



Original Article / 원저

鬼箭羽의 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 염증억제효과

전창권, 박상미, 박정아, 변성희, 김상찬*

대구한의대학교 한의과대학

Anti-inflammatory effect of Euonymi Lignum Suberalatum in LPS-activated Raw 264.7 cells and CA-induced paw edema rat model

Chang Kwon Jeon, Sang Mi Park, Chung A Park, Sung Hui Byun, Sang Chan Kim*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

PURPOSE : Euonymi Lignum Suberalatum (EL) is the stem fin of *Euonymi alatus*. In traditional Korean medicine, EL is used for treatment of uterine bleeding, metritis and static blood. Recently, many studies have reported several pharmacological effects of EL including anticancer, antimicrobial, antidiabetic activity, and anti-oxidative stress. However, the mechanisms underlying anti-inflammatory effects by the EL is not established.

METHODS : To investigate anti-inflammatory effects of Euonymi Lignum Suberalatum Water (ELWE), Raw 264.7 cells were pre-treated with 10-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ELWE, and then exposed to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS. Levels of NO, IL-6, IL-1 β and TNF- α were detected by ELISA kit. Expression of pro-inflammatory proteins were determined by immunoblot analysis. To evaluate the anti-inflammatory effect *in vivo*, rat paw edema volume, and expressions of COX-2 and iNOS proteins in carrageenan (CA)-induced rat paw edema model.

RESULTS : NO production activated by LPS, was decreased by 30-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ELWE. Production of inflammatory mediators such as TNF- α , ILs, PGE₂ were decreased by ELWE 100 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In addition, ELWE reduced LPS-mediated iNOS and COX-2 expression. Moreover, ELWE increased I- κ B α expression in cytoplasm and decreased NF- κ B expression in nucleus. *In vivo* study, ELWE reduced the increases of paw swelling, and expression of iNOS and COX-2 proteins in paw edema induced by CA injection.

CONCLUSION : The results indicate that ELWE could inhibit the acute inflammatory response, via modulation of NF- κ B activation. Furthermore, inhibition of rat paw edema induced by CA is considered as clear evidence that ELWE may be a useful source to treat acute inflammation.

Key words : Euonymi Lignum Suberalatum, Anti-inflammatory effect, Cytokine, NF- κ B

I. 서론

鬼箭羽 (Euonymi Lignum Suberalatum)는 衛矛科 (노박덩굴과; Celastraceae)에 속한 낙엽관목인 화살나무 (*Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold)의 코르크층에 붙어 있는 翼狀物을 채취한 것으로, 우리나라 각지에 분포하고 있다. 鬼箭羽의 性味는 苦寒無毒하고 歸經은 肝經으로 破血, 通經, 殺蟲하는 효능이 있어 經閉, 癥瘕, 月經不順, 產後瘀滯腹痛, 跌打損傷, 蟲積腹痛을 치료한다^{1,2)}.

鬼箭羽는 衛茅, 鬼箭, 神箭, 六月凌, 山鷄條子, 四面戟, 八樹, 見腫消 등의 異名이 있으며, 근래에는 임상에서 肝癌과 子宮頸部癌 등의 癌腫을 치료에도 응용하고 있다^{3,4)}.

鬼箭羽의 성분으로는 epifriedelinol, stigmast-4-en-3-one, 6 β -hydroxy-stigmast-4-en-3-one, β -sitosterol, methyl 2, 4-dihydroxy-3, 6-dimethyl benzoate, methyl 2, 4-dihydroxy-6-methyl benzoate, 7-methoxy-4-methylphthalide, vanillin, n-octacosanol 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 귀전우의 약리작용으로는 혈당강하작용^{6,7)}, 진정작용, 항암작용⁸⁻¹⁰⁾, 항염증작용^{11,12)}, 항근작용, 자궁근종 세포의 성장억제^{13,14)}, 압전이 억제^{15,16)}, 세포보호효과^{17,18)}, 관상동맥 혈류량 증가¹⁹⁾, 강압작용, 장관수축작용, 지연형 과민반응 억제 작용 등 다양한 작용이 보고되었으나²⁰⁾, 대식세포를 매개로 한 염증 억제의 기전에 따른 연구 및 이에 따른 동물실험 등의 체계적 연구보고는 부족한 실정이다.

염증은 손상에 대한 생체의 정상적인 반응으로, 특정한 원인에 의해 발생한 조직의 손상을 국소화하고 손상된 조직을 정상으로 되돌리려는 생체의 방어기전이다. 일반적으로 염증반응은 생체의 손상된 조직을

회복하는 유리한 결과를 가져오는 반응이지만, 과도하거나 지속적인 염증 반응은 생체에 해로운 결과를 초래하기도 한다²¹⁾.

본 연구에서는 鬼箭羽 물추출물을 Raw 264.7 cell에 처리하여 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 염증매개물질의 발현 억제효능을 확인하였고, rat에 경구투여하여 carrageenan (CA)로 유도한 족부중에서도 염증매개물질의 발현을 억제하는 것을 확인하여 보고하는 바이다.

II. 재료 및 실험방법

1. 鬼箭羽 물추출물 (ELWE) 제조

鬼箭羽 (Euonymi Lignum Suberalatum)는 2018년 여름에 경북 영천에서 채취하였으며, 3주간 그늘에서 건조한 후 사용하였다. 鬼箭羽 물추출물(ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract)은 鬼箭羽 200g에 1.5 L의 물을 가하여 3시간 대용약탕기로 가열 추출한 후, 거어크로 1차 여과하고, 이 濾液을 3,000 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 No.2 filter paper로 여과하고, 이를 진공회전농축기로 농축하였다. 농축액을 초저온냉동기 (Operon, Korea)에 15시간 이상 동결한 후 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)를 이용하여 동결건조하고 사용할 때까지 -20°C 에서 보관하였으며, ELWE의 수율은 3.78%였다. ELWE를 *in vitro* 연구에서는 농도별로 배지 (DMEM; Dulbecco's modified eagle's medium)에 녹여 처리하였고, *in vivo* 연구에서는 saline에 녹여 사용하였다.

2. 시약 및 기구

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-

*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

• Received : April 22, 2019 / Accepted : May 10, 2019



tetrazolium bromide (MTT)와 *E. coli* LPS 및 Griess reagent는 Sigma社 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)와 DMEM 및 penicillin, streptomycin은 GibcoBRL社 (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였으며, COX-2 antibody와 iNOS antibody는 BD biosciences社 (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고, I- κ Ba와 NF- κ B 및 actin의 antibody는 Santa Cruz Biotechnology社 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Phospho-I- κ Ba (p-I- κ Ba) antibody와 Lamin A/C antibody는 Cell Signaling Technology社 (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, Nitrocellulose (NC) membrane은 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다.

3. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cell은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100 μ g/mL) 및 10%의 FBS가 함유된 DMEM으로 37°C, 5% CO₂의 조건이 유지되는 세포배양기 (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 실험에 사용된 모든 세포는 80~90%의 confluence가 유지되는 경우에 실험에 사용하였고, 계대배양은 20회를 넘지 않는 세포를 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

ELWE의 Raw 264.7 cell에 대한 단독처리 독성은 96 well plates에 각 well당 Raw 264.7 cell을 5 \times 10⁴ cell로 분주한 다음 ELWE를 3~300 μ g/mL의 농도로 처리하여 18 시간 배양한 후 세포생존율을 구하였다. 또한, ELWE + LPS의 경우는, Raw 264.7 cell에 10~300 μ g/mL의 농도로 ELWE를 전 처리한 후, 1시간에 1 μ g/mL의 LPS를 처리하고 이후 18시간 배양하였다. 배양 후 PBS에 MTT를 0.1 mg/mL의 농도로 각 well당 50 μ l씩 넣고 4시간 배양한 후 배지만을 조심스럽게 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 용해시킨 후 Titertek Multiskan automatic microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, Austria)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은

control cell에 대한 백분율로 표시하였다. [i.e. cell viability (% of control) = 100 \times (absorbance of treated sample)/(absorbance of control sample)].

5. Nitric Oxide 생성량 측정

LPS +/- 및 ELWE +/-로 처리된 Raw 264.7 cell의 nitric oxide (NO) 생성량은 세포 배양액 중의 NO₂⁻의 양을 Griess reagent시약으로 측정하였다. 즉, 세포배양 상등액 50 μ l와 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 1% α -naphthylamide in H₂O를 함유한 Griess reagent 50 μ l를 96 well plate에 혼합하고 차광하여 10분 동안 반응을 시킨 후, 이를 Titertek Multiskan automatic microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 양은 Control대비 각 군의 배수로 나타내었다.

6. Cytokine과 prostaglandin E2의 측정

염증매개관련 cytokine을 측정하기 위하여 Raw 264.7 cell을 6 well plate에 well당 5 \times 10⁵ cell로 분주하고 ELWE를 100과 300 μ g/mL로 처리한 다음, 1시간 후에 다시 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 12시간에 상등액을 회수하여 -70°C에 보관하였다. 이 상등액을 이용하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin (IL)-1 β 및 IL-6는 각각의 ELISA kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)로 측정하였으며, Prostaglandin E2 (PGE₂)는 R&D Systems Inc社 (Minneapolis, MN, USA)의 PGE₂ ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 각각의 cytokine과 PGE₂의 양은 표준곡선을 사용하여 pg/mL로 나타내었다.

7. 단백질의 발현 분석

전세포 추출액과 핵 분획 추출액은 다음과 같은 방법에 따라 분리하였다. 전세포 추출액 (whole cell lysate)은 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 scrapper로 수거하여 microtube에 옮기고, 이를 3,000 \times g로 원심분리하여 상등의 PBS를 제거하고 세포만을 수거하였다. 여기에 10 mM Tris-HCl, pH 7.1, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)로

구성된 용해 완충액을 100 μ l 넣고 vortex한 후 1시간 동안 4°C에서 방치한 후, 이를 다시 15,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 전세포 추출액인 상등액을 얻었다.

