

LPS로 유도된 RAW264.7 세포주 염증모델에서 소리쟁이의 법제처리에 따른 항염증 효과

김 승 희^{*,**} · 강 순 아^{***,****}

^{*}호서대학교 벤처대학원 융합과학기술학과 박사과정, ^{**}호서대학교 보건산업연구소 연구원
^{***}호서대학교 벤처대학원 융합과학기술학과 교수, ^{****}호서대학교 보건산업연구소 소장

Anti-Inflammatory Effects of Beopje Processed Curly Dock (*Rumex crispus* L.) in LPS-Induced Murine RAW 264.7 Cell Lines

Seung-Hee Kim^{*,**} and †Soon Ah Kang^{***,****}

^{*}Ph.D. Student, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{**}Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{***}Professor, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{****}Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

Abstract

This study investigated the anti-inflammatory effects of processed (Beopje) curly dock (*Rumex crispus* L.) in LPS (lipopolysaccharide)-stimulated murine RAW 264.7 cells. The experimental group was classified into five groups : LPS no treatment, CD (curly dock), CD-B (CD processed through Beopje), LPS, LPS+CD-B (LPS+CD processed through Beopje) and LPS+CD (LPS+CD). Treatment of the Raw 264.7 cell lines using LPS led to a significant increase in NO production, pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β), and inflammation related genes (COX-2 and iNOS). Investigation of the inhibitory effects of CD and processed CD on NO production and expression of iNOS and COX-2 was done in LPS-induced RAW 264.7 cells. There was significant inhibition of NO production by LPS+CD and LPS+CD-B in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). Particularly, LPS+CD-B exhibited reduced mRNA expression of iNOS and COX-2 and NO production as compared to LPS+CD in Raw 264.7 cell lines ($p < 0.05$). These results may explain some known biological activities of curly dock including the anti-inflammatory effects. CD-B in particular exhibited the highest anti-inflammatory effects of inhibiting production of NO, through the regulation of inflammatory related genes and pro-inflammatory cytokines. These results of Beopje processing might help decrease the anti-biological effects and increase several active substances of curly dock.

Key words: curly dock, LPS, Beopje processed, anti-inflammatory effect

서 론

식물체에는 외부환경에 적응하며 견딜 수 있는 생리활성 물질을 함유하고 있어서 식물체 추출물은 인체에 유익한 작용을 한다. 식물체로부터 유익한 기능성 물질을 탐색하는 많

은 연구가 진행되고 있으며, 다년생 식물이나 한해살이 초목들이 활성이 뛰어나다. 따라서 인체에 위해성이 없고 항산화력이 뛰어난 항산화물질 및 항염증을 탐색하는 많은 연구가 이루어지고 있다(Lee & Rhee 2015).

소리쟁이(*Rumex crispus* L.)는 지역에 따라 다양한 이름으

† Corresponding author: Soon Ah Kang, Professor, Dept. of Convergence Science & Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea. Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2059-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

로 불려지는데, 마디풀과로 다년생 초본 식물이고, 어린잎은 나물로도 먹으며, 뿌리는 약재 혹은 염료로 사용하였다(Yun YS 2016). 특히, 뿌리는 말려서 약재로 널리 사용하였는데, 뿌리에는 chrysophanic acid, chrysophanein, emodin 등이 함유되어 있으며(Kim 등 1998; Chang 등 1999; Shin CH 2001; Hwang 등 2004), 염증반응 억제효과(Kim 등 1998; Shin CH 2001; Hwang 등 2004), 간보호 효과(Hwang 등 2004), 메탄올 추출물의 항균과 항산화 활성(Jeong 등 2006; Rhim 등 2012), 에탄올 추출물의 항산화 효과(Park & Choi 2011a) 지방세포 분화 억제효과(Park 등 2013), 항암효과(Shiwani 등 2012) 등이 보고되고 있으며, 해열제, 피부병 등에 외용하기도 한다(Park 등 2013).

포제(炮製), 수치(修治) 또는 법제(法製)는 약재를 가공 처리하여 독성을 저하시켜 약성을 증가시키고, 보관을 용이하게 하며, 치료효과를 증진시키는 방법이다(Kim 등 2002a; Kim 등 2002b; Lee & Kim 2003). 법제하는 방법은 물을 이용하는 방법은 약재 소재를 물 혹은 술을 이용하여 이물질이나 찌꺼기를 씻어버리는 포(泡), 지(漬), 세(洗)의 3종류가 있다. 물과 불을 이용하여 약재 소재를 증기로 찌는 방법은 증(蒸)이라 하고, 삶는 방법을 자(煮)라 하였다. 한약재의 가공처리 방법에 따라 한약의 효능 혹은 안전성 및 독성을 변하게 하므로 예로부터 이 방법을 중시하였다(Lee & Kim 2003).

한약재 생품을 가공 처리하여 약재로 사용한 기록은 신농본초경에서부터 찾아볼 수 있으며, 최초의 포제(炮製) 전문서적은 기원전 1, 2세기경 뇌공포자론(雷公炮炙論)이다. 한의학에서 포제학은 포제의 전통기술학과 현대과학을 융합하여 새로운 제조기법으로 발전시켰으며, 동서의학의 결합에 의한 발전의 초석이 되는 중요한 의미를 지니고 있다(Kim HC 2001).

한약재를 수치 전후의 지표물질의 차이를 본 연구에서 법제한 생강(Zingiberis Rhizoma)은 6-gingerol이 법제한 후 유의적으로 증가하였고(Kim 등 2012; Kim 등 2014), 만성신염 예방제로 활용하는 후박(Magnolia Bark)은 법제 후 당노성 신염을 일으키는 최종당화산물인 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)의 함량이 감소하는 것으로 나타났다(Lee & Kim 2003). 이와 같이 법제과정을 통하여 생강은 염산-에탄올로 유도된 위염(Kim 등 2012), DDS로 유도된 대장염(Kim 등 2014)의 억제효과가 증가하였고, 후박은 당노성 신염 및 만성신염을 감소시키는 것(Kim 등 2002a)으로 보고되어 있다. 법제한 옷나무는 주요 성분인 urushiol이 제거되면서 혈관형성 저해효과 및 폐암세포의 증식을 억제하였다(Vlassara 등 1994; Choi 등 2006).

