



Original Article / 원저

Lipopolysaccharide로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 Nrf2/HO-1 경로 활성화를 통한 십육미류기음(十六味流氣飲) 추출물의 항염증 및 항산화 효과

권다혜^{1,2}, 황보현^{1,2}, 김민영^{1,2}, 지선영^{1,2}, 홍수현^{1,2}, 박철³, 황혜진⁴, 최영현^{1,2,*}

¹동의대학교 항노화연구소, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, ⁴동의대학교 의료·보건·생활대학 식품영양학과

Sipyukmiryuki-eum Exhibits Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effect via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Macrophages

Da Hye Kwon^{1,2}, Hyun Hwang-Bo^{1,2}, Min Young Kim^{1,2}, Seon Yeong Ji^{1,2}, Su Hyun Hong^{1,2}, Cheol Park³, Hye-Jin Hwang⁴, Yung Hyun Choi^{1,2,*}

¹Anti-Aging Research Center, Dong-eui University

²Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine

³Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dong-eui University

⁴Department of Food and Nutrition, College of Nursing, Healthcare Sciences & Human Ecology, Dong-eui University

ABSTRACT

Inflammatory and oxidative stimuli play a critical role not only in the process of transforming normal cells into cancer cells, but also in the proliferation process of cancer cells. Sipyukmiryukieum (SYMRKU), a traditional Korean herb-combined remedy, is composed of 16 kinds of herbal medicines, which were recorded for "Ongjeo" treatment in "Dongeuibogam". In this study, we investigated the inhibitory effect of SYMRKU against inflammatory and oxidative responses in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. Our results showed that SYMRKU significantly inhibited LPS-induced secretion of pro-inflammatory mediators including nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ without showing any significant cytotoxicity. Consistent with these results, SYMRKU down-regulated

© 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.

LPS-induced expression of their regulatory enzymes such as inducible NO synthase and cyclooxygenase-2. SYMRKU also inhibited LPS-induced production and expression of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6. In addition, SYMRKU significantly reduced the production of reactive oxygen species by LPS and showed a strong, which was associated with induction of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and heme oxygenase-1 expression. Although further studies are needed to fully understand the anti-inflammatory effects associated with the antioxidant capacity of SYMRKU, the findings of the current study suggest that SYMRKU may have potential benefits by inhibiting the onset and/or treatment of inflammatory and/or oxidative diseases.

Key words : Sipyukmiryukieum, RAW 264.7 macrophages, anti-inflammation, antioxidant, Nrf2/HO-1.

I. 서론

염증은 다양한 염증 매개인자나 염증성 cytokine을 분비함으로써 물리적 및 화학적 손상에 대한 생체 기능을 회복하려는 방어기전 중 하나이다¹⁾. 그러나 과도한 염증반응은 조직 손상을 유발하여 암과 퇴행성 질환을 포함한 다양한 질환의 발병과 이환을 촉진시킬 수 있다²⁾. 그람음성세균 표층의 peptidoglycan을 둘러싸는 외막의 중요 구성성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 대표적인 염증매개물질로서, Toll-like receptors (TLRs)를 매개로 대식세포의 과도한 활성을 유발한다. 이에 따라 과다 활성화된 대식세포는 inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현을 유도하여 대표적인 염증 매개인자인 NO 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성의 촉진과 함께 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 및 IL-6과 같은 염증성 cytokine의 생성을 증가시킨다³⁻⁵⁾. 또한 LPS는 reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen species (RNS)의 생성도 증가시켜 체내 염증뿐만 아니라 항산화 방어계의 불균형과 산화적인 스트레스를 유발하여 생체 손상 및 다양한 질병의 원인 인자로서 작용한다⁶⁻⁸⁾. 최근 큰 관심을 가지는 대표적인 항산화 효소로 알려진 heme oxygenase (HO)-1, NAD(P)H dehydrogenase 1 (NQO1) 및 thioredoxin reductase 1 (TrxR1) 등은 산화적 스트레스를 보호하는 중요한 기전 중 하나로서 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 중요한 역할을 하며, 이들은 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)의 전사활성에 의하여 조절된다^{9,10)}.

한편 전통적으로 사용되어 온 한방복합처방은 오랫동안 임상적 사용을 거쳐 그 치료 효능을 입증 받고 있으나, 그에 관련된 정확한 기전 연구는 여전히 미비한 실정이다. 따라서 임상적 효능에 대한 근거 제공을 위해 이들 처방전의 효능을 현대 의학적 차원에서 재고찰하는 시도는 필수적으로 수행되어야 한다. 십육미류기음(十六味流氣飲)은 감초(甘草), 길경(桔梗), 당귀(當歸), 목향(木香), 방풍(防風), 작약(芍藥), 백지(白芷), 빈랑(檳榔), 오약(烏藥), 육계(肉桂), 인삼(人蔘), 자소엽(紫蘇葉), 지각(枳殼), 천궁(川芎), 황기(黃芪)와 후박(厚朴)을 포함한 16개의 한약재로 구성되며, 고금도서집성 의부전록(古今圖書集成 醫部全錄)에 처음 수록된 처방으로 주로 유암(乳巖)을 치료하는 방제(方劑)로 기술되어 있다¹¹⁾. 현재까지 십육미류기음에 대한 효능 연구로서, 항산화 및 항균활성에 대한 연구¹²⁾, 갑상선 세포의 DNA와 cAMP의 합성 및 major histocompatibility complex-class II의 발현에 미치는 영향에 대한 연구¹³⁾, 항암 및 면역활성 효과에 대한 연구^{14,15)} 등이 이루어져 있지만, 항염증 활성에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 유도한 대식세포에서 염증성 매개인자 및 cytokine의 생성과 그와 관련된 조절 유전자들의 발현에 대해 검증하고, 산화적 스트레스 보호기전에 대한 추가적인 조사를 통해 십육미류기음 에탄올 추출물(ethanol extract of Sipyukmiryukieum, SYMRKU)의 약리적 효능을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

*Corresponding author : Yung Hyun Choi, Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036, E-mail : choiyh@deu.ac.kr

• Received : January 11, 2019 / Revised : February 8, 2019 / Accepted : February 11, 2019

