory effect of HLE on LPS-mediated NF-κB activation. Phosphorylation of IκBα and p65 was determined after HLE (0.3-3 μg/mL, 1 h)-pretreated RAW 264.7 cells were exposed to LPS (1 μg/mL, 1 h). Equal protein loading was verified with β-actin immunoblotting. Significant vs untreated control group, **P* < 0.01; significant vs LPS only treated group, #*P* < 0.05.

IV. 고찰

지칭개는 淸熱, 解毒, 消腫, 祛瘀 등의 效能을 통하여 痔漏, 疔瘡, 外傷 등에 內服하거나, 짓뭉어서 바르거나 湯液으로 씻는 등의 外用으로 사용됨이 《貴州本草》, 《救荒本草》에 기록되어 있다^{5,6)}. 생약으로의 활용에 대한 문헌적 근거에도 불구하고, 현재까지 민간에서 나물류 등의 산야초로 오랫동안 식용되었을 뿐 本草, 方劑 및 임상 분야에서의 활용과

관련된 기록은 全無하고 약리 효능에 대한 연구도 더디게 진행되어 왔다. 이에 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 열수, 에탄올, 메탄올, 클로로포름의 4가지 용매를 이용하여 각각의 지칭개 추출물을 제조하였으며, 지칭개 클로로포름 추출물에서 우수한 NO 생성의 억제능을 보고한바 있다¹³⁾. 이에 대한 후속연구로써, 본 연구에서는 지칭개 추출물 자체의 항염증 효능을 규명하기 위하여 LPS 자극을 통해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성, iNOS와 COX-2 발현 및 염증성 cytokine의 발현에 미치는 영향과 기전

을 연구하였다.

대식세포를 포함한 염증세포에서 interferon- γ , TNF- α , IL-1, LPS 또는 CpG DNA 등의 자극을 통해 발현된 iNOS는 L-arginine으로부터 NO를 생성하여 세포 내 유입된 외래인자를 제거하거나 주변 손상된 세포를 제거한다¹⁶⁾. 그러나 과도하게 유리되는 NO는 주변정상 조직에 대한 세포 독성, 혈관투과성의 증가를 통한 호중구 침윤을 촉진하는 2차 신호 전달자로 작용하여 염증반응을 증폭하는데 관여한다³⁾. 따라서 지칭개 추출물의 항염 효능을 평가하기 위하여 LPS 자극으로부터 유도된 NO 생성에 대한 HLE가 미치는 영향을 연구하였다. 선행 연구 결과와 같이¹³⁾, RAW 264.7 세포에서 HLE의 전처치는 농도 의존적으로 LPS에 의한 NO 생성을 억제하였다. 이와 더불어 HLE에 의한 NO 생성 조절이 NO 생성 효소인 iNOS mRNA 전사 과정의 억제를 통하여 일어남을 iNOS 단백질과 mRNA에 대한 면역 화학 분석과 real-time PCR 분석으로 확인하였다. COX-2는 arachidonic acid로부터 cyclic pathway를 통하여 염증 매개체인 prostaglandin과 thromboxane을 생성합하는 과정의 율속 단계 효소로서 비스테로이드성 항염증제의 약리적 표적 분자이다¹⁷⁾. 1 또는 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HLE 전처치는 iNOS와 유사하게 LPS에 의한 COX-2의 단백질 및 mRNA 전사를 억제하였다. 따라서 이상의 결과는 HLE가 LPS로부터 유도되는 세포 내 염증신호 분자를 조절하여 iNOS 및 COX-2 발현을 억제하여 항염 효능을 나타낼 수 있음을 시사한다.