염증반응은 활성화된 면역세포에서 일어나는 면역반응으로, 면역세포가 바이러스, 세균 등을 포함한 미생물에 노출

되면 활성화된 면역세포에서 염증인자가 발현되어 염증반응을 일으킨다(Wang 등 2002). 염증반응은 다양한 장기에 영향을 주어 비만, 심혈관질환, 당뇨, 천식, 치매, 암 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Hotamisligil GS 2017). 염증반응 시에 대식세포는 nitric oxide(NO)와 hydrogen peroxide와 같은 반응산소 중간물질을 생산하며 숙주에 치명적인 결과를 가져올 때가 있다고 보고되어진다. 대식세포가 lipopolysaccharide (LPS)에 의하여 자극이 되면 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 발현되면서 다량의 NO를 생성하여 염증반응을 일으킨다(Guzik 등 2003). LPS로 활성화된 toll-like receptor-4 (TLR4)는 tumor nuclear factor κ B(NF- κ B)를 활성화시키고, 활성화된 NF- κ B는 pro-inflammatory cytokine인 necrosis factor- α (TNF- α), type 1 interferon(IFN), interleukin-1 β (IL-1 β)를 활성화하여, 염증관련 효소인 iNOS와 cyclooxygenase-2(COX-2)를 활성화시킨다(Xie 등 1994; Lee 등 2004; Lu 등 2008). Nitric oxide는 iNOS의 생성을 증가시키면서, 염증반응이 활성화되어 reactive oxygen species(ROS)를 생성하게 된다(Guzik 등 2003). 과량 생산된 염증매개물질은 과도한 면역반응을 일으키고, 질환을 악화시키는 원인이 되므로 염증 관련 유전자의 활성을 억제한다면 염증매개물질의 생성을 억제하며, 다양한 질병을 억제할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 일반 소리쟁이와 법제한 소리쟁이를 LPS로 염증반응을 유도한 Raw 264.7 cells에 처리한 후, NO의 생성능과 염증관련 유전인자 TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS와 COX-2의 발현정도를 비교 실험하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 준비

소리쟁이와 법제 처리된 소리쟁이 실험재료는 Ga Wha Wellfood Co.(Jincheon, Korea)에서 제공받아서 실험에 사용하였다. 법제하는 방법은 건조된 소리쟁이를 세척한 후 4분간 찢 후 2시간 동안 그늘에서 건조시킨다. 건조된 소리쟁이는 3분간 볶으면서 수분이 제거되면 그늘에서 2시간 동안 건조시키는데 이 과정을 일 1회씩 찢고, 볶는 과정을 3회 반복하고, 60 $^{\circ}$ C 건조기에서 건조시켰다. 건조 후 시료는 마쇄하여 가루로 만들어서 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 가루 시료는 농도에 맞추어서 배지와 혼합하여 실험에 사용하였다(Kim SJ 2012; Park 등 2018).

2. 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주 배양

마우스 대식세포 RAW 264.7 cell line을 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포주의 배양은 Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), 100 U/mL penicillin-streptomycin(PS, Welgene Inc., Gyeongbuk, Korea)을 혼합한 배지를 사용하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 실시하였다. Amrouche 등(2006)의 방법을 수정하여 실험하였다(Lee 등 2014).

3. 생존율 분석

마우스 대식세포 RAW 264.7 cell line을 96well plate에 well 당 3×10^5 cell/mL의 농도로 배양하고, 각 well 당 실험시료를 20 μ L씩 첨가해 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다. 배양을 한 후 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol 2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액을 50 μ L씩 넣고 4시간 동안 incubation 후 MTT 용액을 제거한 후 150 μ L씩 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)를 분주한 후 ELISA reader를 활용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Nitric oxide(NO) 농도 측정

RAW 264.7 cell line의 배지 내 NO 농도는 Griess reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 활용하여 측정하였다. 96-well plate에 well 당 3×10^5 cell/mL 농도로 24시간 동안 배양한 후 2 μ g/mL lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 처리하고, 필터(0.2 μ m, GVS Filtration Inc., Bloomer, WI, USA)를 통과한 소리쟁이 시료 0.1 mg/mL 농도로 48시간 동안 처리하였다. Griess reagent를 세포 배양 상층액에 처리한 후, Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 흡광도를 550 nm에서 측정하였다(Livak & Schmittgen 2001).

5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

RAW 264.7 cell line을 96-well plate에 well 당 3×10^5 cell/mL 농도로 24시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양한 후 배지는 제거하고 2 μ g/mL LPS를 처리하며, 필터(0.2 μ m, GVS Filtration Inc.)를 통과한 시료 0.1 mg/mL 농도의 소리쟁이 시료를 48시간 동안 처리하였다. 세포 배양 상층액을 ELISA kit(BioLegend, San Diego, CA, USA)로 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 농도를 측정하였다. 실험은 제조사로부터 제공된 실험방법에 따라 실험을 진행하였다(Livak & Schmittgen 2001).