핵 분획 추출액 (nuclear fraction)은 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 scrapper로 수거하여 microtube에 옮기고, 이를 3,000 \times g로 원심분리하여 상등의 PBS를 제거하고, 남은 세포에 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF을 포함하는 용해 완충액 100 μ l를 넣고 vortex하여 세포를 완전히 용해시키고 10분 동안 얼음위에서 방치한 후 4°C에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. Microtube에 남은 nuclei pellet에 20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF를 포함한 추출 완충액 50 μ l를 가하여 vortex한 후, 얼음 위에서 1시간 동안 방치한 후 다시 15,000 \times g로 4°C에서 15분 동안 원심분리하여, 핵 분획 추출액인 상등액을 얻었으며, 실험 시까지 -70°C에 보관하였다.

정량한 단백질을 취하여 SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 NC membrane으로 단백질을 전이시킨 후, iNOS, COX-2, p-I- κ Ba, I- κ Ba, NF- κ B, actin 및 Lamin A/C의 각각의 1차 antibody와 반응시킨 후, 다시 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 2차 항체와 반응시킨 후 ECL detection reagents (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 각 단백질의 발현 정도를 평가하였다. 각 단백질의 정량

은 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)으로 분석하였으며, 각 단백질의 발현량은 Control대비 각 군의 배수로 나타내었다.

8. 실험동물 및 실험군의 분류

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간의 light/dark cycle이 유지되는 ECRS (Environment Controlled Rearing System: Shin Bio Tech, Seoul, Korea)에서 사육하였으며, 물과 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 동물실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC)의 심의를 통과 (승인번호; DHU 2018-080)한 후 실험을 진행하였다.

실험군의 분류는 아무런 처치를 하지 않은 군을 normal군으로 하고, 염증유발물질인 rat당 carrageenan (CA) 100 μ l (Sigma Chemical Co, St Louis, USA)을 피하주사한 군을 CA군으로 하였으며, 양성대조군으로서 carrageenan + dexamethasone (1 mg/kg, p.o.)을 투여한 군을 DEXA군, CA + ELWE (0.3 g/kg, p.o.)를 투여한 군을 ELWE 0.3 g/kg군, CA + ELWE (1.0 g/kg, p.o.)를 투여한 군을 ELWE 1.0 g/kg군으로 나누었으며, 각 군당 rat의 수는 6마리로 하였다.

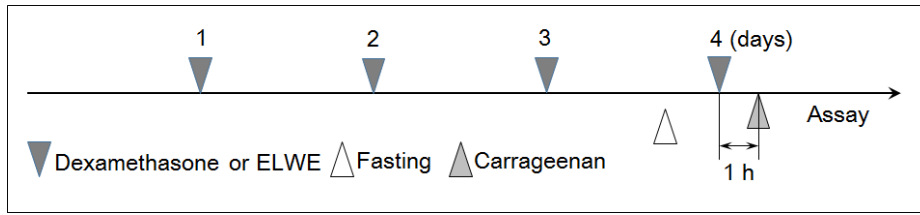
Table 1. Experimental animal groups in this study.

Group	Carrageenan (100 μ l/rat)	Dexamethasone (1 mg/kg)	ELWE	ELWE
			0.3 g/kg	1.0 g/kg
Normal	-	-	-	-
CA	+	-	-	-
DEXA	+	+	-	-
ELWE 0.3 g/kg	+	-	+	-
ELWE 1.0 g/kg	+	-	-	+

9. 족부종의 유도 및 부종의 측정

ELWE (0.3 g/kg, 1.0 g/kg) 와 dexamethasone (1 mg/kg)은 4일간 매일 1회 투여하였으며, 4일째 약물투여 1시간 후 CA를 100 μ l로 rat의 오른쪽 뒷다리의 발바닥에 주입하여 족부종을 유도하였다. 족부종의 측정은 CA를 주입한 후 1시간 간격으로 4시간

까지 부종측정기로 부종의 정도를 측정하였다. 족부종의 정도는 발/발목의 경계부분까지의 plethysmometer (Ugo Basile, Varese, Italy)에 넣어 오른쪽 뒷다리의 volume을 측정하고 volume/body weight하여 normal 대비 각 군의 배수로 나타내었다.



Scheme 1. Schedule of the experimental animal study

10. 족부종 조직에서의 단백질 발현변화

족부종 측정이 종료된 후 즉시, 족부종 조직을 채취하여, 조직 0.1 g에 total lysis buffer를 1mL 가하여 균질화한 후 15,000 ×g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었으며, 이 상층액의 단백질 함량을 bicinchoninic acid assay로 정량하였다. 단백질을 20 µg을 SDS-PAGE로 전기영동한 후, Gel상의 단백질을 NC membrane으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 NC membrane에 iNOS 및 COX-2 각각의 1차 항체로 반응시킨 후, 다시 2차 항체로 반응시켰다. iNOS 및 COX-2는 ECL® chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)로 발색하여 발현량을 관찰하였다. 각 단백질의 발현량은 control대비 각 군의 배수로 나타내었다.

11. 통계적 검증

모든 데이터는 3 회 반복 실험 후 mean ± SD로 표시하였으며, 각 그룹간의 통계적 유의성은 one way analysis of variance로 분석한 후, 등분산 가정의 성립 여부에 따라 Tukey honestly significant

difference test 또는 Dunnett T3 test로 사후 검정하였다. 통계적 유의성은 P 값이 0.05 또는 0.01 미만을 기준으로 검정하였다.

III. 결과

1. ELWE의 Raw 264.7 cell에 대한 세포독성에 미치는 영향

ELWE가 Raw 264.7 cell에 미치는 세포독성을 평가하기 위하여 ELWE를 3, 10, 30, 100, 300 µg/mL의 농도로 세포에 처치하고 18시간 후에 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다.

Control군을 100.00 ± 2.69으로 하였을 때, ELWE를 3, 10, 30, 100, 300 µg/mL군은 각각, 104.14 ± 4.63, 98.29 ± 2.53, 99.21 ± 7.02, 104.27 ± 1.20, 113.26 ± 4.38 (%)를 나타내어 control군에 비교하여 ELWE는 전체 실험농도에서 Raw 264.7세포에 세포독성을 나타내지 않았다 (Figure. 1). 따라서 이후의 실험은 300 µg/mL 이하의 농도에서 진행하였다.

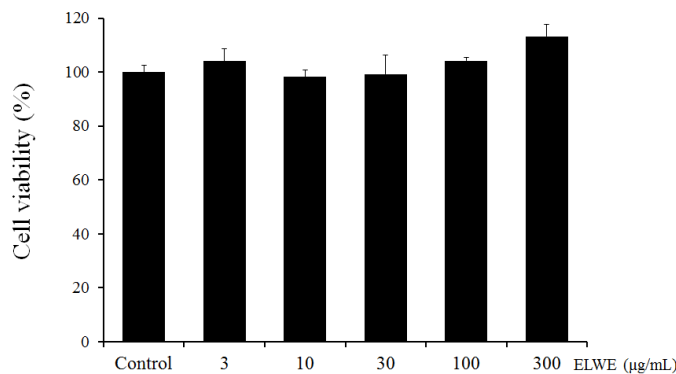


Figure 1. The effect of ELWE on cell viability in Raw 264.7 cells. Cell viability of ELWE alone was measured 18 h after treatment of ELWE. Raw 264.7 cells were treated with 3–300 µg/mL of ELWE for 18 h. Cell viability was measured by MTT assay. Data were expressed as mean ± S.D. of three independent experiments. ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract.

2. ELWE의 Raw 264.7 cell에 대한 NO억제 및 세포 독성에 미치는 영향

LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 cell에서 ELWE의 nitric oxide (NO) 생성 억제효과를 평가하기 위하여 ELWE를 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 1시간 전처치한 다음, LPS를 18시간 처치하여 Raw 264.7 cell을 활성화시킨 후 생성되는 NO의 양을 측정하였다.

LPS군은 Control (1.000 ± 0.009)군과 비교하여 NO 생성량이 LPS 처치 18시간 후 3.509 ± 0.203 배로 유의하게 증가하였으며, ELWE 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 각각 3.179 ± 0.203 , 2.416 ± 0.241 , 1.423 ± 0.068 , 1.201 ± 0.003 배로 NO의 생성을 억제하였으며, 특히 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 유의하게 NO의 생성을 억제하였다 (Figure. 2A).

이러한 ELWE의 NO억제가 세포생존을 저하에서 기인하는지를 평가하기 위하여, ELWE + LPS에서 세포생존율을 평가하였다. LPS 단독 처리군에서는 Control군 (100.00 ± 0.89)에 비교하여 53.07 ± 2.39 %로 유의하게 세포독성을 나타내었으나, LPS + ELWE 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세포 생존율은 각각 54.09 ± 3.14 , 67.12 ± 7.14 , 89.41 ± 3.43 , 104.49 ± 2.38 %로 LPS로 유도된 세포독성을 유의하게 억제하였다 (Figure. 2B).

이러한 연구결과는 ELWE 단독 또는 ELWE + LPS에서 세포독성이 없음을 나타내는 것으로, ELWE가 세포의 생존율과는 상관없이 NO의 생성 억제효능이 있음을 의미한다.

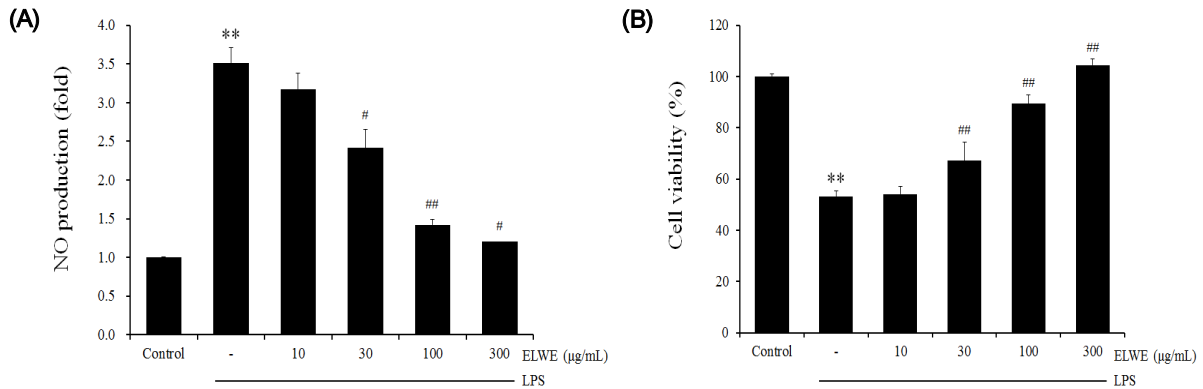


Figure 2. Inhibitory effect of ELWE on cell viability and LPS-mediated NO production in Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were pre-treated with 10–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ELWE for 18 h and treatment of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h. (A) The concentration of nitrite (NO_2^-) in culture medium was measured by Griess reagent. (B) Cell viability was measured by MTT assay. Data were expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments (*significant as compared with control, ** $p < 0.01$, #significant as compared with LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, NO; nitric oxide.