1. 시료

실험에 사용한 십육미류기음 구성 한약재는 (주)서경한방약업사(Busan, Korea)에서 구입하였으며, 이들의 본초명, 학명, 배합비는 Table 1에 나타내었다. 십육미류기음의 에탄올 추출물을 얻기 위하여, 준비된 한약재에 70% 에탄올을 가하여 40 KHz, 2시간 초음파 추출(ultrasonification extraction)하였으며, 여과한 후 용매를 Rotary evaporator (Eyela, A-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하고, 동결 건조하여 분말화하였다. 동결 건조 후, 건물 중량과 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 수득율을 계산하였으며, 29.90%의 수득율을 보였다. 준비된 십육미류기음 에탄올 추출물(SYMRKU)은 dimethyl sulfoxide (DMSO, AMRESCO Inc., Solon, OH, USA)에 용해한 후, 100 mg/ml stock solution을 만들어 세포 배양용 배지에 적절하게 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 세포배양

RAW 264.7 대식세포는 American Type Culture Collections (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, WELGENE, Daegu, Korea)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (WELGENE)을 사용하여, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

3. 세포 독성 측정

십육미류기음 추출물의 세포독성 여부를 조사하기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 다양한 농도(0-200 µg/ml)로 처리하거나, 적정 농도(0-80 µg/ml)의 십육미류기음 추출물을 1시간 전 처리한 후 100 ng/ml의 LPS (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배지를 제거하고 0.5 mg/ml 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 시약을 넣고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 반응시켰다. 2시간 후, 배지를 제거하고, DMSO로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 540 nm에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도 변화를 측정하였다. 각 세포에 대한 독성은 대조군 기준으로

백분율로 나타내었다. 아울러 십육미류기음과 LPS 처리에 따른 RAW 264.7 대식세포의 형태적 변화는 위상차 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

4. NO 함량 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 NO의 생성에 미치는 십육미류기음 추출물의 효과를 조사하기 위하여, 십육미류기음 추출물을 1시간 전 처리한 후 100 ng/ml의 LPS를 24시간 처리하여 배양된 배지 상층액을 수집하였다. 상층액에 동량의 Griess reagent (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도 변화를 측정하였으며, sodium nitrite (NaNO₂) 표준곡선을 작성하여 NO 함량을 계산하였다.

5. PGE₂ 및 염증성 cytokine 함량 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 염증성 매개인자 및 cytokine의 생성에 미치는 십육미류기음 추출물의 효과를 조사하기 위하여, 십육미류기음 추출물을 1시간 전 처리한 후 100 ng/ml의 LPS를 24시간 동안 처리 후 배지 상층액을 모아주었다. PGE₂의 함량은 PGE₂ ELISA kit (Cayman Chemical Co., AnnArbor, MI, USA)을 이용하였으며 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 함량 역시 해당 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제시된 실험 방법에 준하여 실험을 수행하였다.

6. ROS 함량 측정

LPS에 의한 ROS의 생성에 미치는 십육미류기음 추출물의 영향을 조사하기 위하여 2',7'-di-chlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)를 사용하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 대식세포를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후에 80 µg/ml의 십육미류기음 추출물을 1시간 전 처리하였고, 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 6시간 배양하였다. 양성 대조군으로는 10 mM의 N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 사용하였다. 이들 세포에 10 µM의 H2DCF-DA (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하여 20분 반응시키고 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 ROS

의 생성량을 비교하였다. 형광 현미경 관찰에 의한 ROS 생산의 정도를 조사하기 위하여 coverslip에 부착된 세포에 동일 조건으로 십육미류기름 추출물, LPS 및 NAC를 처리한 후, 이들 세포를 H2DCF-DA로 염색하고, 4% paraformaldehyde으로 20분간 고정시킨 후 형광 현미경(Carl Zeiss)으로 관찰하였다.

7. 단백질 분리 및 Western blot analysis

준비된 세포에 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% Nonidet-P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol]를 적당량 첨가하여 4°C에서 1시간 반응시켰으며, 14,000 rpm, 30분 원심 분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. Bio-Rad 단백질 정량시약(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)으로 단백질을 정량한 다음, Laemli sample buffer (Bio-Rad Lab.)와 혼합하여 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, polyvinylidene difluoride membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 각각의 membrane을 5% skim milk를 1시간 처리하여 비 특이적인 단백질에 대해 차단시켰으며, 적정 1차 항체와 2차 항체를 각각 4°C에서 overnight, 상온에서 1시간 이상 시켰다. 본 연구에 사용된 항체들의 구입처, cat. No 및 희석배율은 Table 2에 나타내었다. 반응이 끝난 membrane을 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현을 분석하였다. 각각의 밴드는 ImageJ® software (version 1.50i; NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량화 하였으며, actin은 internal control로 사용하였다.

8. 통계학적인 분석

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 통계 프로그램을 이용하여 모든 실험결과를 평균 ± 표준편차 (mean ± SD)로 나타내었으며, p<0.05 수준에서 Student's t-test와 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 결과에 대한 유의성을 검증하였다.

III. 결과

1. RAW 264.7 대식세포에서 십육미류기름 추출물 및 LPS의 세포독성 평가

십육미류기름 에탄올 추출물의 세포독성 여부 및 실험에 적용할 농도의 설정을 위해 RAW 264.7 대식세포에 십육미류기름 추출물 단독 또는 LPS와 복합 처리한 후에 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A에 나타낸 결과에서 알 수 있듯이, 설정된 십육미류기름 추출물의 최고 농도인 200 µg/ml 처리군에서도 대조군에 비하여 유의적인 생존율 억제 현상이 관찰되지 않았다. 그러나 LPS의 존재 하에서 200 µg/ml의 십육미류기름 추출물은 약간의 생존력 저하를 보였기에 80 µg/ml을 최고농도로 설정하였다. 세포 형태 변화 관찰의 결과에서 LPS만을 단독으로 처리한 경우, 대식세포의 활성을 의미하는 분지 형성이 뚜렷하게 증가되었으나, 십육미류기름 추출물 처리 농도 의존적으로 이러한 세포의 형태적 변화가 사라졌다 (Fig. 1B). 이러한 결과는 세포독성이 없는 조건에서 십육미류기름 추출물이 대식세포 활성 억제능을 가질 수 있을 가능성을 보여주는 것이다.