6. Real Time - Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RAW 264.7 cell line을 96-well plate에 well당 3×10^5 cell/mL 농도로 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지는 제거하고, 2 μ g/mL LPS를 처리해 필터(0.2 μ m, GVS

Filtration Inc.)를 통과시킨 소리쟁이 시료를 0.1 mg/mL 농도로 48시간 동안 처리하였다(Livak & Schmittgen 2001; Song 등 2017). 배지를 제거한 후 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였고, NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)을 이용하여 정량하였다. 정량된 RNA는 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 역전사하여 cDNA로 합성하였다. cDNA와 각각의 primer, SYBR green(Solis biodyne, Tartu, Estonia)을 혼합한 후 thermal cycler BioRad CFX-96 real time system(BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 유전자 발현을 분석하였다. 시료의 iNOS, COX-2 유전자의 발현을 분석하기 위하여 house keeping 유전자로 18S rRNA를 사용하였고, 사용된 primer 서열은 다음과 같다:

18S rRNA forward 5'-TCGAGGCCCTGTAATTGGAA-3' and reverse 5'-CCCTCCAATGGATCCTCGTT-3', iNOS forward 5'-ATGGCTTGCCCTGGAA-3' and reverse 5'-TATTGTTGGGCTGAGAA-3', COX-2 forward 5'-GGCAGCAAATCCTTGC-3' and reverse 5'-TATTGTTGGGCTGAGAA-3'(22).

7. 통계처리

모든 실험 결과는 Mean \pm standard deviation(S.D.)로 나타내었고, RT-qPCR은 Mean \pm standard error(S.E.)로 나타내었다. Student *t*-test와 one-way analysis of variance(ANOVA)로 검증하여 Duncan's multiple range tests를 이용하여 그룹간의 유의성을 판별하였으며, *p*-value가 <0.05일 때 유의성이 있다고 판단하였다. 모든 실험 분석은 SPSS v18 statistical software package(SPSS Inc. Westlands, Hong Kong)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 생존율에 미치는 영향

마우스 대식세포 Raw 264.7 세포에서 소리쟁이(CD)와 법제처리된 소리쟁이(CD-B)를 0.01, 0.25, 0.05, 0.1 mg/mL 농도별로 처리한 결과, cell viability가 120% 이상으로 나타났다. 또한 저농도인 0.01 mg/mL(CD: 135.0 \pm 20.9, CD-B: 171.4 \pm 20.1)와 0.25 mg/mL(CD: 175.1 \pm 13.9, CD-B: 172.5 \pm 16.6)에서는 법제한 소리쟁이 시료가 생존율이 더 높게 나타났으며, 0.05 mg/mL(CD: 177.4 \pm 10.1, CD-B: 150.1 \pm 22.2) 혹은 0.1 mg/mL 농도(CD: 194.1 \pm 18.4, CD-B: 144.9 \pm 19.8)에서도 법제한 시료의 결과가 145~150% 생존율이 높게 나왔다. 그러므로 소리쟁이(CD)와 법제처리된 소리쟁이(CD-B)의 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성이 없음을 확인할 수 있었으며(Fig. 1), 실험시료의 농도를 0.1 mg/mL로 실험을 하였다.

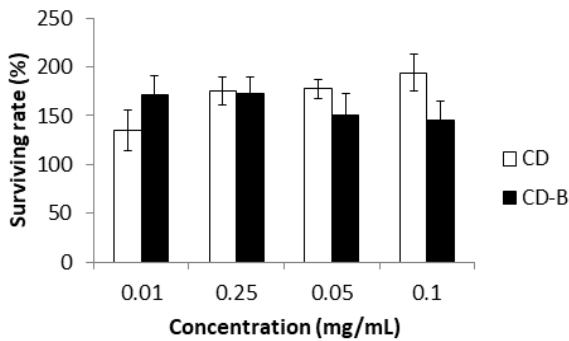


Fig. 1. Cytotoxicity of curly dock and curly dock with Beopje in Raw 264.7 cells. CD: curly dock, CD-B: curly dock with Beopje. Values are mean±S.D. * $p < 0.05$ CD vs CD-B.

2. Raw 264.7 세포에서 NO 생성

Raw 264.7 세포에서 NO 생성능은 LPS 처리군이 미처리군에 비해 48시간과 72시간 모두 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$)(Table 1). LPS 미처리군은 $2.13 \pm 2.77 \mu\text{M}$ 이었고, LPS 처리군은 $13.13 \pm 1.70 \mu\text{M}$ 으로 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 시료를 처리한 경우, LPS 미처리군: no treatment (48H: $2.13 \pm 2.77 \mu\text{M}$, 72H: $1.36 \pm 0.23 \mu\text{M}$)군에 비해 LPS 미처리군+CD(48H: $4.24 \pm 0.55 \mu\text{M}$, 72H: $4.46 \pm 0.69 \mu\text{M}$)는 NO 생성능력이 통계학적으로 유의적인 증가가 있었고($p < 0.05$), LPS 미처리군+CD-B(48H: $2.60 \pm 0.52 \mu\text{M}$, 72H: $3.60 \pm 0.60 \mu\text{M}$)를 처리한 군은 NO 생성능력이 통계학적으로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 특히 48시간에 LPS 미처리군+CD-B($2.60 \pm 0.52 \mu\text{M}$)는 LPS 미처리군+CD($4.24 \pm 0.55 \mu\text{M}$)보다 NO 생성능력이 통계학적으로 유의적인($p < 0.05$) 감소현상을 보였으

Table 1. Nitric oxide (NO) production in Raw 264.7 cells by treatment of LPS, curly dock (CD) and curly dock with Beopje (CD-B)(0.1 mg/mL) (μM)

	48H	72H
No treatment	$2.13 \pm 2.77^{\text{cd}}$	$1.36 \pm 0.23^{\text{d}}$
CD	$4.24 \pm 0.55^{\text{c}}$	$4.46 \pm 0.69^{\text{c}}$
CD-B	$2.60 \pm 0.52^{\text{d}}$	$3.60 \pm 0.60^{\text{c}}$
LPS	$13.13 \pm 1.70^{\text{a}}$	$26.23 \pm 2.38^{\text{a}}$
LPS+CD	$14.90 \pm 1.00^{\text{a}}$	$21.00 \pm 1.50^{\text{b}}$
LPS+CD-B	$11.92 \pm 2.34^{\text{b}}$	$20.16 \pm 1.18^{\text{b}}$

LPS: lipopolysaccharide, CD: curly dock (0.1 mg/mL), LPS+CD: lipopolysaccharide + curly dock (0.1 mg/mL), CD-B: curly dock with Beopje (0.1 mg/mL), LPS+CD-B: lipopolysaccharide + curly dock with Beopje (0.1 mg/mL).