3. ELWE의 염증성 cytokine 생성 억제에 미치는 영향

LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 cell에서 분비되는 염증성 cytokine의 생성 억제능을 평가하기 위하여 ELWE를 100과 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처치하고 12시간 후 각각의 ELISA kit를 사용하여 세포배양액에서 측정하였다.

TNF- α 는 LPS에 의해 2235.92 ± 111.88 pg/mL 로 control (280.08 ± 23.66)에 비해 약 7.98배로 유의성 있게 증가하였으나, ELWE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 1001.58 ± 7.14 pg/mL 로 LPS 단독처리군 대비

44.80% 수준으로 유의성 있게 감소시켰으며, ELWE 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 471.17 ± 39.21 pg/mL 로 LPS 단독처리군 대비 21.07% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE의 단독처치는 TNF- α 의 생성량에 특별한 영향을 미치지 않았다 (Figure. 3A).

IL-1 β 에서는 LPS에 의해 583.76 ± 20.74 pg/mL 로 control (14.08 ± 0.82)에 비해 약 41.46배로 유의성 있게 증가하였으나, ELWE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 71.43 ± 4.92 pg/mL 로 LPS 단독처리군 대비 12.24% 수준으로 유의성 있게 감소시켰으며, ELWE 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$

는 18.84 ± 1.77 pg/mL로 거의 control 수준으로 회복되었으며, LPS 단독처치군에 비교해서는 3.23% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE의 단독처치는 IL-1 β 의 생성량에 특별한 영향을 미치지 않았다 (Figure. 3B).

IL-6역시, LPS에 의해 1964.09 ± 13.77 pg/mL로 control (3.53 ± 2.29)에 비해 약 556.40배로 유의성

있게 증가하였으나, ELWE 100 μ g/mL는 1332.12 ± 9.71 pg/mL로 LPS 단독처치군 대비 67.82% 수준으로 유의성 있게 감소시켰으며, ELWE 300 μ g/mL는 287.46 ± 13.58 pg/mL로 LPS 단독처치군 대비 14.64% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE의 단독처치는 309.28 ± 2.11 μ g/mL로 control에 비교하여 증가하는 경향을 보였다 (Figure. 3C).

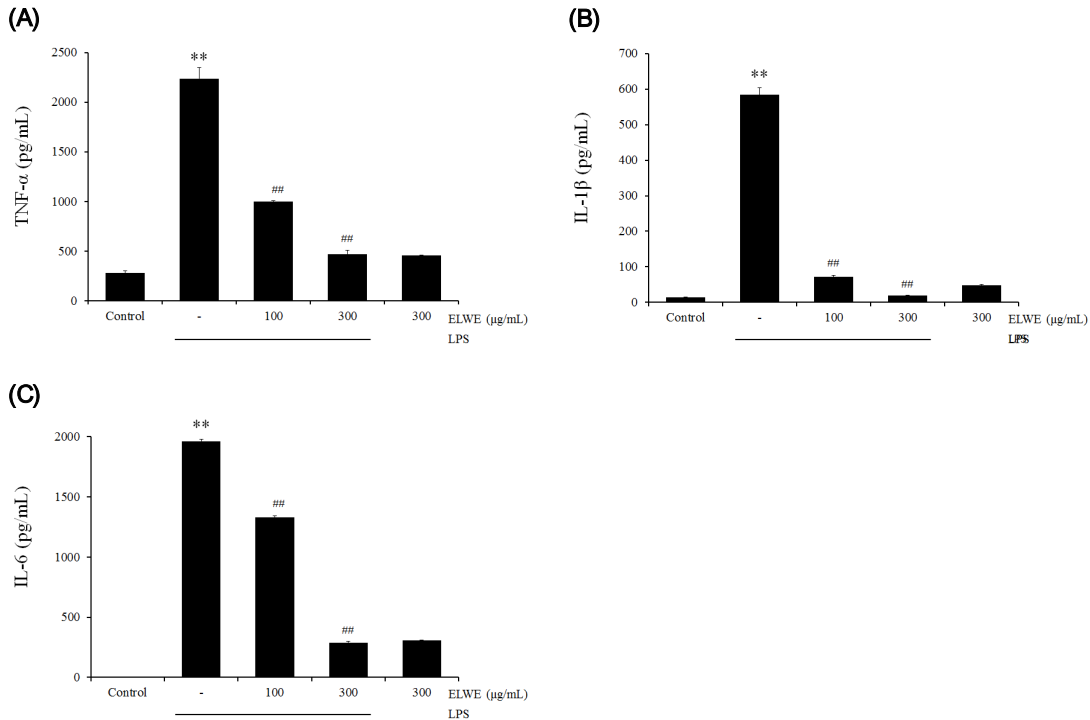


Figure 3. Inhibitory effect of ELWE on the LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokines. Raw 264.7 cells were pre-treated with LEWE for 1 h before the treatment of LPS (1 μ g/mL), and the cells were further incubated for 12 h. The concentrations of (A) TNF- α , (B) IL-6 and (C) IL-1 β in culture medium were measured by ELISA kit as described in materials and methods section. Data were expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments (*significant as compared with control, ** $p < 0.01$, #significant as compared with LPS alone, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, TNF; tumor necrosis factor, IL; interleukin.

4. ELWE의 PGE₂ 억제에 미치는 영향

LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 cell에서 분비되는 PGE₂의 생성 억제능을 평가하기 위하여 ELWE를 100과 300 μ g/mL의 농도로 처치하고 12시간 후 ELISA kit를 사용하여 세포배양액에서 측정하였다. PGE₂는 LPS에 의하여 2350.85 ± 21.18 pg/mL로 control (35.18 ± 10.07)에 비해 약 66.82배로 유의

성 있게 증가하였으나, ELWE 100 μ g/mL는 332.91 ± 3.92 pg/mL로 LPS 단독처치군 대비 14.16% 수준으로 유의성 있게 감소시켰으며, ELWE 300 μ g/mL는 113.98 ± 24.04 pg/mL로 LPS 단독처치군 대비 4.85% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE의 단독처치는 PGE₂의 생성량에 특별한 영향을 미치지 않았다 (Figure. 4).

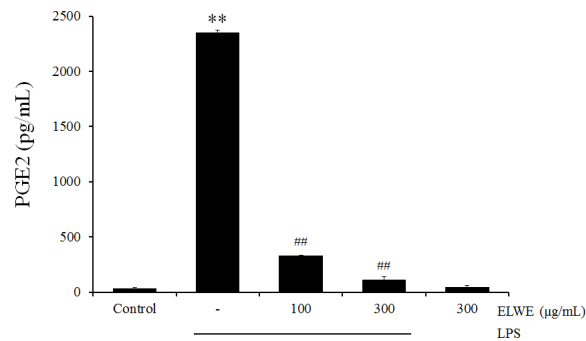


Figure 4. Inhibitory effect of ELWE on the LPS-induced secretion of PGE₂.

Raw 264.7 cells were pre-treated with LEWE for 1 h before the treatment of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the cells were further incubated for 12 h. The concentration of PGE₂ in culture medium was measured by ELISA kit as described in materials and methods section. Data were expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments (*significant as compared with control, ** $p < 0.01$, #significant as compared with LPS alone, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, PGE₂; prostaglandin E2.

5. ELWE의 iNOS 및 COX-2 발현 억제에 미치는 영향

ELWE가 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 NO의 생성을 유의하게 억제하고 (Figure. 2A) LPS 단독처리군 대비 유의한 세포독성을 나타내지 않음 (Figure. 2B)을 확인한 후, ELWE가 NO의 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 immunoblot analysis를 통하여 평가하였다. LPS는 iNOS 단백질의 발현을 control (1.000 \pm 0.812) 대비 14.758 \pm 0.631배로 유의하게 증가시켰으나, ELWE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 7.656 \pm 2.701배로 LPS 단독처리군 대비 51.88% 수준으로 유의성 있게 감소시켰으며, ELWE 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 4.391 \pm 2.437배로 LPS 단독처리군 대비 29.75% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 단독처치는 iNOS의 발현에 특별한 영향을 미치지 않았다 (Figure. 5A and B).

또한 ELWE가 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 PGE₂의 생성을 유의하게 억제하고 (Figure. 4) LPS 단독처리군 대비 유의한 세포독성을 나타내지 않음 (Figure. 2B)을 확인한 후, ELWE가 PGE₂의 생성에 관여하는 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향을 immunoblot analysis를 통하여 평가하였다. LPS는 COX-2 단백질의 발현을 control (1.000 \pm 0.639) 대비 33.858 \pm 4.691배로 유의하게 증가시켰으나, ELWE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 20.828 \pm 3.531배로 LPS 단독처리군 대비 61.52% 수준으로 유의성 있게 감소시켰으며, ELWE 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 8.392 \pm 5.117배로 LPS 단독처리군 대비 24.75% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 단독처치는 COX-2의 발현량에 특별한 영향을 미치지 않았다 (Figure. 5A and C).