대식세포는 침입한 감염원을 탐식함과 동시에 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 등의 염증성 cytokine들을 분비하여 주변 조직에 염증 및 조직손상을 유발한다^{2,3)}. 일반적인 염증반응에서 조직에 유리되는 cytokine들은 일시적 증가 이후 빠르게 감소하는 반면, 만성적 염증 상황에서는 cytokine의 과도한 생성이 지속된다. 따라서 cytokine을 통한 염증의 매개가 주요 병리기전이 되는 류마티스 관절염, 크론병, 케양성 대장염 등의 질환에서 cytokine의 조절을 기전으로 하는 약제에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다³⁾. 본 연구에서 HLE의 처치는 LPS 자극으로부터 유발된 TNF- α , IL-6, MCP-1 등의 염증성 cytokine 생성을 억제하는 경향을 나타내었으며, 추가적으로 HLE가 전사 조절을 통하여 대식세포 내의 cytokine

mRNA 발현을 억제할 수 있음을 규명하였다. 그러나, 세포 배양액에 유리된 염증성 cytokine의 억제 정도와 세포 내 이들 인자들의 mRNA 억제 정도에 차이를 확인하였다. 이는 HLE가 염증성 cytokine의 측정법의 민감도의 차이, 염증성 cytokine 단백질 생성 후 분비, 세포 배양액 중 염증성 cytokine의 안정성의 차이에 기인한 것으로 추정되며 이에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

선천 면역은 대식세포, 호중구 등의 면역 세포 표면에 존재하는 양식 인지 수용체 (pattern recognition receptor, PRR)을 통하여 병원체 표면의 병원체-유래 분자 양식 (PAMP) 또는 손상세포의 손상-유래 분자 양식 (damage-associated molecular pattern, DAMP)을 인식하는 것으로부터 시작된다. Toll-유사 수용체를 통한 신호 전달은 NF- κB 를 활성화하여 염증 관련 유전자들의 전사를 유도하게 된다¹⁸⁾. 또한 NF- κB 는 본 연구에서 관찰한 iNOS, COX-2 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 MCP-1 유전자 전사 조절에 관여하는 핵심 전사인자 중 하나로서 보고되었다. 따라서 HLE의 항염 효능이 NF- κB 의 전사 조절에 기인하는지 알아보기 위하여 세포 내의 I $\kappa\text{B}\alpha$ 와 NF- κB 의 대표적 subunit인 p65의 인산화를 확인하였다. 실험결과, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HLE 처치는 LPS에 의한 I $\kappa\text{B}\alpha$ 와 p65의 인산화를 억제하였으며 이는 HLE가 NF- κB 신호분자의 활성화 억제를 통해 항염 효능을 나타낼 수 있음을 시사한다.

지칭개에는 현재까지 hemistepsin A, hemistepsin B를 포함한 4종의 sesquiterpene lactone 구조의 성분이 함유되어 있는 것으로 보고되었다⁷⁻¹⁰⁾. Sesquiterpene lactone 분자는 국화과 식물의 대표적인 유효성분으로 항염 효과 및 세포독성 효과를 나타내어 염증과 항암치료에 대한 활용 가능성이 보고되고 있다¹⁹⁾. 다수의 연구에서 sesquiterpene lactone의 NF- κB 신호분자의 억제를 통한 염증 억제가 보고된 바 있으며, 이는 NF- κB 의 consensus DNA서열에 대한 결합력 약화, p65 subunit의 직접적인 억제 등을 통한 가능성이 알려져 있다^{20,21)}. 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 지칭개에서 분리한 sesquiterpene lactone의 성분 중 hemistepsin A의 NF- κB 의 활성화 억제를 통한 항염 효능을 보고한 바 있다¹³⁾. 이와 더불어 유사구조를 가지고 있는 hemistepsin B 또한 NO 생성 억제 효능이 있음을 확인하였다 (data not