^{a-d} Means (\pm S.D., $n=3\sim4$) with the different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

나, 72시간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 법제한 소리쟁이(CD-B)를 처리함에 따라 증가한 NO 생성량을 감소하는 결과를 보였다.

Raw 264.7 세포에 LPS처리 군에서는 48시간 처리군에서 LPS($13.13 \pm 1.70 \mu\text{M}$)군에 비해 LPS+CD($14.90 \pm 1.00 \mu\text{M}$) 처리군에서 유의한 변화가 없었으나, LPS+CD-B($11.92 \pm 2.34 \mu\text{M}$)를 처리한 군은 NO 생성능력이 통계학적으로 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 또한 72시간에서는 LPS($26.23 \pm 2.38 \mu\text{M}$)군에 비해 LPS+CD($21.00 \pm 1.50 \mu\text{M}$)와 LPS+CD-B($20.16 \pm 1.18 \mu\text{M}$)를 처리한 군은 NO 생성능력이 두 군에서 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 법제한 소리쟁이(CD-B)가 LPS로 활성화시킨 Raw 264.7 세포에서 NO 생성을 억제하는 효과가 있음을 보여주었다.

약용식물로서 소리쟁이는 피토케미칼을 함유하고 있으며, 플라보노이드와 페놀성 화합물이 풍부하고, DPPH 라디칼 소거능 및 유지산화 억제 효과 등 항산화 활성이 높은 것으로 보고되어 있으며(Oh DH 1986; Kim 등 2010; Jeong KS 2012; Kim 등 2013; Yun YS 2016), 소리쟁이 뿌리에 의한 중금속 흡착능이 높다는 결과를 보였다(Jeong KS 2012). 특히 carrageenan으로 유도된 부종모델에서 소리쟁이 종자의 뛰어난 항염증 작용을 확인하였으며(Lee 등 2007), 한의학에서는 소리쟁이 뿌리가 담낭질환, 피부병, 입파선 질환, 암의 보조치료제로 이용하기도 한다(Jeong 등 2006; Park 등 2006; Khattab & Arntfield 2009). 법제하지 않은 생강에 비해 유효성분인 gingerol 함량이 법제과정을 통하여 증가하는 것으로 보고되었다(Kim 등 2012; Kim 등 2014). 만성신염 예방제로 활용하는 후박(Magnolia Bark)은 법제 후 당뇨병 신염을 일으키는 최종 당화산물인 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)의 함량이 감소하는 것으로 나타났다(Vlassara 등 1994; Kim 등 2002a). 또한 볶은 커피콩에서도 NO의 생성량을 감소시킴으로써(Kim 등 2016) 가공방법에 따른 약성이 차이를 볼 수 있었다.

연구결과, LPS로 유도된 염증반응을 소리쟁이가 억제하여 NO의 생성을 감소시킨 것으로 생각되며, 법제한 소리쟁이가 법제하지 않은 소리쟁이에 비하여 NO의 생성을 억제하는 것은 법제과정을 통하여 독성을 감소시키며, 유효성분의 양을 증진시켜(Lee & Kim 2003; Khattab & Arntfield 2009) 염증반응을 더욱 억제한 것으로 사료된다. 이러한 생리적 효능이 있는 소리쟁이를 법제에 의하여 효능의 차이가 있음은 기능성 소재 개발에 새로운 가공방법을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

3. Raw 264.7 세포에서 pro-inflammatory cytokine의 함량

마우스 대식세포주 Raw 264.7 세포에서 LPS처리에 의해 유도된 염증반응에서 pro-inflammatory cytokine(TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 함량 변화를 본 결과는 Fig. 2에 보여준다. LPS를

처리한 경우, LPS 미처리군에 비하여 TNF- α , IL-6와 IL-1 β 가 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 2). LPS 처리군(TNF- α : 719.58 \pm 26.41 pg/mL, IL-1 β : 305.38 \pm 58.89 pg/mL, IL-6: 1,041.92 \pm 33.60 pg/mL)은 LPS 미처리군(TNF- α : 481.71 \pm 92.10 pg/mL, IL-1 β : 173.91 \pm 35.98 pg/mL, IL-6: 681.28 \pm 208.18 pg/mL)에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 보였다($p < 0.05$). 이는 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포주 염증 모델에서 LPS처리에 의하여 pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 함량이 증가됨을 보여주었다.

LPS를 처리하지 않은 군에서 소리쟁이 시료(CD)(TNF- α : 530.15 \pm 130.08 pg/mL, IL-1 β : 190.53 \pm 13.16 pg/mL, IL-6: 947.52 \pm 135.22 pg/mL)와 법제한 소리쟁이(CD-B)(TNF- α : 568.26 \pm 34.58 pg/mL, IL-1 β : 140.16 \pm 30.31 pg/mL, IL-6: 824.46 \pm 81.82 pg/mL)를 처리한 군은 LPS를 처리하지 않은 군과는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 LPS를 처리한 군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소현상을 보였다($p < 0.05$).