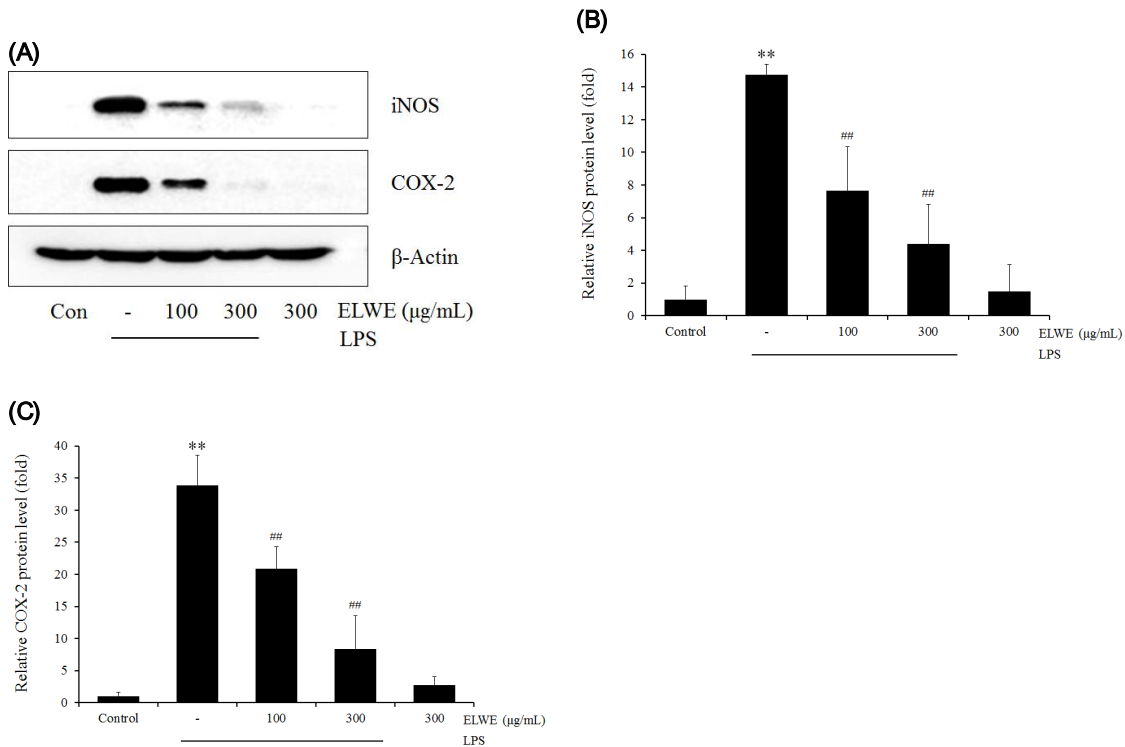


Figure 5. Inhibitory effect of ELWE on the LPS-induced iNOS and COX-2 expressions in Raw 264.7 cells.

(A) Expressions of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblot assay using specific primary antibody. Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE. Levels of β -actin were used as an internal control for loading. (B and C) The relative levels of the iNOS and COX-2 protein bands were measured by scanning densitometry. Data were expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments. (*significant as compared with control, ** $p < 0.01$, #significant as compared with LPS alone, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, iNOS; inducible nitric oxide synthase. COX-2; cyclooxygenase-2.

6. ELWE의 PGN유도 NO 생성 억제효과에 미치는 영향

ELWE가 LPS-TLR4의 염증매개반응을 억제할 수 있음을 확인하고, ELWE가 TLR4 외의 다른 TLR/ligand에 의한 염증반응 또한 억제할 수 있는지 확인하였다. LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 NO 생성억제 및 세포생존율 연구에서와 마찬가지로 LPS 대신 TLR2의 ligand인 peptidoglycan(PGN) 30 μ g/mL로 처리하여 NO의 생성량과 세포생존율을 평가하였다.

먼저 NO는 PGN 단독 처리군에서 control (1.000 \pm 0.004) 대비 4.920 \pm 0.263배 NO 생성량이 증가하였으나, ELWE 300 μ g/mL를 전처리하였을 때

1.450 \pm 0.076배로 PGN 단독 처리군 대비 29.47%의 수준으로 NO의 생성을 유의하게 억제하였다 (Figure. 6A). 세포생존율에 있어서 PGN 단독 처리군은 control (100.00 \pm 3.65) 대비 55.53 \pm 5.02%로 유의하게 세포생존율을 억제하였으나, ELWE 300 μ g/mL의 전처리는 66.12 \pm 3.41%로 PGN 단독 처리군에 비해 유의한 세포생존율의 증가를 나타내었다 (Figure. 6B).

이러한 결과는 ELWE가 TLR4/ligand 매개 염증반응 뿐만 아니라, TLR2/ligand에 의한 염증매개물질을 억제할 수 있음을 나타낸다.

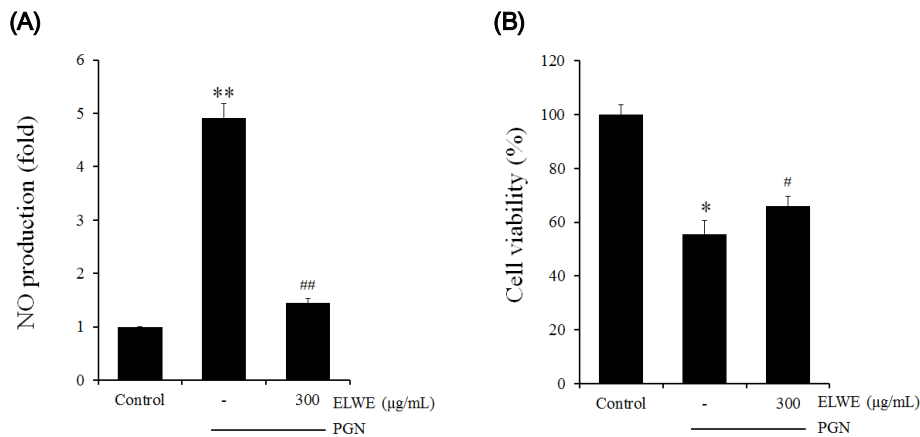


Figure 6. Inhibitory Effect of ELWE on PGN-induced NO production and cell viability in PGN-activated in Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were pre-treated with 300 µg/mL of ELWE for 1 h, and then further incubated with 30 µg/mL of PGN for 18 h. (A) Relative levels of NO production were assayed by measuring the absorbance and (B) relative cell viability were examined by MMT assay. Data were expressed as mean ± SD of three independent experiments. (*significant as compared with control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, #significant as compared with PGN alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, NO; nitric oxide, PGN; peptidoglycan.

7. ELWE의 NF-κB 활성 억제에 미치는 영향

LPS에 의해 활성화된 대식세포는 NF-κB pathway가 활성화되며 NF-κB의 억제 단백질인 I-κBa가 인산화되고, I-κBa와 NF-κB의 복합체가 분리되어, I-κBa로부터 유리된 NF-κB는 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 등의 전염증성 유전자의 전사를 유도한다.

그러므로 본 연구에서는 NF-κB pathway에 연관된 I-κBa, p-I-κBa 및 NF-κB의 단백질 발현을 immunoblot analysis로 평가하였다.

세포질에서의 I-κBa의 단백질은 LPS에 의해 0.486 ± 0.063 배로 control (1.000 ± 0.131)에 비해 약 48.6% 수준으로 유의성 있게 감소하였으나, ELWE 100 µg/mL는 0.750 ± 0.018 배로 LPS 단독 처치군 대비 154.3% 수준으로 증가시켰으며, ELWE 300 µg/mL는 0.766 ± 0.044 배로 LPS 단독 처치군 대비 157.6% 수준으로 유의성 있게 증가시켰다. ELWE의 단독 처치는 0.974 ± 0.058 배로 control에 비교하여 유의한 증감을 나타내지 않았다 (Figure. 7A and B)

세포질내에서의 p-I-κBa의 발현은 LPS에 의해

6.211 ± 0.206 배로 control (1.000 ± 0.340)에 비해 약 6.21배 수준으로 유의성 있게 증가하였으나, ELWE 100 µg/mL는 5.984 ± 0.681 배로 LPS 단독 처치군 대비 96.34% 수준으로 감소시켰으며, ELWE 300 µg/mL는 3.994 ± 0.053 배로 LPS 단독 처치군 대비 64.31% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE의 단독 처치는 1.501 ± 1.176 배로 control에 비교하여 유의한 증감을 나타내지 않았다 (Figure. 7A and C).

LPS에 의해 세포질에서 I-κBa가 감소, p-I-κBa가 증가함에 따라, 핵내에서의 NF-κB의 발현은 LPS에 의해 2.051 ± 0.200 배로 control (1.000 ± 0.265)에 비해 약 2.05배 수준으로 유의성 있게 증가하였으나, ELWE 100 µg/mL는 1.565 ± 0.152 배로 LPS 단독 처치군 대비 76.30% 수준으로 감소시켰으며, ELWE 300 µg/mL는 1.436 ± 0.114 배로 LPS 단독 처치군 대비 70.01% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE의 단독 처치는 0.990 ± 0.215 배로 control에 비교하여 유의한 증감을 나타내지 않았다 (Figure. 7D and E).