2. LPS에 의한 염증성 매개인자의 생성에 미치는 십육미류기름 추출물의 영향

십육미류기름 추출물의 항염증 효능을 평가하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에 십육미류기름 추출물 단독 또는 LPS와 복합 처리한 후에 NO와 PGE₂와 같은 염증성 매개인자의 생성 정도를 비교하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이, LPS 단독 처리군에서 두 인자의 생성 정도가 대조군에 비하여 매우 증가되었지만, 십육미류기름 추출물이 전처리된 조건에서 배양된 세포에서는 십육미류기름 추출물 처리 농도 의존적으로 모두 유의적으로 감소되었다. 이러한 NO와 PGE₂의 생성 억제 효과가 이들 생성에 관여하는 효소들의 발현 저하에 의한 것인지를 조사하기 위하여 iNOS 및 COX-2의 발현 변화를 조사한 결과, LPS 단독 처리군에서 증가된 두 효소의 단백질 발현 수준이 십육미류기름 추출물 전처리에 의하여 모두 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). 이상의 결과는 십육미류기름 추출물에 의한 NO와 PGE₂의 생성 억제체가 iNOS 및 COX-2 발현의 저하에 의한 것임을 의미한다.

3. LPS에 의한 염증성 cytokine의 생성에 미치는 십육미류기음 추출물의 영향

동일 조건에서 배양된 RAW 264.7 대식세포에서 염증성 cytokine 생성 변화 여부를 조사한 결과, LPS에 의하여 증가된 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6과 같은 염증성 cytokine 생성량이 십육미류기음 추출물 전처리에 의하여 모두 억제되었다(Fig. 4). 아울러 LPS에 의하여 증가된 이들 단백질의 발현 또한 십육미류기음 추출물에 의하여 모두 감소되었으며, 십육미류기음 추출물에 의한 염증성 cytokine의 생성 억제 또한 해당 유전자들의 발현 감소에 기인한 것임을 알 수 있었다.

4. LPS에 의한 ROS의 생성에 미치는 십육미류기음 추출물의 영향

다음은 십육미류기음 추출물의 항산화 효능을 평가하기 위하여 ROS의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 6에 나타낸 바와 같이, LPS 단독 처리군에서는 ROS의 생성을 나타내는 형광 강도가 매우 뚜렷하게 증가되었지만, 십육미류기음 추출물의 존재 하에서는 형광 강도가 대조군 수준으로 매우 약하게 관찰되었고, flow cytometry 분석을 통한 정량적 평가에서도 유사한 결과를 보였다. 아울러 대표적인 ROS scavenger인 NAC의 전처리군에서도 LPS에 의한 ROS의 생성이 거의 완벽하게 차단되었으며, NAC과 비교하여 볼 때 십육미류기음 추출물이 항염증 효과와 더불어 강력한 항산화력을 가지고 있음을 보여 주었다.

5. Nrf2 신호계에 미치는 십육미류기음 추출물의 영향

이상에서 관찰된 십육미류기음 추출물의 항산화력이 생체 내 대표적인 항산화 시스템인 Nrf2 신호계와 연관되어 있는지의 여부를 평가하였다. Fig. 7의 immunoblotting의 결과에서 알 수 있듯이, 십육미류기음 추출물이 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 Nrf2의 발현이 십육미류기음 추출물 처리 시간 및 농도 의존적으로 점차 증가되었다. 그러나 Nrf2의 억제자인 Kelch-like-ECH-associated protein 1 (Keap1)의 발현은 억제되었으며, Nrf2의 대표적인 downstream 유전자인 HO-1의 발현은 증가되었다. 이러한 결과는 십육미류기음 추출물이 LPS로 유도된 ROS 생성을 억제하는 항산화력이 최소한 Nrf2/HO-1 신호

계의 활성화와 연관성이 있음을 의미한다.

IV. 고찰

생체 내에서 초기 염증반응은 외부의 감염으로부터 방어기전으로 작용하지만, 과도한 염증반응은 다양한 질병 유발 및 촉진 매개체로 작용할 수 있다²⁻⁵). 대표적인 염증매개물질인 LPS 자극에 따라 대식세포가 과도하게 활성화되면 조직손상, 생체조직 괴사 등의 악영향을 미치게 되고, iNOS와 COX-2에 의해 생성되는 NO 및 PGE₂와 같은 염증성 매개인자들을 분비하게 된다^{1,3-5}). 또한 염증성 cytokine은 iNOS와 COX-2의 발현을 자극하며 NO와 PGE₂의 생성을 유의하게 증가시킨다¹⁶⁻¹⁷). 따라서 iNOS와 COX-2의 억제를 통한 NO와 PGE₂의 생성 억제와 염증성 cytokine의 발현 차단은 항염증제의 개발에서 고려되어야 할 가장 중요한 요소이다^{1,3,18}). 특히 대식세포에서 LPS에 의한 TLR4의 활성화에 따른 과도한 염증 반응과 함께 ROS 생성을 통한 산화적 스트레스를 동시에 유발한다¹⁹⁻²²).

본 연구에서는 십육미류기음(十六味流氣飲)의 항염증 효능을 규명하기 위하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포 모델을 이용하였으며, 염증성 매개인자 및 cytokine의 생성에 미치는 효과를 평가하였다. 먼저 RAW 264.7 대식세포의 형태적 변화 관찰에서, 십육미류기음 에탄올 추출물이 독성이 없는 조건에서 LPS에 의한 대식세포 활성을 억제시켰을 가능성을 보여주었다. 또한 LPS에 노출된 RAW 264.7 대식세포에서 증가된 NO와 PGE₂의 생성을 현저하게 억제되었으며, 이는 iNOS 및 COX-2의 발현 감소와 연관성이 있었다. 십육미류기음은 또한 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6과 같은 염증성 cytokine의 생성 및 발현을 현저하게 억제시켰다.