LPS로 유발된 RAW 264.7 세포주 염증 모델에서 LPS처리에 의하여 증가된 pro-inflammatory cytokine(TNF- α : 719.58 \pm 26.41 pg/mL, IL-1 β : 305.38 \pm 58.89 pg/mL, IL-6: 1,041.92 \pm 33.61 pg/mL)에 실험시료의 처리에 의한 결과는 Fig. 2와 같다. TNF-

α 함량은 LPS+CD-B군(574.37 \pm 145.31 pg/mL)이 LPS+CD(653.85 \pm 52.18 pg/mL)보다 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). IL-1 β 함량도 LPS+CD-B군(175.27 \pm 38.57 pg/mL)이 LPS+CD군(240.26 \pm 34.45 pg/mL)보다 통계학적으로 유의한 감소현상을 보였다($p < 0.05$). IL-6 함량도 LPS+CD-B군(610.26 \pm 274.11 pg/mL)이 LPS+CD군(977.87 \pm 102.14 pg/mL)보다 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 이 결과는 소리쟁이의 항염증 효과를 증명하였고, 소리쟁이를 법제한 때 pro-inflammatory cytokine 함량을 현저히 감소시켰으므로 법제 방법에 따라 항염증의 생리활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

대식세포의 활성화 인자인 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포주 염증 모델이 널리 이용되어진다. 면역세포에 LPS를 처리하면 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되고, 신경전달 및 염증 반응을 매개하며(Miyasaka & Hirata 1997; Wang 등 2002), 염증관련 인자(TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , iNOS, COX-2)가 급격히 증가하는데(Livak & Schmittgen 2001), 과량 생산된 염증매개물질에 의하여 염증반응이 활발하여 각종 질환을 악화시키는 원인이 된다(Seo 등 2000; Ahn 등 2009). 따라서 본 연구에서는 소리쟁이와 법제한 소리쟁이가

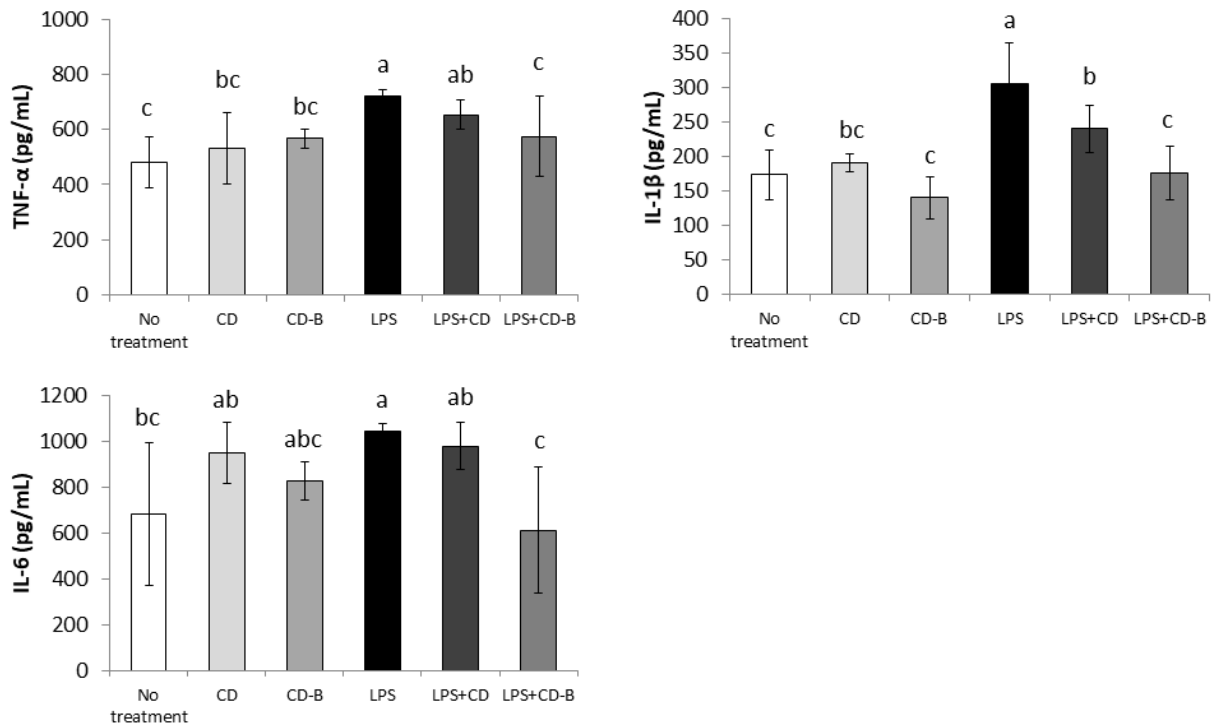


Fig. 2. Pro-inflammatory cytokines of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in Raw 264.7 cells by the treatment of LPS, curly dock and curly dock with Beopje. ¹⁾ CD: curly dock (0.1 mg/mL), CD-B: curly dock with Beopje (0.1 mg/mL), LPS: lipopolysaccharide, LPS+CD: lipopolysaccharide + curly dock (0.1 mg/mL), LPS+CD-B: lipopolysaccharide + curly dock with Beopje (0.1 mg/mL). ^{a-c} Means (\pm S.D., n=3~4) with the different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

LPS로 활성화된 RAW 264.7 식세포에서 NO 생성량에 미치는 영향을 알아본 결과, 농도의존으로 NO 생성량이 감소하였다.

Park 등(2018)의 보고에 의하면 소리쟁이(CD)는 *ex vivo* 마우스의 비장세포에 LPS를 처리하면 NO의 생성이 증가하였고, TNF- α , IFN- γ , IL-6와 IL-1 β 가 증가하였으며, 염증관련 인자인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 증가하였다.