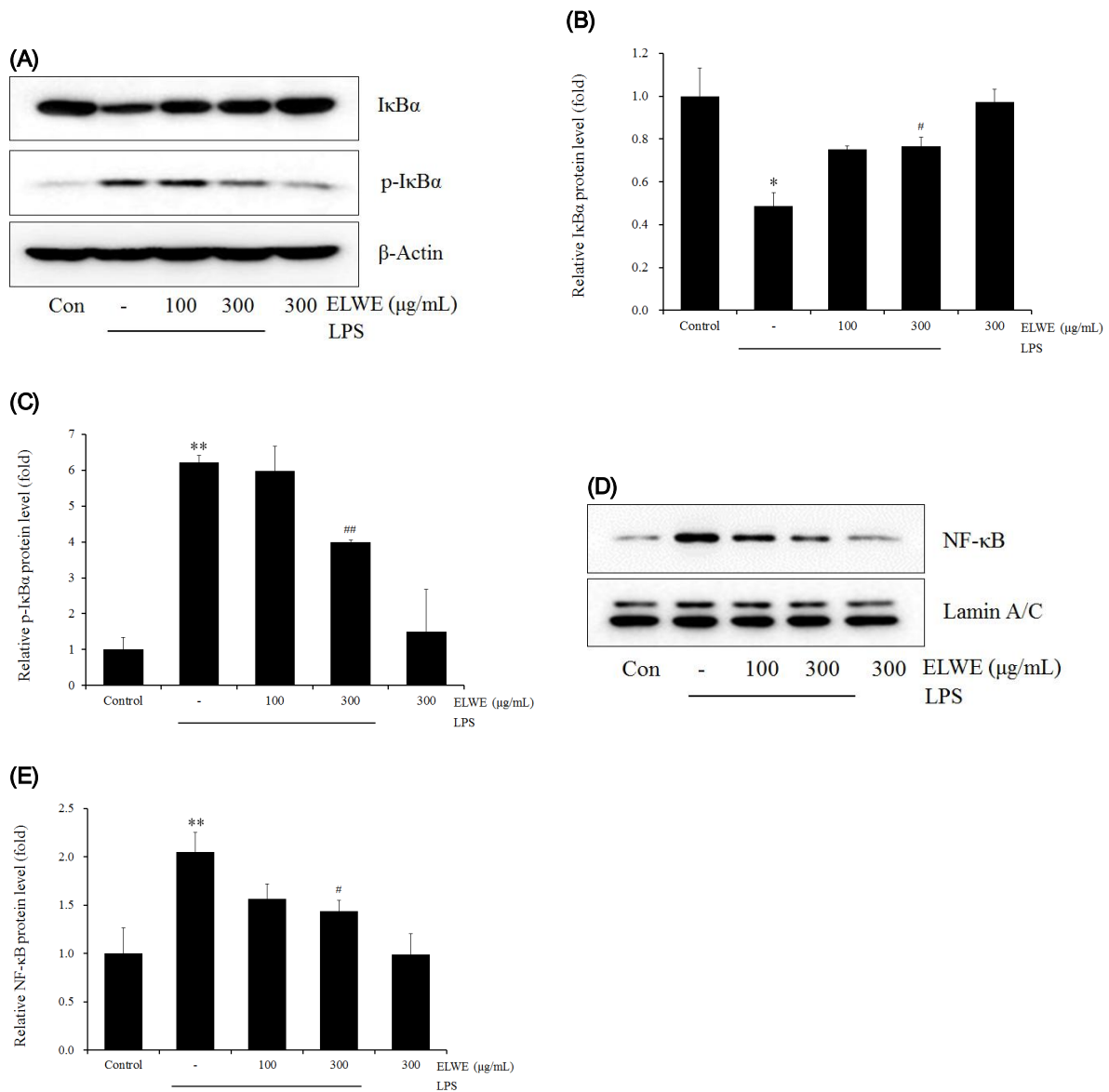


Figure 7. Inhibitory effect of ELWE on the LPS-induced NF-κB pathway activation in Raw 264.7 cells.

The levels of I-κBa (30 min), p-I-κBa (60 min) and NF-κB (60 min) protein were monitored with or without ELWE pre-treatment (i.e. 1 h before LPS). Levels of β-actin and Lamin A/C were used as an internal controls for loading (A and D). The relative levels of I-κBa (B), p-I-κBa (C) and NF-κB (E) protein were measured by scanning densitometry. Data were expressed as mean ± S.D. of three independent experiments (*significant as compared with control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # significant as compared with LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, I-κB; Inhibitory-κappa B, p-I-κB; phospo-I-κB, NF-κB; Nuclear factor-κappa B.

8. ELWE의 염증성 족부종 억제에 미치는 영향

In vitro 연구에서 ELWE가 NF- κ B pathway를 억제하여 항염증효과를 나타냄을 확인하고, *in vivo* 연구로서, carrageenan(CA)으로 유도된 족부종 모델에서 ELWE의 족부종 억제정도 및 염증관련 지표들을 평가하였다. CA를 주입하여 염증을 유발한 CA군에서의 족부종은 normal군에 비교하여 1, 2, 3, 4시간에 각각 1.210 ± 0.035 , 1.385 ± 0.038 , 1.418 ± 0.095 , 1.277 ± 0.038 배로 증가하여 유의한 족부종이 유발되었다.

그러나 ELWE 0.3 g/kg군에서는 1, 2, 3, 4시간에

각각 1.082 ± 0.030 , 1.197 ± 0.018 , 1.303 ± 0.024 , 1.155 ± 0.018 로 CA군과 비교할 때, 모든 측정시간 유의한 족부종 억제를 나타내었으며, ELWE 1.0 g/kg군에서도 1, 2, 3, 4시간에서 1.049 ± 0.012 , 1.188 ± 0.077 , 1.281 ± 0.050 , 1.131 ± 0.066 로 CA군과 비교할 때, 모든 측정시간 유의한 족부종 억제를 나타내었다. 양성대조군으로 사용된 dexamethasone군에서는 1, 2, 3, 4시간에 각각 1.079 ± 0.046 , 1.132 ± 0.026 , 1.186 ± 0.034 , 1.148 ± 0.028 로 유의한 족부종 억제를 나타내었다 (Figure. 8).

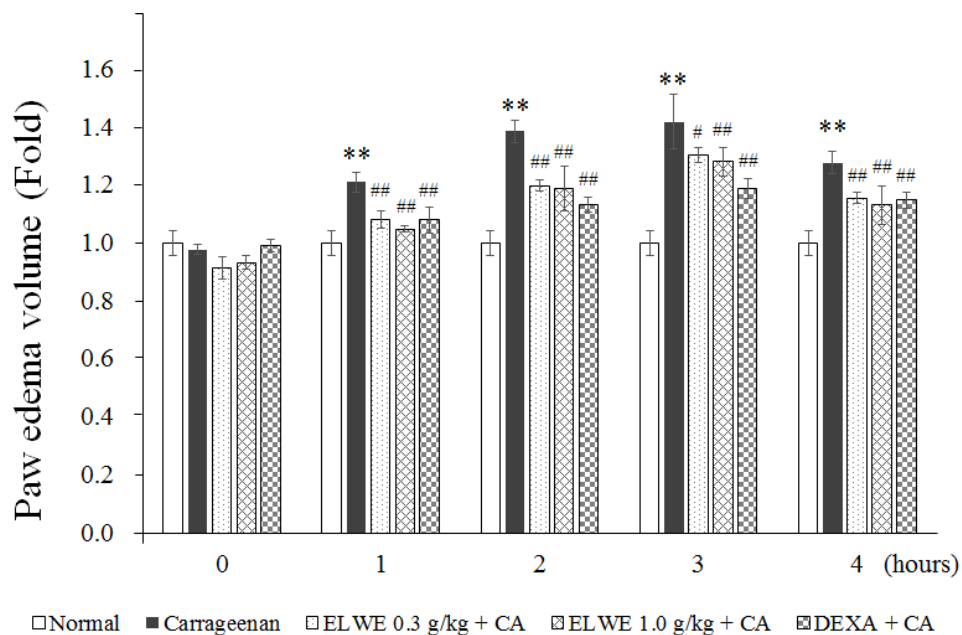


Figure 8. Inhibitory effect of ELWE on the CA-induced paw edema.

ELWE was administered to rats at 0.3, 1.0 g/kg/day per oral prior to the induction of paw edema for four days. Paw edema was induced by subcutaneous injection of 1% CA as described in materials and methods section. The volume of paw edema was measured up to 4 h after CA injection by using plethysmometer. DEXA (1 mg/kg, p.o.) was used as a positive control. Data were expressed as mean \pm S.D. of 6 animals (*significant as compared with normal, ** $p < 0.01$, # significant as compared with CA alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, CA; carrageenan, DEXA; dexamethasone.

9. ELWE의 조직내 iNOS 및 COX-2 발현 억제

In vitro 연구에서 ELWE가 iNOS와 COX-2를 억제함을 확인하고, *in vivo* 연구로서, CA로 유도된 rat의 족부종 모델에서 ELWE가 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 immunoblot analysis를 통하여 평가하였다.

CA로 족부종을 유발한 CA군에서는 iNOS 단백질의 발현이 normal (1.000 ± 0.352) 대비 2.677 ± 0.077배로 유의하게 증가하였으나, ELWE 0.3 g/kg 투여군에서는 2.089 ± 0.259배로 감소하였으며, ELWE 1.0 g/kg 투여군에서는 1.424 ± 0.108배로 CA 단독처치군 대비 53% 수준으로 유의성 있게 감소하였다 (Figure. 9A and B).

또한 COX-2의 발현은 CA군에서는 normal (1.000 ± 0.141) 대비 2.369 ± 0.279배로 유의하게 증가하였으나, ELWE 0.3 g/kg 투여군에서는 1.567 ± 0.107배로 CA 단독처치군 대비 66% 수준으로 유의성 있게 감소하였으며, ELWE 1.0 g/kg 투여군에서는 1.173 ± 0.244배로 CA 단독처치군 대비 50% 수준으로 유의성 있게 감소하였다 (Figure. 9A and C).

양성 대조군으로 사용된 DEXA군에서는 iNOS의 발현량이 1.492 ± 0.234배, COX-2의 발현량이 0.879 ± 0.463배로 모두 유의하게 감소하였다.

이러한 결과는 ELWE가 *in vitro* 수준에서만뿐만 아니라, *in vivo* 수준에서도 유의한 항염증작용을 나타내고 있음을 의미한다.