한편 ROS는 세포 내 단백질, 지질 및 핵산을 포함한 여러 생체물질들의 변형을 유발하여 세포 항상성을 저하시키고, 암, 동맥경화, 염증과 당뇨 등 다양한 질환을 일으키는 원인이 된다²³⁻²⁵). 또한 LPS는 RNS의 생성도 증가시켜 체내 염증 반응뿐만 아니라 항산화 방어계의 불균형으로 인해 산화적인 스트레스를 촉진한다⁶⁻⁸). 따라서 LPS에 의한 산화적 스트레스에 미치는 십육미류기음 추출물의 영향을 조사한

결과, 대표적인 ROS scavenger인 NAC과 유사하게 십육미류기음 추출물은 LPS에 의한 ROS의 생성을 거의 완벽하게 차단하였다. 따라서 십육미류기음 추출물은 LPS로 유도된 염증반응뿐 만 아니라 산화적인 스트레스의 완화에도 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

이러한 십육미류기음 추출물의 항산화 효능이 세포 내 항산화 시스템과의 연계성이 있는지를 조사하기 위하여 대표적인 항산화 효소계로 최근 많은 연구의 대상이 되고 있는 Nrf2 신호계에 미치는 영향을 조사하였다. 정상적인 조건에서 전사인자인 Nrf2는 Keap1과의 결합을 통하여 비활성 복합체로서 세포질 내에 존재한다²⁶⁻²⁷). 하지만 Keap1의 분해에 따른 Nrf2가 핵으로의 이동으로 antioxidant response element에 결합함으로써 HO-1, NQO1 및 TrxR1 등과 같은 항산화 효소의 전사활성을 촉진시킨다⁹⁻¹⁰). 특히 HO-1은 heme을 bilirubin, 유리 철 및 일산화탄소로 분해하는 것을 촉진하는 유도성 속도 제한 효소로서²⁸⁻²⁹), heme의 최종 이화작용 산물들은 세포 내 ROS 중화에 핵심적인 역할을 한다³⁰⁻³¹). 본 연구의 결과에 의하면, RAW 264.7 대식세포에서 Nrf2와 HO-1의 발현이 십육미류기음 추출물 처리 농도 및 시간 의존적으로 증가된 반면, Keap1의 발현은 반대로 감소되었다. 비록 십육미류기음 추출물에 의한 Nrf2의 전사활성 조절에 대한 추가적인 연구가 이루어져야겠지만, 이상의 결과는 십육미류기음 추출물의 항산화 작용에 Nrf2/HO-1 신호계가 최소한 관여할 가능성을 보여 주는 것이다. 결론적으로, 본 연구의 결과에서 십육미류기음 추출물은 다양한 질환의 발병과 진행의 촉진에 영향을 주는 염증성 및 산화적 스트레스를 억제할 수 있음을 보여주었다. 비록 LPS의 자극에 의한 결과가 이러한 효능을 대별할 수는 없으나, 이상의 결과는 염증성 반응의 억제와 항산화계의 활성을 위한 십육미류기음 추출물의 적용 가능성을 제시하여 준다.

V. 결론

염증성 및 산화적 자극은 정상세포가 암세포로 형질전환 과정뿐만 아니라 암세포의 증식 촉진에도 중요한 역할을 한다. 동의보감에 기술된 십육미류기음(十六味流氣飲)은 유암 치료 처방전의 하나로서 16가

지 한약재로 구성되어 있다. 본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 염증성 및 산화적 반응에 대한 십육미류기음의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 십육미류기음은 유의적인 세포독성을 나타내지 않는 범위에서 LPS에 의한 NO와 PGE₂와 같은 염증성 매개인자들의 생성을 억제하였으며, 이는 iNOS 및 COX-2의 발현 감소와 연관성이 있었다. 십육미류기음은 또한 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6과 같은 염증성 cytokine의 생성 및 발현을 현저하게 억제시켰다. 아울러 십육미류기음은 LPS에 의해 유도된 ROS의 생성을 효과적으로 차단하였으며, 이는 Nrf2와 HO-1의 발현 증가와 관련이 있었다. 십육미류기음의 항산화 능력과 관련된 항염증 효과를 이해하기 위한 추가 연구가 필요하지만, 본 연구의 결과는 십육미류기음이 염증성 및 산화성 연관 질환의 발병 또는 치료에 적용 가능한 잠재력을 지니고 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(2015R1A2A2A01004633 및 2018R1A2B2005705)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. Giudice A., Arra C, Turco MC, Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents: *Methods Mol Biol.* 2010;647:37-74.
2. Brown KL, Cosseau C, Gardy JL, Hancock RE, Complexities of targeting innate immunity to treat infection: *Trends Immunol.* 2007;28: 260-6.
3. Albina JE, Reichner JS, Nitric oxide in inflammation and immunity: *New Horizons.* 1995;3:46-64.
4. Lee SJ, Lim KT, Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1 β and interleukin-6 *via* p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells:

- Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008;377:45-54.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA, Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide: J Biol Chem. 1991;266:4244-4250.
 - Houde V, Grenier D, Chandad F, Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens: J Periodontol. 2006;77:1371-79.
 - Luster MI, Inflammation, tumor necrosis factor, and toxicology: Environ Health Perspect. 1998;106:A418-A419.
 - Sies H, Oxidative stress: from basic research to clinical application: Am J Med. 1991;30:315-85.
 - Park SJ, Kim YW, Park MK, Byun SH, Kim SC, Lee JR, Anti-inflammatory steroid from *Phragmitis rhizoma* modulates LPS-mediated signaling through inhibition of NF- κ B pathway: Inflammation. 2015;39:727-34.
 - Zhao CR, Gao ZH, Qu XJ, Nrf2-Are signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. Cancer Epidemiol. 2010;34:523-33.
 - 陳夢雷等, 古今圖書集成 醫部全錄: 9 冊, 北京: 人民衛生出版社. 1983:54:135.
 - Choi EO, Son DH, Kim MY, Hwang-Bo H, Kim HJ, Jeong JW, Hong SH, Park C, Choi YH, Anti-oxidant and anti-microbial activities of herb-combined remedies used in traditional Korean medicine for treating breast cancer. J Life Sci. 2016;26:680-88.
 - Yi JE, Kim BW, Effects of Sipyukmiyukieum on DNA synthesis, cAMP synthesis and MHC-class II expression of FRTL-5 thyroid cells. Kor J Intern Med. 2005;26:398-408.
 - Jung YC, Park YS, Kim DC, Shipyeukmiyeugi-eum extracts suppressed tumor growth through immunomodulatory effects on MCF-7. J Orient Obstet. 2012;25:40-60.
 - Shim SH, Influences on the anticancer and inhibitive effects of the secondary effects by anticarcinogen of Shibyukmiyuki-eum. Master Degree Thesis of Dongshin University. 2003.
 - Golden BD, Abramson SB, Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. Rheum Dis Clin North Am. 1999;25:359-78.
 - Goodwin JS, Ceuppens J, Regulation of the immune response by prostaglandins. J Clin Immunol. 1983;3:295-315.
 - Denizot F, Langm R, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986;89:271-77.
 - Kim JK, Lee JE, Jung EH, Jung JY, Jung DH, Ku SK, Cho IJ, Kim SC, 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. 2017;111:176-188.
 - Kong L, Ge BX, MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis. Cell Res. 2008;18:745-55.
 - Su H, Kong C, Zhu L, Huang Q, Luo L, Wang H, Xu Y, PPE26 induces TLR2-dependent activation of macrophages and drives Th1-type T-cell immunity by triggering the cross-talk of multiple pathways involved in the host response. Oncotarget. 2015;6:38517-54.
 - Willoughby DA, Heberden Oration, 1974, Human arthritis applied to animal models, Towards a better therapy: Ann Rheum Dis. 1975;34:471-78.
 - Barbouti A, Doulias PT, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D, DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. Free Radic Biol Med. 2002;33:691-702.
 - Jang JR, Hwang SY, Lim SY, Effects of

- extracts from dried Yam on antioxidant and growth of human cancer cell lines. *J Life Sci.* 2010;20:1365-72.
25. Lee JH, Lee SR, Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods: *Kor J Food Sci Technol.* 1994;116:310-16.
 26. Huang BP, Lin CH, Chen HM, Lin JT, Cheng YF, Kao SH, AMPK activation inhibits expression of proinflammatory mediators through downregulation of PI3K/p38 MAPK and NF- κ B signaling in murine macrophages. *DNA Cell Biology.* 2015;34:133-74.
 27. Kang KA, Hyun JW, Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance. *Toxicol Res.* 2017;33:1-5
 28. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1997;80:557-621.
 29. Keyse SM, Tyrrell RM, Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:99-103.
 30. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem.* 1997;272:5375-81.
 31. Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R, The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.* 1989;245:173-6.

Table 1. The composition of Sipyukmiryukieum

Korean (Chinese) name	Pharmaceutical name	Dose (g)
감초(甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	2
길경(桔梗)	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC	1.2
당귀(當歸)	<i>Angelica gigas</i> Nakai	4
목향(木香)	<i>Inula helenium</i> L.	2
방풍(防風)	<i>Ledebouriella seseloides</i> (Hoffm.) Wolff	2
작약(芍藥)	<i>Paeonia japonica</i> (Makino) Miyabe & Takeda	2
백지(白芷)	<i>Angelicae dahuricae</i> Radix	2
빈랑(檳榔)	<i>Areca catechu</i> Linné (Palmae)	2
오약(烏藥)	<i>Lindera strichnifolia</i> Fernandez-Villar	2
육계(肉桂)	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	2
인삼(人蔘)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	4
자소엽(紫蘇葉)	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton	6
지각(枳殼)	<i>Poncirus trifoliata</i> Rafin	2
천궁(川芎)	<i>Cnidium officinale</i> Makino	2
황기(黃芪)	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	4
후박(厚朴)	<i>Machilus thunbergii</i> Siebold & Zucc.	2
Total Amounts		41.2

Table 2. Primary and secondary antibodies used for immunoblotting.

Antibody	Manufacturer	Item No.	Dilution
iNOS	BD Biosciences	610333	1:1,000
COX-2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-19999	1:500
TNF- α	Cell signaling Technology	3707S	1:1,000
IL-1 β	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-32294	1:1,000
IL-6	Abcam, Inc.	ab6672	1:1,000
HO-1	Merck Milipore	374090	1:1,000
Nrf2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-13032	1:1,000
Keap 1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-15246	1:1,000
Actin	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-1615	1:1,000
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005	1:5,000
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2004	1:5,000
Bovine anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2350	1:5,000

Figure legends

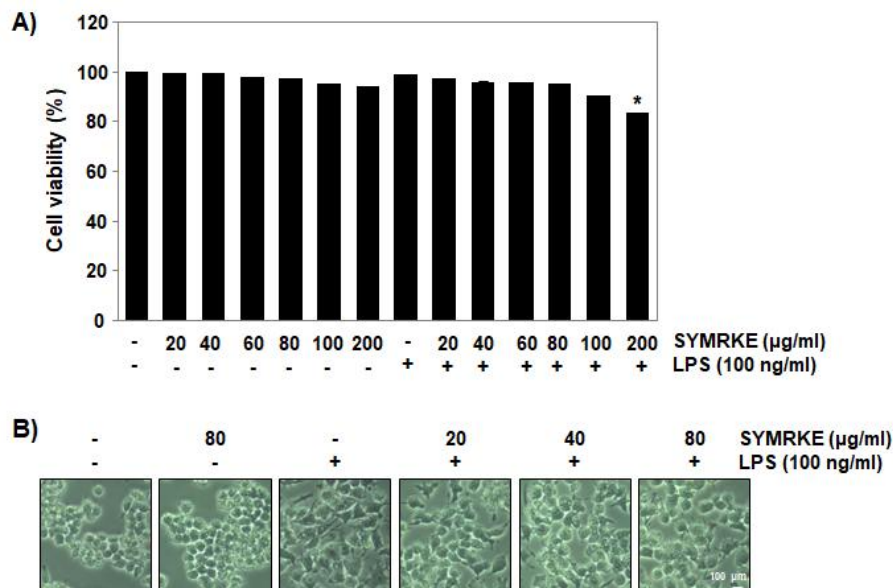


Figure 1. Effects of SYMRKE on the cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Cultured RAW 264.7 macrophages were treated with various concentrations of SYMRKE for 24 h or pre-treated with indicated concentrations of SYMRKE for 1 h prior to treatment with 100 ng/ml LPS for 24 h. (A) Cell viability was assessed by MTT assay. Results are expressed as the percentage of surviving cells over control cells (no addition of SYMRKE or LPS). Values represent the mean \pm SD of three independent experiments (* p < 0.05 compared to control). (B) After treatment, cell images were obtained using an inverted microscope (original magnification, 200 \times). These images are representative of at least three independent experiments.