아토피를 유도한 Balb/c 마우스에서 소리쟁이가 아토피 증상이 억제되고, 비장의 무게가 감소하였으며(Rao 등 1993; Ahn 등 2009), LPS로 활성화 시킨 후 RAW 264.7 세포에서 소리쟁이 추출물에 의한 NO 생성 감소 및 iNOS 발현을 억제시켰다는 보고가 있었다(Park & Choi 2011b). 본 연구에서도 LPS로 유도된 염증반응으로 IL-1 β , IL-6농도가 증가하였고, 소리쟁이를 처리하면 감소하는 것으로 나타났다. 이는 소리쟁이 추출물이 폴리페놀 함량이 높으며, 항산화 활성(Oh DH 1986; Kim 등 2010; Yun YS 2016) 작용으로 LPS로 유도된 염증유발인자를 감소시키는 것으로 여겨진다. 항산화 활성이 높은 소리쟁이를 활용하여 양념돈육에 이용하였을 때 저장성과 연도 등 품질특성 개선효과(Jeong KS 2012), 소리쟁이 뿌리 추출물도 산화스트레스로 야기된 활성산소를 억제하는 역할(Kim 등 2013)을 하면서 새로운 생물소재로 활용 가치가 있다.

본 연구에서 법제처리된 소리쟁이(CD-B)는 법제처리하지 않은 것(CD)보다 염증유발인자(TNF- α , IL-6, IL-1 β)를 감소시키는 효과가 컸는데, Park 등(2018)의 보고에 의하면 본 연구와는 다른 세포인 *ex vivo* 마우스의 비장세포에서 법제된 소리쟁이에 의하여 TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β , iNOS와

COX-2가 감소하였다. 법제된 생강이 dextran sulfate sodium (DSS)로 대장염이 유도된 마우스에서 TNF- α , IL-6, IFN- γ 의 농도를 감소시키는 효과(Kim 등 2014)가 있었다. 또한, 법제한 후박은 당뇨성 신염 및 만성신염을 감소시키는 것(Kim 등 2002a)으로 보고되는데, 이는 법제를 통해 인체에 유용한 물질을 증진시켜 더욱 높은 염증억제 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

4. Raw 264.7 세포에서 iNOS, COX-2의 mRNA 발현

마우스 대식세포주 Raw 264.7 세포에서 LPS처리에 의해 유도된 염증반응에서 NO 생성과 관련된 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 본 결과는 Fig. 3에 보여준다. LPS를 처리하면 미처리군에 비해 iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 3). LPS 미처리군에 비하여 LPS 처리군(iNOS: 8.77 ± 0.22 , COX-2: 3.68 ± 0.15)은 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 보였다($p < 0.05$). 이는 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포주 염증 모델에서 LPS처리에 의하여 iNOS, COX-2 mRNA 발현이 증가됨을 보여주었다.

LPS를 처리하지 않은 군에서 소리쟁이 시료(CD)(iNOS: 1.27 ± 0.08 , COX-2: 1.45 ± 0.03)와 법제한 소리쟁이(CD-B)(iNOS: 0.71 ± 0.02 , COX-2: 1.49 ± 0.05)를 처리한 군은 LPS를 처리하지 않은 군과는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 iNOS 발현은 법제 처리한 소리쟁이 군이 처리하지 않은 군보다 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

LPS로 유발된 RAW 264.7 세포주 염증 모델에서 LPS처리에 의하여 증가된 pro-inflammatory cytokine(iNOS: 8.77 ± 0.22 , COX-2: 3.68 ± 0.15)에 실험시료의 처리에 의한 결과는 Fig. 3

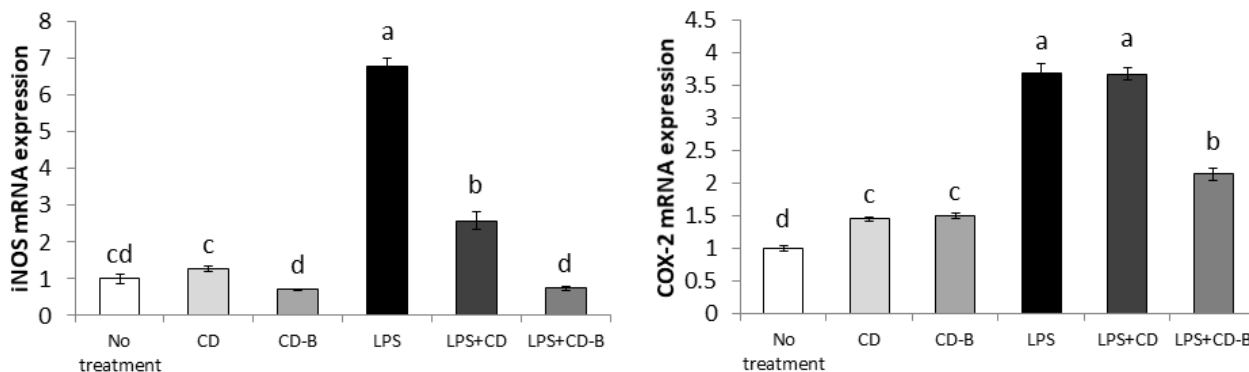


Fig. 3. mRNA expression of inflammation related genes (iNOS and COX-2) in Raw 264.7 cells by the treatment of LPS, curly dock and curly dock with Beopje. ¹⁾ CD: curly dock (0.1 mg/mL), CD-B: curly dock with Beopje (0.1 mg/mL), LPS: lipopolysaccharide, LPS+CD: lipopolysaccharide + curly dock (0.1 mg/mL), LPS+CD-B: lipopolysaccharide + curly dock with Beopje (0.1 mg/mL). The mRNA expression levels were calculated based on 18S rRNA, which was used as a control (no treatment fold ratio = 1). ^{a-d} Means (\pm S.D., $n=3-4$) with the different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