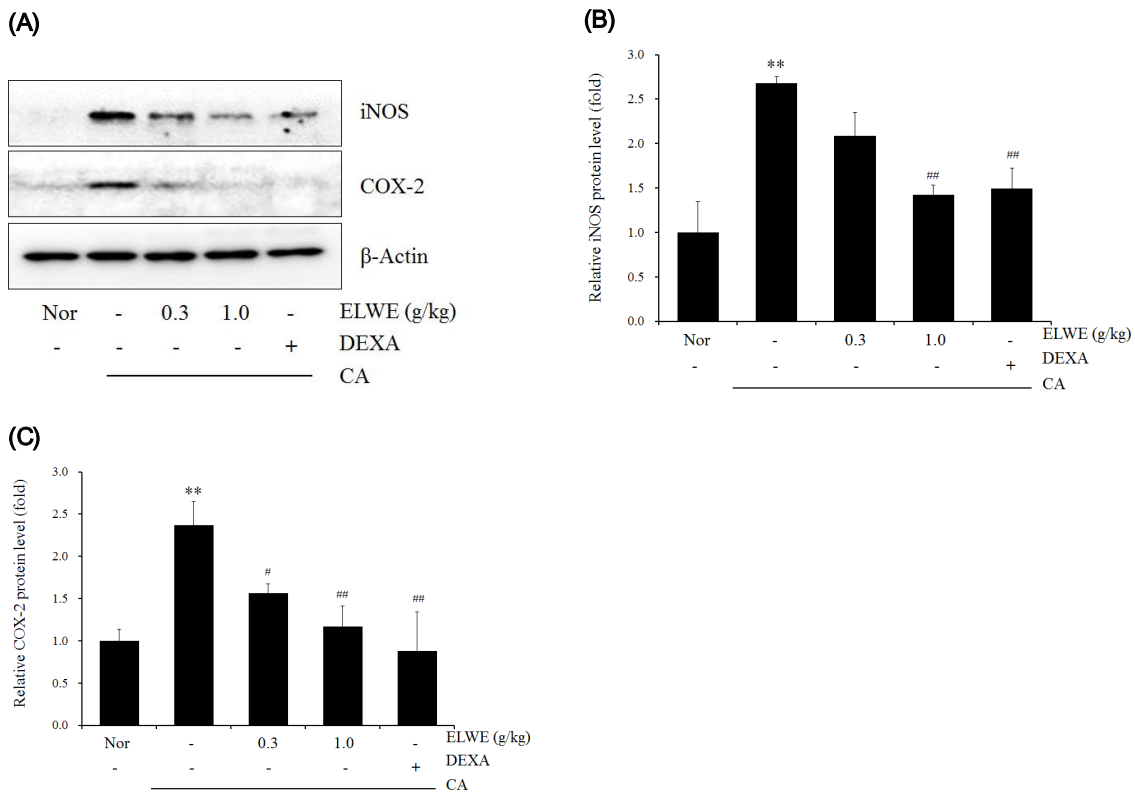


Figure 9. Inhibitory effect of ELWE on the CA-induced iNOS and COX-2 protein expressions in paw edema.

(A) Expressions of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblot assay using specific primary antibody. Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE. Levels of β-actin were used as an internal control for loading. (B and C) The relative levels of protein expressions were measured by scanning densitometry. Data were expressed as mean ± S.D. of three independent experiments. (*significant as compared with normal, ** $p < 0.01$, #significant as compared with CA alone, ## $p < 0.01$). ELWE; Euonymi Lignum Suberalatum Water Extract, iNOS; inducible nitric oxide synthase. COX-2; cyclooxygenase-2, DEXA; dexamethasone, CA; carrageenan,

IV. 고찰

鬼箭羽 (Euonymi Lignum Suberalatum)는 화살 나무의 코르크층에 붙어 있는 翼狀物로서, 苦寒無毒 (一云小毒)하고 肝經에 주로 작용하며, 破血, 通經, 殺蟲하는 효능이 있어, 經閉, 癥瘕, 月經不順, 產後瘀滯腹痛, 跌打損傷, 蟲積腹痛을 치료한다^{1,2)}.

鬼箭羽는 주로 破血, 殺蟲하지만 근래에는 임상에서 子宮頸部痛 및 肝癌을 비롯한 腫瘍을 치료하는 데에도 응용하고 있고 또한 鬼箭羽에 대한 항종양효과 연구도 다수 보고되고 있다^{3,10,22)}.

乳房癌에 대한 연구로 朴 등은⁸⁾ 鬼箭羽 메탄추출물의 SKBR3 인간 유방암세포주에 대한 증식억제 효과, 세포자멸사유도 및 항산화 활성을 보고하였으며, 金 등은²³⁾ 鬼箭羽의 물추출물의 SKBR3 인간 유방암세포주에 대한 증식억제, 항산화 작용 및 세포자멸사유도효과를 보고하였다. 특히 정은²⁴⁾ 鬼箭羽에서 추출한 apigenin이 SKBR3 인간 유방암세포에서 DNA fragmentation을 통하여 세포자멸을 유도한다고 보고하였고, 김은⁹⁾ 鬼箭羽에서 추출한 apigenin이 SKBR3 인간 유방암세포에서 A23187로 증가된, COX-2 및 prostaglandin E₂의 합성을 억제함을 보고하였다.

鬼箭羽의 癌轉移 억제 연구로서 배는¹⁵⁾ 鬼箭羽 줄기 껍질의 메탄을 추출물이 강한 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 활성억제를 나타내었으며, 추출물 중의 rosmarinic acid가 MMP-9 억제와 간암 세포주 Hep3B의 전이 억제 효과를 나타낸다고 보고하였으며, 김은¹⁶⁾ 鬼箭羽 줄기껍질의 메탄을 추출물이 강한 MMP-9 활성억제를 나타내었으며, 추출물 중 3,4-dihydroxycinnamic acid가 MMP-9의 활성을 억제함을 보고하였다.

이러한 항암 및 항전이 효과와 더불어 장 등은¹³⁾ 자궁 평활근중에서 적출한 세포에서 鬼箭羽는 cell cycle중 G0/G1 phase 정지를 유도하고, S-phase로의 진입을 막음으로서 자궁 평활근중 세포의 성장 억제효과를 보고하였고, 권 등은¹⁴⁾ 鬼箭羽의 열수추출액이 자궁근중세포(ULSMC)에서 caspase-3 활성화와 mitochondria를 경유하는 apoptosis를 유발함을 보고하였고, 또한 韓 등은²⁵⁾ 鬼箭羽가 aromatase activity을 억제하고 따라서 자궁근중을 억제함을 보고하여 자궁경부암뿐만 아니라 자궁근중에도 유의한 억제효과를 나타낸다고 보고하였다.

이전의 이러한 암세포나 근중세포의 세포사멸연구와는 상반되게, 간세포 및 뇌신경세포에 대한 鬼箭羽의 세포보호효과도 연구되었다. 정은¹⁷⁾ 마우스의 해마세포인 HT22 cell에서 鬼箭羽 성분 중, betulin, methyl hydrogen tetradecanedioate가 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)소거 및 세포내 Ca²⁺량의 억제, 미토콘드리아 장애억제, 항산화역할을 하는 glutathione (GSH)의 증가를 통해 뇌신경세포보호 작용을 나타냄을 보고하였고, 김 등은¹⁸⁾ 鬼箭羽 열수 추출물이 rat의 hepatocyte에서 amyloid-β에 의한 세포사멸을 억제하고 세포막지질 과산화의 억제를 통하여 세포보호효과를 나타냄을 보고하였다. 또한 鬼箭羽 부탄을 추출물은 혈관내피세포의 NO/cGMP경로를 활성화시켜 혈관을 이완시키며¹⁹⁾, mast cell 의존성 즉시형 알레르기 반응을 억제하여 아나필락시스를 억제하는 기전이 보고되었다²⁶⁾.

鬼箭羽의 성분 연구로는 鬼箭羽 잎에는 epifriedelanol, friedelin, quercetin, dulcitol이 함유되어 있고, 種子油에는 포화지방산, oleic acid, linoleic acid, caproic acid, acetic acid, benzoic acid, oxaloacetic acid 등이 함유되어 있으며²⁷⁾, 鬼箭羽에는 epifriedelinol, stigmast-4-en-3-one, 6β-hydroxy-stigmast-4-en-3-one, β-sitosterol, methyl 2, 4-dihydroxy-3, 6-dimethyl benzoate, methyl 2, 4-dihydroxy-6-methyl benzoate, 7-methoxy-4-methylphthalide, vanillin, n-octacosanol 등이 포함되어⁵⁾ 있는 것으로 보고되어 있다.

본 연구의 주제와 관련된 항염증 연구로 이는²⁸⁾ bovine type II collagen으로 유발된 흰쥐의 류마티스 關節炎 모델에서 鬼箭羽 藥液의 효능을 평가하였으며, 강 등은¹²⁾ 鬼箭羽 다당류 분획은 성숙한 T 및 B 임파구의 생존력 및 대식세포의 탐식능을 제고하여 면역반응을 조절할 수 있음을 보고하였다. 또한 이는²⁹⁾ 鬼箭羽 樹皮의 BuOH 추출물이 NO억제에 유의함을 보고하였고, 전은³⁰⁾ 鬼箭羽 열수추출물로 제조한 약침액이 NO와 iNOS 및 IL-6를 억제함을 보고하였으며, 김은³¹⁾ 鬼箭羽 물추출물이 대식세포에 독성을 유발하지 않으면서 LPS로 유도된 대식세포의 NO, 혈관내피성장인자 (VEGF; vascular endothelial growth factor), 혈소판유래성인자-BB (PDGF-BB; Platelet Derived Growth Factor-BB), 세포내 칼슘의 생성 증가를 억제하여 항염증효능을 나타냄을 보

고하였다. 또한 김 등은¹¹⁾ 鬼箭羽 열수추출물이 inhibitory kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}$) 분해 활성 및 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 활성을 억제하여 LPS-유도 염증매개물질 발현을 억제함을 밝힌 바 있다. 그러나 대식세포를 매개로 한 염증 억제작용의 기전 및 이에 따른 동물실험 등의 체계적 연구보고는 부족한 실정므로, 본 연구에서는 鬼箭羽 물추출물의 항염증 및 기전 연구로, *in vitro*에서 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 cell 모델에서 염증매개물질의 발현 억제효과를 평가하였으며, *in vivo*에서 CA로 유도된 rat의 족부종 및 염증매개물질 억제효과를 연구하였다.

염증 (inflammation)은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로, 생체 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상을 받았을 때 이 손상을 국소화하고 손상된 부분을 정상적으로 회복하기 위한 고도로 발달된 생체의 방어기전이며, 이 기전은 손상 부위의 혈관, 신경, 체액, 세포 등의 반응이 관여하는 복잡한 일련의 과정으로 이루어진다. 염증은 그 원인이 되는 인자를 제거하거나 회색하고 차단하는 합목적적인 과정으로, 생명체의 생존에 필요불가결한 반응이다²¹⁾.

즉, 염증은 손상 혹은 괴사조직, 미생물 등과 같은 이물질을 제거하는 숙주의 정상적 반응으로 감염, 허혈, 외상, 물리적, 화학적 손상, 이물질 및 자가면역 반응 등에 의해 발생하며³²⁾, 이러한 염증반응에는 염증 촉진성 매개인자 (pro-inflammatory mediators)가 촉진 되는 등 다양한 유발인자들이 관여하고 있다³³⁾.