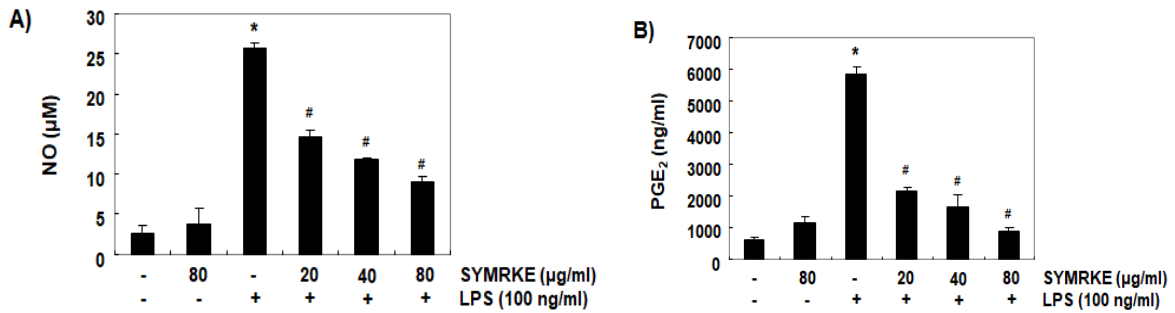


Figure 2. Effects of SYMRKE on LPS-induced production NO and PGE₂ in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with the indicated concentrations of SYMRKE for 1 h prior to incubation with 100 ng/ml LPS for 24 h. The levels of NO (A) and PGE₂ (B) in culture media were measured by Griess assay and a commercial ELISA kit, respectively. Each value indicates the mean \pm SD as representative result obtained from three independent experiments (* p < 0.05 compared to control; # p < 0.05 compared to cells cultured with 100 ng/ml LPS).

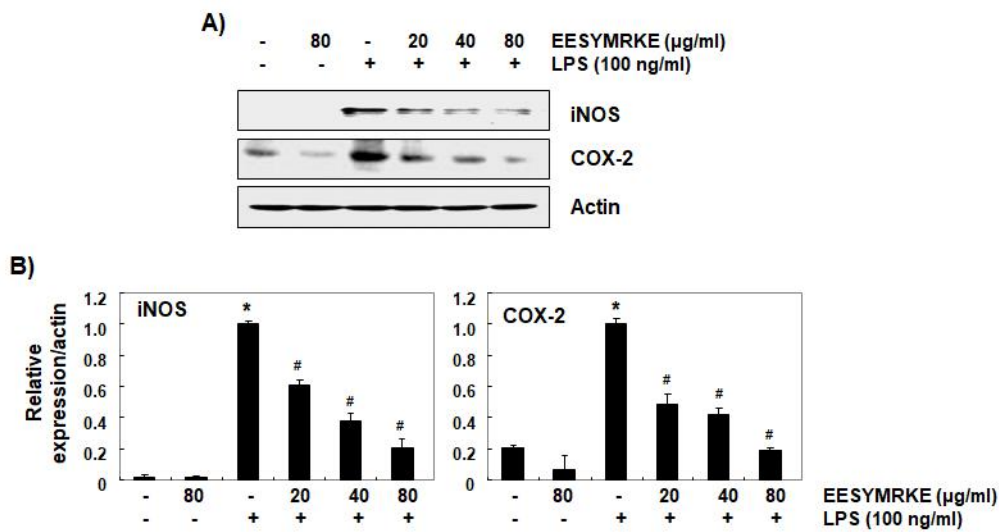


Figure 3. Effects of SYMRKE on LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with the indicated concentrations of SYMRKE for 1 h prior to incubation with 100 ng/ml LPS for 24 h. (A) Expression of iNOS and COX-2 at protein levels determined by Western blot analysis with cell lysates using anti-iNOS and anti-COX-2 antibodies and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Bands were quantified using ImageJ, normalized to actin and ratios were determined. Data are presented as the means \pm SD obtained from three independent experiments (* p < 0.05 compared with the control group; # p < 0.05 compared with the LPS group).