과 같다. iNOS 발현은 LPS+CD-B군(0.74±0.06)이 LPS+CD군(2.58±0.23)보다 통계학적으로 유의한 감소 결과를 보였다($p<0.05$). COX-2 발현은 LPS+CD-B군(2.14±0.09)이 LPS+CD군(3.67±0.10)보다 통계학적으로 유의한 감소 결과를 보였다($p<0.05$). 이 결과는 소리쟁이의 항염증 효과를 증명하였고, 소리쟁이를 법제하였을 때 iNOS와 COX-2 발현 정도를 현저히 감소시켰으므로 법제 방법에 따라 항염증의 생리활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

Raw 264.7 cells과 RBL-2H3 cell에서 즉 피부상재균에 대한 소리쟁이 뿌리추출물의 항균활성과 항염증 효과는 염증반응에 관여하는 β -hexosaminidase 효소를 감소시켜 염증반응을 억제시켰다(Lee 등 2007; Yun II 2009; Park & Choi 2011b). Arachidonic acid(AA)가 COX(cyclooxygenase) pathway를 통하여 prostglandins(PGs)과 leukotrienes을 생산하는데(Rao 등 1993), 이 물질들이 염증반응을 유도할 때 소리쟁이 섭취에 의하여 부종이 감소하였고, carrageenan으로 유도된 부종을 감소시키며, 항염증인자의 감소를 보이면서 항염증 효과를 보고하였다(Park & Choi 2011b). 본 연구에서도 타 연구와 비슷하게 LPS로 유도된 COX-2의 mRNA 발현을 소리쟁이가 억제시켜 항염증 효과를 보였고, iNOS 발현도 감소시켜 염증 억제효과를 확인하였다. 특히 본 연구의 목적인 법제처리한 소리쟁이는 법제하지 않는 소리쟁이보다 COX-2의 발현을 유의적으로 감소시켰는데, 이는 Kim 등(2014)의 연구인 생강을 법제한 경우 법제하지 않은 생강보다 대장염 유도 마우스에서 COX-2와 iNOS의 발현이 유의하게 감소된 것과 유사하다.

이상과 같은 결과는 우리나라의 전통적인 방법인 법제 과정은 독성은 제거하고, 유용한 물질의 함량을 높인다(Kim HC 2001; Kim 등 2002a; Kim 등 2002b; Kim 등 2012; Kim 등 2014). 한약재를 수처 전후의 지표물질의 차이를 본 연구에서 법제한 생강(Zingiber Rhizoma)은 6-gingerol이 법제한 후 유의적으로 증가하였고(Kim 등 2012; Kim 등 2014), 만성신염 예방제로 활용하는 후박(Magnolia Bark)은 법제 후 당뇨성 신염을 일으키는 최종당화산물인 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)의 함량이 감소하는 것으로 나타났다(Vlassara 등 1994; Kim 등 2002b). 이와 같이 법제과정을 통하여 생강은 염산-에탄올로 유도된 위염(Kim 등 2012), DDS로 유도된 대장염(Kim 등 2014)의 억제효과가 증가하였고, 후박은 당뇨성 신염 및 만성신염을 감소시키는 것(Kim 등 2002a)으로 보고되어 있다. 법제한 옻나무는 주요 성분인 urushiol이 제거되면서 혈관형성 저해효과 및 폐암세포의 증식을 억제하였다(Choi 등 2006). 법제처리를 하면 소재의 유용한 활성성분이 증가하게 되고, 항염증 효과가 더 향상된 것으로 사료되므로 추가적인 연구가 필요하다.

요약 및 결론

본 연구는 소리쟁이(CD)와 법제처리한 소리쟁이(CD-B)는 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리한 경우, 미처리군에 비하여 NO 생성량이 증가하였고, pro-inflammatory cytokine인 TNF- α , IL-6와 IL-1 β 가 증가한 결과를 보였으며, 염증관련 인자인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였다. 그러나 LPS를 처리한 Raw 264.7 세포에 CD와 CD-B를 처리하면, 즉 소리쟁이와 법제처리한 소리쟁이를 처리한 경우, NO의 생성이 통계학적으로 유의하게 감소하였고, 염증관련 인자인 TNF- α , IL-6와 IL-1 β 농도가 감소하였으며, iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 소리쟁이의 활성 성분들에 의하여 염증 억제효과가 나타난 것으로 보며, 법제 처리에 의한 소리쟁이는 유용한 물질 성분이 증가되어 일반 소리쟁이보다 더욱 활성화된 항염증 효과가 나타난 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(116169-3).

References

- Ahn JY, Im LR, Kim JH, Park JH, Kim DK, Lee YM. 2009. Effects of *Rumecis radix* water extract on development of atopic dermatitis in BALB/c mice. *Korean J Pharmacogn* 40:218-223
- Amrouche T, Boutin Y, Prioult G, Fliss I. 2006. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. *Int Dairy J* 16:70-80
- Chang SW, Kim IH, Han TJ. 1999. Anthraquinone productivity by the cultures of adventitious roots and hairy from curled dock (*Rumex crispus*). *Korean J Plant Tissue Cult* 26:7-14
- Choi WC, Lee JH, Lee EO, Lee HJ, Yoon SW, Ahn KS, Kim SH. 2006. Study on antiangiogenic and antitumor activities of processed *Rhus verniciflua* Stokes extract. *J Physiol Pathol Korean Med* 20:825-829
- Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469-487
- Hotamisligil GS. 2017. Inflammation, metaflammation and immuno-