염증반응이 개시되면, 초기염증반응에 중요한 역할을 하는 대식세포가 활성화되어 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 발현이 유도되고, iNOS와 COX-2를 코딩하는 유전자의 발현을 활성화시켜 NO 및 PGE₂ 등의 염증매개물질이 증가된다^{34,35)}. iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1, IL-6 등의 염증매개물질들은 활성화된 NF- κ B 신호전달체계에 의해 전사가 촉진되며, 이로 인해 과잉 생산된 NO는 염증반응에 의한 조직손상, 혈관확장, 종양 등을 발생시키기도 한다^{33,37)}.

LPS는 그램 음성균에 존재하는 세포벽 외층의 주요구성물로서, 내독소 (endotoxin)로 작용하며, 단핵구, 수지상세포, 대식세포, B cell 등의 LPS 결합단백질 (LBP; Lipopolysaccharide binding protein)에 의해 인식되어 CD14/TLR4/MD2 복합체에 결합하여

염증세포들이 염증매개 cytokines과 NO 및 eicosanoids와 같은 염증매개물질들의 분비를 활성화한다³⁸⁾.

LPS는 대식세포의 CD14/TLR4/MD2와 결합하고 MyD88을 통하여 IL-1RI-associated protein kinases (IRAK)의 인산화 및 TNFR-associated factor (TRAF) 6의 활성화를 유도하고, I- κ B의 인산화를 통하여 다양한 cytokine을 생성시키므로 대식세포를 이용한 염증연구에 빈용되는 모델이다^{39,40)}.

Toll like receptor (TLR)는 bacterial LPS와 viral double-stranded RNA 등을 인식하여 염증관련 signaling pathways를 활성화하여 microbial infections에 대하여 면역반응을 개시한다⁴⁰⁾. 포유류의 TLR는 13종이 있으며, 병원균-연관분자 패턴 (PAMP; pathogen-associated molecular patterns)으로 불리는 특이적 형태인 미생물 요소 (microbial components)를 인식하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. 13종의 TLR중 TLR4에는 LPS, taxol, RSV fusion protein, MMTV envelope protein, endogenous ligand (HSPs, fibronectin, hyaluronic acid) 등이 ligand로 작용한다^{39,41)}.

본 연구에서는 먼저, ELWE의 Raw 264.7 cell에 대한 세포독성을 평가하였다. ELWE는 실험에 사용된 3~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 어떠한 세포독성도 나타내지 않았으므로 (Figure. 1) 이후의 실험은 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 진행하였다.

Nitric oxide (NO)는 혈관확장, 신경전달, 혈소판 응집, 면역조절 등에 관여하며 생체내에서 고농도 또는 지속적인 NO 생성은 과도한 염증반응에 의해 숙주세포에 병리적 변화를 유도할 수 있다⁴²⁾.

ELWE는 세포독성을 나타내지 않는 농도범위에서 LPS처리 후 18시간에 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 모두 유의하게 NO의 생성을 억제하였으며 (Figure. 2 A), ELWE + LPS에서 세포생존율에서도 LPS 단독 처리군과 비교하여 ELWE는 어떠한 세포독성을 나타내지 않았으므로 (Figure. 2B), ELWE자체가 NO의 생성 억제효능이 있음을 시사한다. 또한, ELWE는 TLR2의 ligand인 peptidoglycan (PGN)으로 유도된 NO의 생성량을 유의하게 억제하였으며 (Figure. 6 A), ELWE는 PGN 단독 처리군에 비하여 유의하게 세포생존율을 증가시켰다 (Figure. 6B). 특히 LPS 단독 처리군에서는 control군 대비 53.07 \pm 2.39 %로, PGN 단독 처리군은 control군 대비 55.53 \pm 5.

02%로 유의하게 세포독성을 나타내었으나, 이러한 결과는 NO의 과다한 생성이 주요한 독성기전으로 주목받고 있으므로^{43,44}), 과량의 NO에 의한 것으로 판단되며, ELWE가 NO의 생성을 억제함에 따라 세포 생존율이 증가하는 것 역시 동일한 원인으로 생각된다.

또한, LPS는 대식세포의 cytokine 생성을 활성화하여, TNF- α , IL-6, IL-1, IL-12, IL-8, PGE₂ 등의 염증매개물질을 생산한다. TNF- α , IL-6, IL-1은 초기 염증반응에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 내분 발열원으로 체온상승을 유도한다⁴⁵). LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 cell에서 ELWE는 TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂의 생성을 유의하게 억제하였으며, 특히 TNF- α , IL-1 β , PGE₂는 control 수준으로 유의성 있게 감소시켰다 (Figure. 3 and 4).

ELWE가 NO의 생성을 유의하게 억제하여, NO의 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 immunoblot blot으로 평가하였으며, ELWE 300 μ g/mL은 LPS 단독처치군 대비 29.75% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다. ELWE가 PGE₂의 생성을 유의하게 억제하여, PGE₂의 생성에 관여하는 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향을 immunoblot blot으로 평가하였다. ELWE 300 μ g/mL은 LPS 단독처치군 대비 24.75% 수준으로 유의성 있게 감소시켰다 (Figure. 5). 이러한 결과는 防風通聖散⁴⁶) 및 hederagenin⁴⁷)의 염증 억제 기전과 같다.

NF- κ B는 면역발달 (immune development), 면역반응 (immune responses), 염증 및 종양에 관련된 핵심 轉寫因子 (transcription factor)이다⁴⁸). NF- κ B는 세포질에서 NF- κ B의 억제 단백질인 I- κ Ba와 복합체의 형태로 불활성화 상태로 존재하지만, LPS에 의해 염증반응이 활성화되면, I- κ B kinase가 활성화되어 I- κ Ba의 N-terminal로부터 serine이 인산화되고, NF- κ B/I- κ Ba 복합체에서 I- κ Ba로부터 활성화된 NF- κ B가 핵내로 이동하여, 표적유전자 프로모터에 결합하여 iNOS, COX-2 등의 전사를 유도한다⁴⁹).

본 연구에서 세포질내에서의 I- κ Ba 단백질의 발현은 LPS에 의해 유의성 있게 감소하였으며, p-I- κ Ba의 발현은 LPS에 비해 유의성 있게 증가하였으나, ELWE 300 μ g/mL에 의해 I- κ Ba의 발현이 유의성 있게 증가되었고, p-I- κ Ba의 발현은 유의성 있게

감소하였다 (Figure. 7A, B and C). 또한 LPS에 의해 p-I- κ Ba의 증가에 따라, 핵내에서의 NF- κ B의 발현은 LPS에 의해 유의성 있게 증가하였으나, ELWE 300 μ g/mL은 핵내에서의 NF- κ B의 발현을 유의성 있게 감소시켰다 (Figure. 7D and E). 이러한 연구결과는 ELWE가 NF- κ B 신호전달 경로를 억제하여 염증작용을 나타나고 있음을 명확히 제시하는 것이다.

In vitro 연구에서 ELWE의 항염증효과를 확인하고, *in vivo* 연구로서, CA로 유도한 족부종 모델에서 ELWE의 족부종 억제정도를 측정하였다. 동물 모델에서 염증유발 물질로 사용된 CA는 염증세포 침윤을 동반한 급성부종을 초래하므로, 급성 염증을 대한 항염증 물질 평가에 널리 이용되고 있으며⁵⁰), CA 주입 부위에는 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 부종이 유도된다⁵¹).

본 실험의 결과에서도 CA군에서는 normal에 비교하여 1, 2, 3, 4시간에 모두 유의한 족부종이 유발되었으며, ELWE를 처치한 군 (0.3, 1.0 g/kg)에서는 1, 2, 3, 4시간 모두 유의한 족부종 억제를 나타내었다 (Figure. 8).

또한 L-arginine으로부터 NO와 L-citrulline을 생성하는 중개물질인 iNOS는 각종 염증반응 및 shock을 유발하기도 하며, iNOS에 의해 생성된 NO는 CA로 유도된 염증반응에서 초기에는 염증반응을 유도하고, 후기에는 염증반응을 유지하는 역할을 하며^{52,53}), arachidonic acid로부터 PGH₂를 생성하여 순차적으로 PGE₂의 합성에 관여하는 COX-2는 염증매개뿐만 아니라, 종양의 전이에도 관여하고 있으며, COX-2의 발현 및 활성을 억제하는 것은 약물의 항염증효능을 평가하는 중요한 지표중의 하나이다^{54,55}).

본 연구에서는 CA로 유도된 동물 모델의 족부종 조직에서 iNOS와 COX-2의 발현을 평가하였으며, ELWE는 CA로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 유의성 있게 감소시켰다 (Figure. 9).

이러한 결과는 鬼箭羽가 전통적으로는 破血, 通經, 殺蟲하는 효능으로, 經閉, 癥瘕, 月經不順, 產後瘀滯腹痛, 跌打損傷, 蟲積腹痛 등의 치료에 응용되었으나, 급성 염증성 질환에도 유의하게 응용될 수 있음을 시사한다.

그러나, 鬼箭羽의 항염증효능이 이전의 연구에서 보고된 apigenin에서 유래한 것인지, 귀전우에 포함

된 다양한 성분이 복합적으로 작용하여 항염증 효능을 나타내는 것인지에 대하여서는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

V. 결론

鬼箭羽 물추출물(ELWE)의 항염증효과를 평가하기 위하여, *in vitro*에서 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 세포독성, NO, 염증매개 cytokine 및 PGE₂, iNOS와 COX-2, IκBα, P-IκBα, NF-κB를 관찰하고, *in vivo*에서 CA로 유도한 rat의 족부종모델에서 부종과 염증매개물질을 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. ELWE는 300 μg/mL 이하의 농도에서 단독, ELWE+LPS, ELWE+PGN에서 어떠한 세포독성을 나타내지 않았다. ELWE는 LPS, PGN에 의해 증가된 NO 생성을 유의하게 억제하였다.
2. ELWE는 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 TNF-α, IL-1β, IL-6 등 염증매개 cytokine과 PGE₂의 생성을 유의하게 억제하였다. 또한 NO를 생성하는 iNOS와 PGE₂를 생성하는 COX-2의 발현을 유의하게 억제하였다.
3. ELWE는 세포질에서 LPS에 의해 감소된 IκBα를 증가시키고 P-IκBα를 감소시켜서 NF-κB의 핵으로의 이동을 억제하여 핵 내에서 NF-κB의 발현을 억제하였다.
4. ELWE처치군 (0.3, 1.0 g/kg)은 CA 유도 rat의 족부종모델에서 족부종의 수준을 유의하게 낮추고 조직 내의 iNOS와 COX-2의 발현을 유의하게 억제하였다.