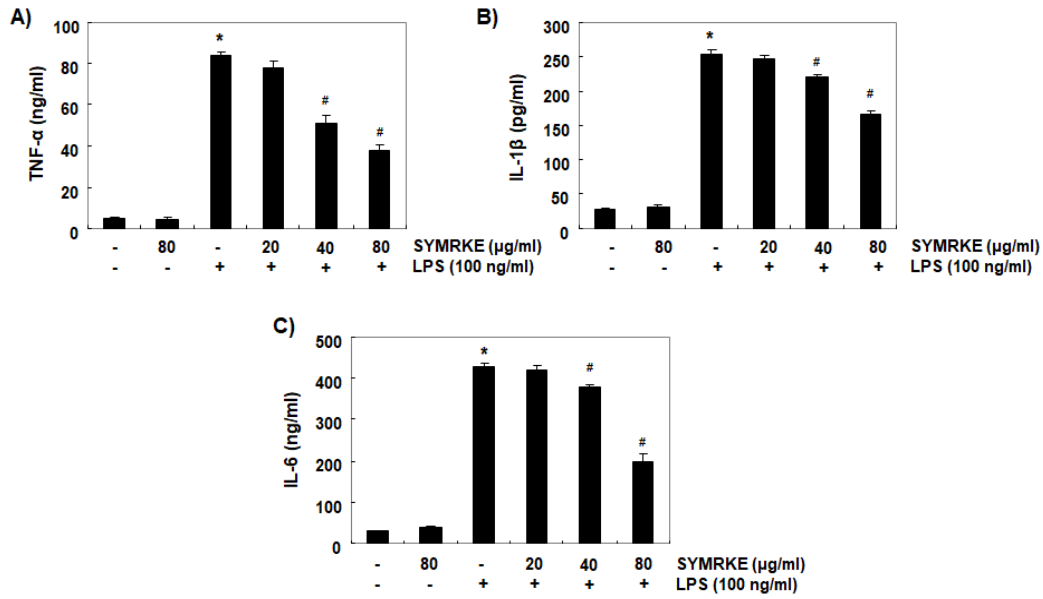


Figure 4. Inhibition of LPS-induced production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by SYMRKE in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with various concentrations of SYMRKE for 1 h followed by treatment with 100 ng/ml LPS for 24 h. The levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) present in the supernatants were measured using the corresponding ELISA kits. Each value indicates the mean \pm SD as representative result obtained from three independent experiments (* p < 0.05 compared to control; # p < 0.05 compared to cells cultured with 100 ng/ml LPS).

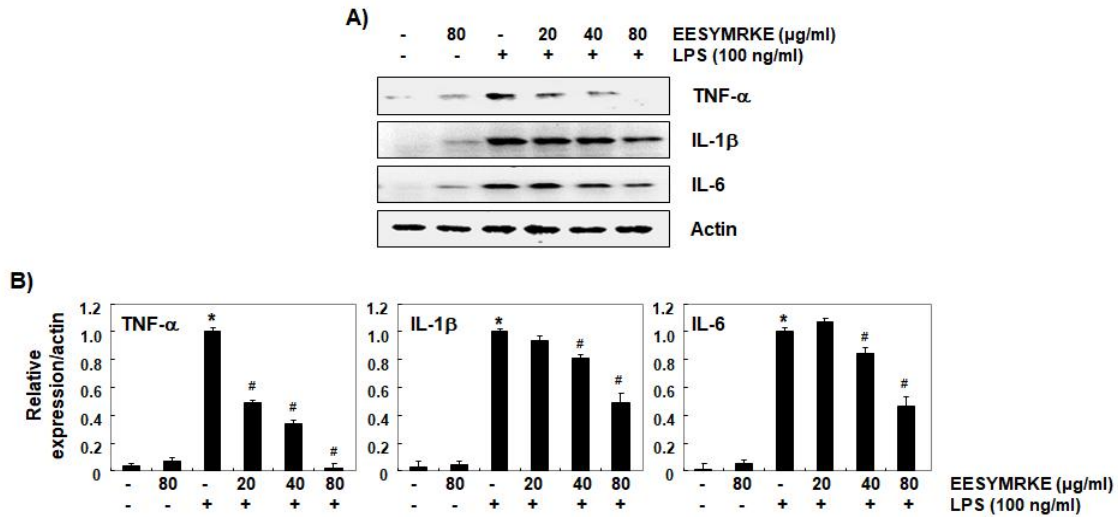


Figure 5. Inhibition of LPS-induced expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by SYMRKE in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with various concentrations of SYMRKE for 1 h followed by treatment with 100 ng/ml LPS for 24 h. (A) The protein levels of each cytokine were determined by Western blot analysis using the indicated antibodies and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Bands were quantified using ImageJ, normalized to actin and ratios were determined. Data are presented as the means \pm SD obtained from three independent experiments (* p < 0.05 compared with the control group; # p < 0.05 compared with the LPS group).