- metabolic disorders. *Nature* 542:177-185
- Hwang SW, Ha TJ, Lee JR, Lee J, Nam SH, Park KH, Yang MS. 2004. Isolation of anthraquinone derivatives from the root of *Rumex japonicus* H. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47:274-278
- Jeong GT, Lee GM, Park DH. 2006. Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chem Eng Res* 44:81-86
- Jeong KS. 2012. A study on antioxidant activity of ethanol extract from *Rumex crispus* and metal adsorptivity of it's root. *J Korea Acad-Ind Coop Soc* 13:934-940
- Khattab RY, Arntfield SD. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Anti-nutritional factors. *LWT-Food Sci Technol* 42:1113-1118
- Kim AJ, Lee H, Ko HW, Ko SH, Woo N. 2016. Physiological activity of coffee beans and roasted black beans (*Rhynchosia nulubilis*) mixture extracts for coffee alternative beverage development. *Korean J Food Nutr* 29:178-185
- Kim DK, Choi SU, Rye SY, Lee KR. 1998. Cytotoxic constituents of *Rumex crispus*. *Yakhak Hoeji* 42:233-237
- Kim HC. 2001. Study on the Standardization of Drug Processing in Traditional Korean Medicine. pp.3-56. Ministry of Health and Welfare
- Kim HJ, Hwang EY, Im NK, Park SK, Lee IS. 2010. Antioxidant activities of *Rumex crispus* extracts and effects on quality characteristics of seasoned pork. *Korean J Food Sci Technol* 42:445-451
- Kim JS, Kim HJ, Ko JH. 2002a. Studies on the processing of herbal medicines (III) - HPLC analysis of magnolol and inhibitory effects on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) *in vitro* of unprocessed- and processed magnolia bark. *Korean J Pharmacogn* 33:308-311
- Kim JS, Kim HJ, Ma JY, Kim JM. 2002b. Studies on the processing of herbal medicines (II) - HPLC analysis of standard compounds of unprocessed- and processed herbal medicines. *Korean J Pharmacogn* 33:305-307
- Kim SJ, Kim SH, Lim YI, Kim YG, Park KY. 2014. Inhibitory effects of ginger and Beopje ginger on DSS-induced colitis in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:477-484
- Kim SJ, Kim YG, Park KY. 2012. Inhibitory effects of ginger and processed (Beopje) ginger extracts on HCl-ethanol induced gastritis in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:1528-1533
- Kim SJ. 2012. Preventive effects of Beopje ginger and taemyeong-cheong on *in vivo* gastritis and colitis. Master's Thesis, Pusan National Univ. Pusan. Korea
- Kim YS, Suh HJ, Park S. 2013. Antioxidant and photoprotective activities of various extracts from the roots of *Rumex crispus* L. *Korean J Food Preserv* 20:684-690
- Lee JY, Jun DY, Yoon YH, Ko JY, Woo KS, Woo MH, Kim YH. 2014. Anti-inflammatory effect of flavonoids Kaempferol and Biochanin A-enriched extract of barnyard millet (*Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea*) grains in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Life Sci* 24:1157-1167
- Lee KH, Rhee KH. 2015. Screening of anti-inflammatory herbs having the activation of MAPK family proteins. *Korean J Food Nutr* 28:343-350
- Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Cho HJ. 2004. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 19:3375-3381
- Lee SS, Kim DH, Yim DS, Lee SY. 2007. Anti-inflammatory, analgesic and hepatoprotective effect of semen of *Rumex crispus*. *Korean J Pharmacogn* 38:334-338
- Lee YM, Kim JS. 2003. Studies on the processing of herbal medicines (VI) - HPLC analysis of standard compounds of unprocessed-and processed herbal medicines. *Korean J Orient Med* 9:69-72
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151
- Miyasaka N, Hirata Y. 1997. Nitric oxide and inflammatory arthritis. *Life Sci* 61:2073-2081
- Oh DH. 1986. Studies on the quality of cures meat in the processing. Ph.D. Thesis, Chonbuk National Univ. Jeonju. Korea
- Park DH, Jeong GT, Lee GM. 2006. Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chem Engine Res* 44:81-86
- Park ES, Song GH, Lee SM, Kim TY, Park KY. 2018. Increased anti-inflammatory effects of processed curly dock (*Rumex crispus* L.) in *ex vivo* LPS-induced mice splenocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47:599-604
- Park JA, Choi MO. 2011a. Antioxidant effects of *Rumex crispus* L. root extracts and protective effects on human HaCaT keratinocyte. *J Korean Soc Cosmetol* 17:263-268

- Park JA, Choi MO. 2011b. Antimicrobial activity and anti-inflammation effect to the human skin pathogens by the *Rumex crispus* L. root extracts. *Korean J Aesthe Cosmetol* 9:9-16
- Park SJ, Choi JH, Jung YS, Yu MH. 2013. Inhibitory effect of *Rumex crispus* L. fraction on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J Food Sci Technol* 45:90-96
- Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. *Inflammation* 17:723-741
- Rhim TJ, Choi MY, Park HJ. 2012. Antioxidative activity of *Rumex crispus* L. extract. *Korean J Plant Res* 25:568-577
- Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. 2000. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol* 35:21-28
- Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. 2001. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 76:119-123
- Shin CH. 2001. Studies on the antioxidative character in the ethyl acetate extractions of *Rumex crispus*. *Korean J Bio-technol Bioeng* 16:592-602
- Shiwani S, Singh NK, Wang MH. 2012. Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutr Res Pract* 6:389-395
- Song GH, Park ES, Lee SM, Kim TY, Park KY. 2017. An atopic preventive drink (APD) reduces Th2 cytokines in LPS-treated Raw 264.7 cells. *Tang* 7:e15
- Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffs M. 1994. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11704-11708
- Wang Y, Vodovotz Y, Kim PK, Zamora R, Billiar TR. 2002. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 963:415-422
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269:4705-4708
- Yun IJ. 2009. Inhibitory effects of methanol extract of *Rumex crispus* on NO production and iNOS expression from LPS-stimulated Murine RAW 264.7 cell lines. Master's Thesis, Chosun Univ. Gwangju. Korea
- Yun YS. 2016. Physicochemical properties and antioxidative activities of *Rumex crispus* extract. Master's Thesis, Tongmyong Univ. Busan. Korea

Received 23 July, 2019
Revised 08 August, 2019
Accepted 16 August, 2019