이상과 같이 *in vitro*에서 ELWE는 NF-κB와 복합체인 IκBα의 인산화를 억제하여 NF-κB의 핵으로의 이동을 억제시켜 iNOS와 COX-2를 비롯한 다양한 염증매개물질의 생성을 억제하였다. 또한 *in vivo*에서도 ELWE는 족부종의 수준을 낮추고 염증매개물질의 활성을 억제하였다. 이러한 결과는 ELWE에는 항염증의 효능이 있음을 명확히 제시하여 주는 것이므로, 향후 항염증약물로서 적절히 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재

원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2018R1A5A2025272)

References

1. Lee SI. Herbology. Suseowon:Seoul. 1981. 478-9.
2. Heo J. Dongeuibogam. Namsandang:Seoul. 1987. 744.
3. Jung BS, Shin MK. Illustrated Herbology. Younglimsa:Seoul. 2003. 367.
4. Kim TJ. Wild Flowers and Resources Plants in Korea 3. SNU Press:Seoul. 2008. 186.
5. Fang ZF, Li ZL, Wang Y, Li W, Hua HM. Chemical constituents from wing twigs of Euonymus alatus. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 2007;38(6):810-2.
6. Zhao MM, Xie MZ, Li LD, He JF, Wang Y. Effect of Euonymus alatus on islet β-cell in type 2 diabetic rats. Journal of TCM Univ. of Hunan. 2010;30(3):14-6.
7. Park SH, Ko SK, Chung SH. Euonymus alatus prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. J Ethnopharmacol. 2005;102(3):326-35.
8. Park YS, Han JY, Lee TK, Kim DI. Growth inhibitory and antioxidative effects of crude methanolic extract from Euonymus alatus (Thunb.) Sieb on SKBR3 human breast cancer cell line. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2005;18(1):45-54.
9. Kim Tae Heon. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E₂ synthesis by apigenin isolated from the methanolic extract of euonymus alatus (Thunb.) sieb in SKBR3 human breast cancer cell line. The graduate school of Dongguk University. 2004.
10. Lee DH, Kim SS, Seong S, Kim N, Han JB. Korean Medicine Therapy as a Substitute for Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer: A Case Report. Case Rep Oncol 2015;8:64-71.
11. Kim DH, Kim BJ, Park KB, Lee JS, Sung KK, Park SJ. Inhibitory Effect of Extract of Euonymus alatus (Thunb.) Sieb. on the

- Production of Inflammatory Cytokines. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2009;23(2):368-73.
12. Kang JW, Shin JS, Bang JS, Jang SH, Li R, Jeon H, Kim DG, Oh CH, Cho HK, Eun JS. Effects of Polysaccharide Fraction from *Euonymus alatus* Sieb on T-, B-Lymphocytes and Macrophages in Mice. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(5): 1270-5.
 13. Jang TH, Oh CY, Kim DI, Lee TK. Inhibitory effect of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb on cellular proliferation and apoptosis in human uterine Leiomyomal cells. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2004;17(4): 73-81.
 14. Kwon CN, Lee TK, Kim DI. A study of apoptosis induction of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb via mitochondrial pathway prooxidant in leiomyomal smooth muscle cells. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2005; 18(3):67-76.
 15. Bae SH. New inhibitory activities of rosmarinic acid from stem barks of *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase-9 and tumor migration of hepatoma cells. Graduate school of Semyung University. 2009
 16. Kim Seog Ha. A Study on anti-atherosclerotic 3,4-dihydroxycinnamic acid from methanol extract of *Euonymus alatus*. The graduate school of Dongguk University. 2006.
 17. Jung Youn Sik. Neuroprotective compounds of *Euonymus alatus*. Graduate School Kangwon National University. 2016.
 18. Kim SS, Kim JD. Physiological Activity and Effects on Lipid Peroxidation of Hot Water-Extract Obtained from *Euonymus alatus* in Cultured Rat Hepatocyte. J Korean Med. 2001;22(2):53-63.
 19. Li X, Kang DG, Lee JK, Kim SJ, Choi DH, Lee KB, Choi HJ, Yeom KB, Lee HS. Study on the Vasorelaxant Mechanism of the Butanol Extract of *Euonymus alatus*. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(1): 148-54.
 20. Sun RX, Peng J, Guo J, Wan MT, Huang HQ, Li L. Mordern research on pharmacological action of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. Global Traditional Chinese Medicine. 2015; 8(2):245-9.
 21. Korean Society of Pathologists. Text Book of Pathology. Komoonsa:Seoul. 1998. 65-68.
 22. Shin MK. Clinical Traditional Herbology. Younglimsa:Seoul. 1997. 537-8.
 23. Kim JS, Lee TK, Kim DI. A study of antiproliferative effect by *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb water-extract on SKBR3 human breast cancer cell Line. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2005; 18(4):1-9.
 24. Jeong YH. Apoptosis by apigenin of *euonymus alatus* in human breast cancer cells. The Graduate School of Dongguk University. 2005.
 25. Han JY, Kim MS, Kim DI, Lee TK. Inhibitory effects of *Scutellaria barbata* and *Euonymi Caulis Suberatum* against aromatase activity of hysteryomyomal cells. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2004;17(4): 91-100.
 26. Moon PD. Anti-allergic effect of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. The Graduate School of Wonkwang University. 2004.
 27. Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. The encyclopedia of oriental herbal medicine (I). Jungdam:Seoul. 2004. 514-6.
 28. Lee KH. Effect of *Euonymus alatus* pharmacopuncture on the rheumatoid arthritis model in rats. Graduate school of Semyung University. 2010.
 29. Lee HH. Inhibition of nitric oxide synthesis by methanol and butanol extracts of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb in murine macrophages. The Graduate School of Dongguk University. 2004.
 30. Jeon JC, Lee EY. The Effects of *Euonymi Ligunum Suberalatum* Phamacopuncture on Nitric Oxide and Interleukin-6 Production in Macrophage. The journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2010;27(4):223-31.
 31. Kim YD. Anti-inflammatory Effect of *Euonymi*



- Lignum Suberalatum Water Extract on Lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 Macrophages. Graduate school of Kyungwon University. 2011.
32. Abbas A, Kumar V, Fausto N, Robbins & Cotran Pathologic Basis of disease. W.B. Saunders:Philadelphia. 2011. 44-56.
 33. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage mediated inflammation in metabolic disease. Nat. Rev. Immunol. 2011;11:738-49
 34. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 2000;10:8-15.
 35. Miyataka M, Rich KA, Ingram M, Yamamoto T, Bing RJ. Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2. Hypertension 2002;39:785-9.
 36. Muller N, Myint AM, Schwarz MJ. Inflammatory biomarkers and depression. Neurotox. Res. 2011;19:308-18.
 37. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci. 2004;75:639-53.
 38. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. Br J Pharmacol. 2008;154(1):165-73.
 39. Takeda K, Akira S. Toll-Like Receptors. Curr. Protoc. Immunol. 2015;109:14.12.1-14.12.10.
 40. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. Science. 2003;300(5625):1524-5.
 41. McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. J Invest Dermatol. 2005;125(1):1-8.
 42. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med. 1998; 25:434-56.
 43. Sharifi AM, Mousavi SH, Bakhshayesh M, Tehrani FK, Mahmoudian M, Oryan S. Study of correlation between lead-induced cytotoxicity and nitric oxide production in PC12 cells. Toxicol Lett. 2005;160(1):43-8.
 44. Li L, Shou Y, Borowitz JL, Isom GE. Reactive oxygen species mediate pyridostigmine-induced neuronal apoptosis: involvement of muscarinic and NMDA receptors. Toxicol Appl Pharmacol. 2001;177(1):17-25.
 45. Charles AJ. Paul T, Mark W, Mark JS. Immunobiology (5ed). Garland Publishing: New York. 2001. 78-81.
 46. Lee CW, Kim SC, Kwak TW, Lee JR, Jo MJ, Ahn YT, Kim JM, An WG. Anti-inflammatory effects of bangpungtongsung-san, a traditional herbal prescription. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:892943.
 47. Lee CW, Park SM, Zhao R, Lee C, Chun W, Son Y, Kim SH, Jung JY, Jegal KH, Cho IJ, Ku SK, Kim YW, Ju SA, Kim SC, An WG. Hederagenin, a major component of *Clematis mandshurica* Ruprecht root, attenuates inflammatory responses in RAW 264.7 cells and in mice. Int Immunopharmacol. 2015;29(2): 528-37.
 48. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkB system. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2016;8(3):227-41.
 49. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappaB. Cell. 1996;78(5):773-85.
 50. Nicklin S, Miller K. Effect of orally administered food grade carrageenans on antibody-mediated and cell mediated immunity in the inbred rat. Food Chem Toxicol. 1984;22:615-21.
 51. Rao CV, Verma AR, Gupta PK, Vijayakumar M. Anti-inflammatory and anti-nociceptive

- activities of *Fumaria indica* whole plant extract in experimental animals. *Acta Pharm.* 2007;57:491-8.
52. Borthakur A, Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G829-38.
53. Stoll LL, McCormick ML, Denning GM, Weintraub NL. Antioxidant effects of statins. *Drugs Today.* 2004;40:975-90.
54. Mohy El-Din MM, Senbel AM, Bistawroos AA, El-Mallah A, Nour El-Din NA, Bekhit AA, Abd El Razik HA. A novel COX-2 inhibitor pyrazole derivative proven effective as an anti-inflammatory and analgesic drug. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108:263-73.
55. Hamsa TP, Kuttan G. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of *Ipomoea obscura* (L) and its mode of action through the inhibition of proinflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. *Inflammation.* 2011;34:171-83.