shown). 지칭개의 hemistepsin A는 클로로포름 추출물 (HLE)에서의 함량이 692.2 ± 2.5 ppm으로 열수 (152.5 ± 3.4 ppm), 에탄올 (263.9 ± 5.4 ppm), 메탄올 (176.8 ± 3.2 ppm) 추출물에 비하여 높았으며, 이와 유사하게 클로로포름 추출물에서의 NO 생성 억제 효능이 가장 높았다¹³⁾. 또한 클로로포름과 메탄올의 비율 (100% 클로로포름 ~ 10% 클로로포름)에 따라 추출한 클로로포름 분획 (No.1~12) 중, hemistepsin A의 함량이 가장 높은 4번 fraction에서 NO 생성 억제 효과가 가장 높음을 추가적으로 확인하였다 (data not shown). 위의 결과로 미루어볼 때 HLE의 항염증 효과에 hemistepsin A가 가장 많은 기여를 하는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 지칭개 클로로포름 추출물 (HLE)의 대식세포에서 내독소로 유도된 염증반응에 대한 억제 효능을 세포 수준에서 규명하여, 지칭개의 급/만성 염증치료 및 예방 약용소재로서의 가능성을 제시하였다. 이상의 연구와 더불어 지칭개 추출물 및 hemistepsin A 등의 유효성분의 염증 신호분자 억제에 관련된 상위 신호분자 연구, NF- κ B 신호분자 억제 기전 확보, 동물 수준에서의 안정성 연구가 추가적으로 이루어진다면 염증성 질환에 활용 가능한 처방의 구성 약재로 가미하여 사용하거나, 다른 淸熱 효능을 가진 약재의 대체 약재로써 지칭개를 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 LPS 처치로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 지칭개의 클로로포름 추출물 (HLE)의 항염증 효능과 기전에 대한 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 HLE의 전 처치는 NO 생성을 억제하였으며, LPS에 의하여 감소된 세포 생존율을 변화시키지 않았다.
2. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 HLE의 전 처치는 iNOS와 COX-2의 발현을 단백질과 mRNA 수준에서 모두 감소시켰다.
3. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 HLE의 전 처치는 염증성 cytokine의 발현 및 mRNA의 증가를 억제하였다.
4. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 HLE은

LPS에 의하여 증가한 I κ B α 와 p65의 인산화를 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 2018년도 한국연구재단 (NRF-2018R1A2B6007514, 2018R1A5A2025272)의 연구개발비 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Pathologic basis of disease, 7th ed. Philadelphia:WB Saunders Company. 2006:47-86.
2. Andreaskos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? Immunol Rev. 2004;202:250-65.
3. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Kuby Immunology. 6th ed. New York:Freeman press. 2007:57-73.
4. Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. Trends Mol Med. 2007;13(11):460-9.
5. BS Jung, MK Shin. Encyclopedia of illustrated Korean natural drugs. 1st ed. Seoul:Yeong Lim Sa. 1990:1053-4.
6. Kim CM, Shin MG, An DG, Lee KS. Unabridged Dictionary of Chinese Medicine. Seoul:Jungdam. 1997:1091-2.
7. Jang DS, Yang MS, Park KH. Sesquiterpene lactone from *Hemisteptia lyrata*. Planta Med. 1998;64(3):289-90.
8. Jang DS, Yang MS, Ha TJ, Park KH. Hemistepsins with cytotoxic activity from *Hemisteptia lyrata*. Planta Med. 1999;65(8):765-6.
9. Ha TJ, Lee KD, Lee JR, Lee J, Park KH, Yang MS. Studies on the constituents from Flowers of *Hemisteptia lyrata* (Bunge) (I). Kor J Pharmacogn. 2001;32(3):238-41.

10. Ha TJ, Jang DS, Lee KD, Lee JR, Park KH, Yang MS, Studies on the constituents from Flowers of *Hemisteptia lyrata* (Bunge) (II). Kor J Pharmacogn. 2002;33(2):92-5.
11. Jang DS, Park KH, Lee JR, Ha TJ, Park YB, Nam SH, et al. Antimicrobial Activities of Sesquiterpene Lactones Isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol. 1999;42(2):176-9.
12. Lee JR, Jung DH, Park MK. Antifungal Activities of Hemistepsin A and B Isolated from *Hemistepita lyrata* Bunge against Dandruff-causing Microbe *Malassezia obtusa*. Kor Soc Biotechnol Bioeng. 2013;28(2):74-9.
13. Kim JK, Lee JE, Jung EH, Jung JY, Jung DH, Ku SK, et al. Hemistepsin A ameliorates acute inflammation in macrophages via inhibition of nuclear factor- κ B and activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. Food Chem Toxicol. 2018;111:176-88.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 2001;25(4):402-8.
15. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(6):a001651.
16. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. Int Immunopharmacol. 2001;1(8):1397-406.
17. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene. 1999;18(55):7908-16.
18. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017;2:17023.
19. Merfort I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. Curr Drug Targets. 2011;12(11):1560-73.
20. Garcia-Pineros AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL, Merfort I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. J Biol Chem. 2001;276(43):39713-20.
21. Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. J Biol Chem. 1998;273(50):33508-16.