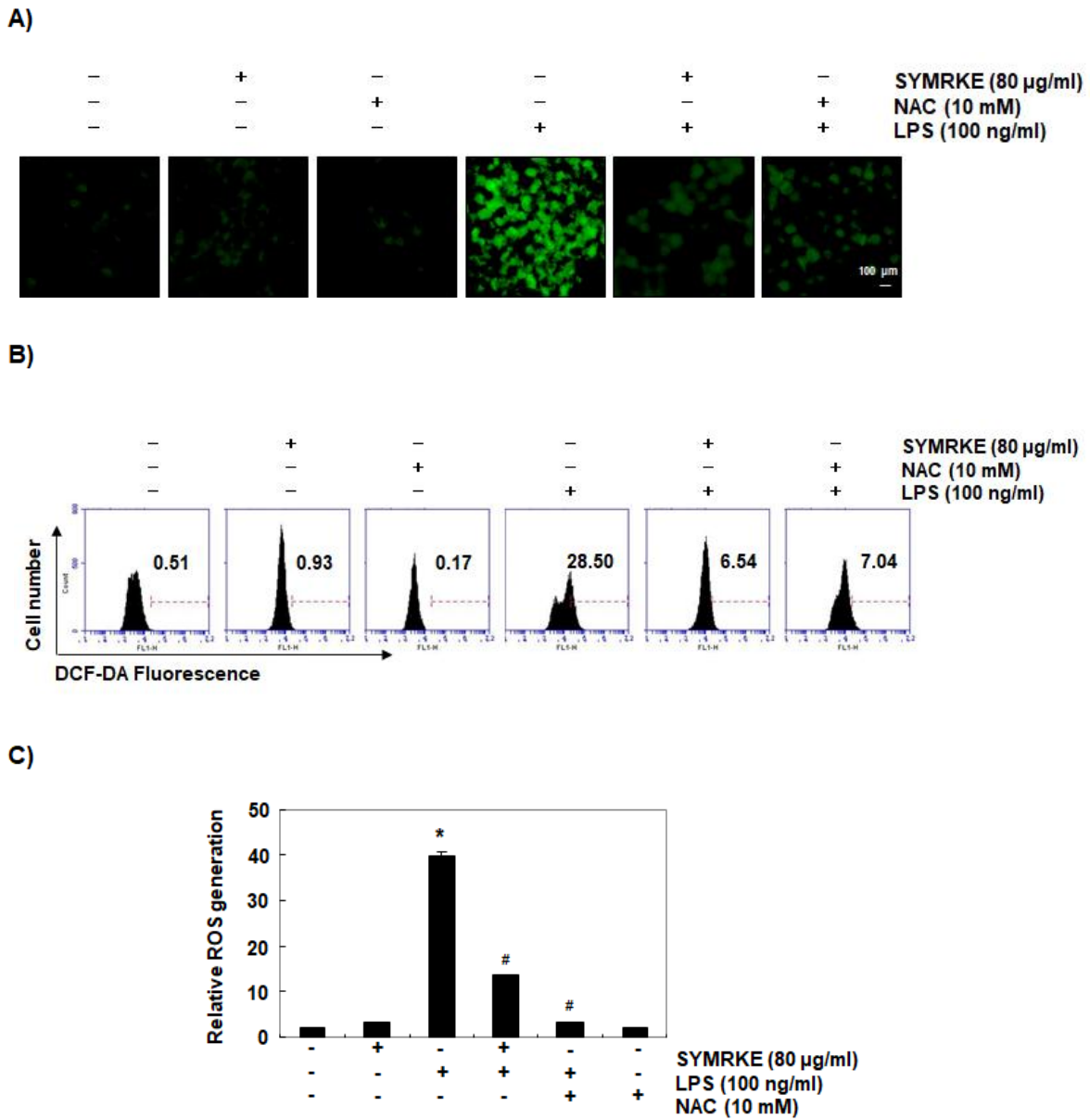


Figure 6. Suppression of LPS-induced ROS generation by SYMRKE in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with 80 µg/ml SYMRKE or 10 mM NAC for 1 h followed by stimulation with or without 100 ng/ml LPS for 6 h. (A) After staining with DCF-DA, images were obtained by fluorescence microscopy (original magnification, $\times 200$). These images are representatives of at least three independent experiments. (B) Cells were incubated with DCF-DA and DCF fluorescence was measured by flow cytometry. (C) Each value indicates the mean \pm SD as representative result obtained from three independent experiments using flow cytometry (* $p < 0.05$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to cells cultured with 100 ng/ml LPS).

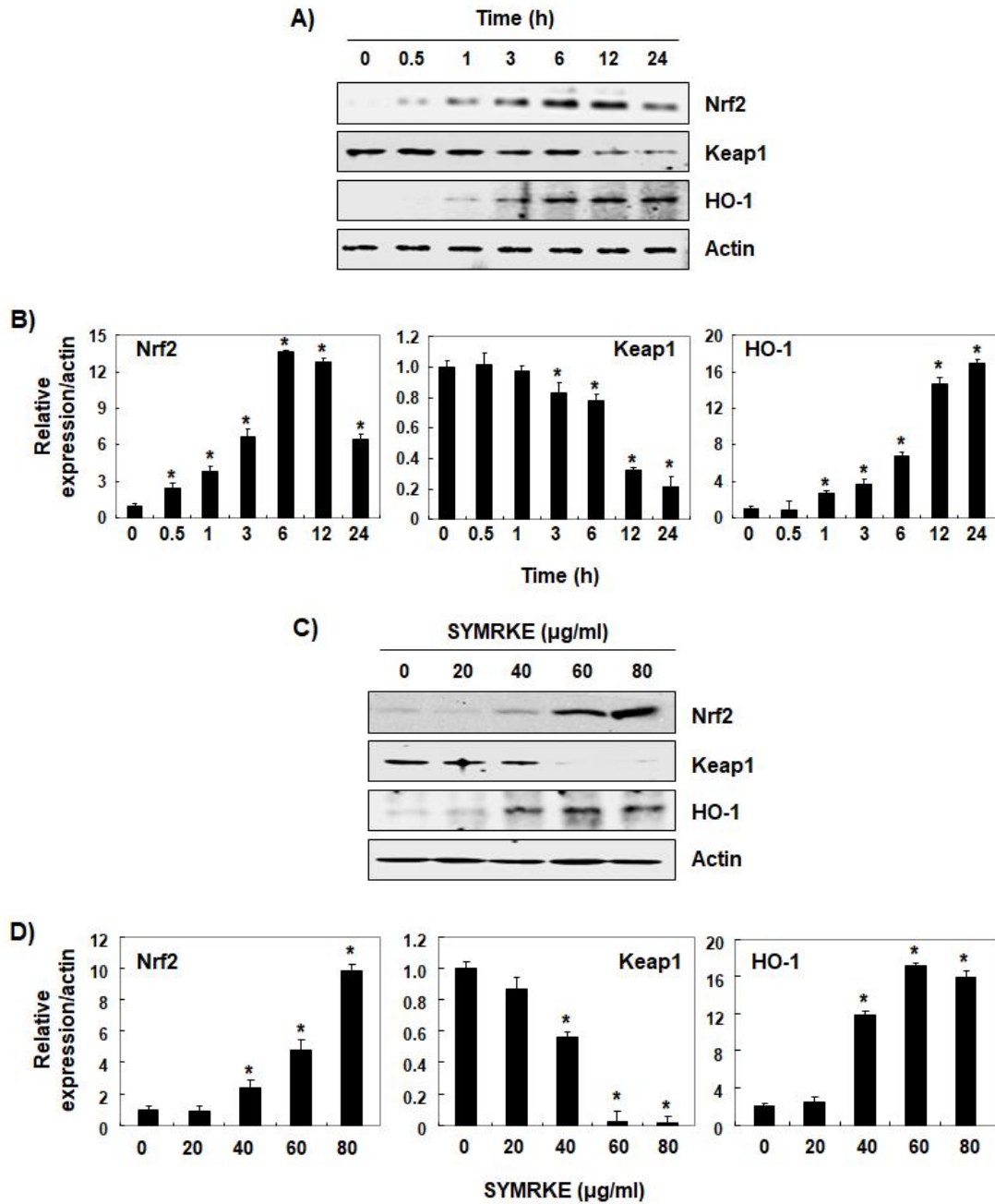


Figure 7. Effects of SYMRKE on the expression of Nrf2, Keap1 and HO-1 protein levels in RAW 264.7 macrophages. Cells were treated with 80 µg/ml SYMRKE for the indicated times (A and B) or treated with the indicated concentrations of SYMRKE for 24 h (C and D). (A and C) The protein levels of each cytokine were determined by Western blot analysis using the indicated antibodies and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B and D) Bands were quantified using ImageJ, normalized to actin and ratios were determined. Data are presented as the means \pm SD obtained from three independent experiments (* p <0.05 compared with the control group; # p <0.05 compared with the LPS group).