

청피 물 추출물의 항염증 효과와 기전 연구

¹경희대학교 대학원 임상한의학과, ²경희대학교 한의과대학 한방부인과교실
안태석¹, 황덕상^{1,2}, 이진무^{1,2}, 장준복^{1,2}, 이창훈^{1,2}

ABSTRACT

Anti-inflammatory Effect and Mechanism of Citri Reticulatae Viride Pericarpium Water Extract

Tae-Seok Ahn¹, Deok-Sang Hwang^{1,2}, Jin-Moo Lee^{1,2},
Jun-Bock Jang^{1,2}, Chang-Hoon Lee^{1,2}

¹Dept. of Clinical Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University
²Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives: This study was designed to examine anti-inflammatory effect and mechanism of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract (CRE).

Methods: Cell cytotoxicity was tested with RAW 264.7 cells. To investigate anti-inflammatory effect of CRE in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cell, we measured nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10). In addition, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) were examined by western blotting in LPS-induced RAW 264.7 cell with treated CRE.

Results: In cytotoxicity analysis, CRE does not affect cell cytotoxicity. As compared with the control group, the expression of NO, PGE2, TNF- α , IL-6 were significantly decreased, and IL-10 was significantly increased in LPS-induced RAW 264.7 cell with treated CRE. As a result of Western blotting, there was concentration-dependent inhibition of pp38, pERK in MAPK pathway and significant reduction of pp65 in the NF- κ B pathway.

Conclusions: CRE might have anti-inflammatory effect in LPS-induced macrophages by promoting the production of IL-10.

Key Words: *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*, Anti-inflammatory, Lipopolysaccharide, Macrophage, Interleukin-10

“본 논문은 2021년도 경희대학교 석사학위 졸업논문임.”

Corresponding author(Chang-Hoon Lee) : Dept. of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology, Kyung Hee University Hospital at Gangdong, Dongnam St 892, Gangdong-gu, Seoul, Korea
Tel : +82-2-440-6197 E-mail : lchgds1@hanmail.net

I. 서 론

염증이란 감염이나 자극 또는 손상에 대응하는 기본적인 방법으로 손상된 조직을 복원하고 재형성할 뿐만 아니라 배란과 호르몬 생산에 영향을 미치며, 자궁 내막의 수용성을 변화시킨다¹⁾. 특히 한방여성의학에서는 痛經, 帶下, 癥瘕, 不孕 질환에서 血瘀와 濕熱의 병인이 염증성 질환과 관련 있는데, 염증이 만성적으로 지속되면 正氣를 손상시켜 肝腎不足, 脾腎虧虛, 肝鬱氣滯 등을 겸하게 되므로 환자의 虛實寒熱을 감별하여 적절하게 치료해야 한다²⁾.

염증성 질환에서 나타나는 통증과 발열 등의 증상을 완화하기 위해 흔히 소염제를 사용하고 있는데, 그 중 비스테로이드 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 세계적으로 널리 사용되는 약물이다. 하지만 소화기계, 심혈관계, 신 요로계에 걸친 다양한 부작용이 보고되면서, 여러 가지 종류의 NSAIDs 품목 허가가 취소되기도 하였다³⁾. 스테로이드도 강력한 항염증 및 면역조절 효과를 가지지만, 고용량 또는 장기간 사용할 경우 약물 내성과 심혈관계, 내분비계 등의 부작용이 발생하여 문제가 되고 있다⁴⁾.

최근 기존 약물보다 부작용이 적을 것으로 기대되는 천연물에 관한 관심이 높아지면서 염증 억제 효과를 가진 본초 및 방제에 관한 연구들이 활발하게 이루어지고 있다. 香附子, 金銀花, 龍膽, 升麻 등은 cyclooxygenase-2(COX-2) 활성 억제 효과가 보고되었고, 九味羌活湯, 四君子湯, 參朮健脾湯, 人蔘敗毒散, 黃連解毒

湯 등은 nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2) 및 interleukin-6(IL-6)의 생성 억제를 통한 항염증 효과가 보고되었다⁵⁻¹¹⁾.

靑皮는 부인과에서 빈용되는 歸朮破癥湯, 加味逍遙散, 加味四七湯, 梔子清肝湯 등의 방제에 활용되어 脇肋乳房脹痛, 乳腫, 乳核, 癥瘕積聚, 食積을 주로 치료한다^{12,13)}. 靑皮의 항염증 효과와 관련된 실험적 연구로 PC12 신경세포에서 항염증 효과¹⁴⁾, DNA 손상 모델에서 항산화 작용¹⁵⁾이 보고되었는데, 산화적 스트레스는 염증 반응과 관련되어 있다¹⁶⁾. 또한, 대식세포에서 염증 매개물질인 NO의 생산을 억제한다는 보고가 있었는데¹⁷⁾, mitrogen-activated protein kinase(MAPK) 및 nuclear factor kappa B(NF-κB) 신호전달 경로에서 염증 억제 효과의 기전에 관한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 靑皮의 항염증 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 靑皮 물 추출물을 첨가하고 lipopolysaccharide(LPS)로 염증을 유도한 뒤, macrophage에서 분비되는 NO, PGE2, tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), IL-6 및 interleukin-10(IL-10)을 측정하고 MAPK 및 NF-κB 신호전달 경로를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 약 재

靑皮(*Citri Reticulatae Viride Pericarpium*)는 운향과(芸香科, Rutaceae)에 속한 상록 소고목인 귤나무(*Citrus reticulata* Blanco,

혹은 *C. unshiu Markovich*)의 유과(幼果) 또는 미성숙 과실의 과피(果皮)이다¹²⁾. 경희한약(Wonju, Kangwon, Korea)에서 靑皮를 구매하여 중량의 10배 되는 증류수를 첨가한 뒤 4시간 동안 100℃에서 가열하였다. 추출물은 원심분리(3000 rpm, 30분)하여 상등액을 회수한 뒤 pore size가 0.2 µm인 membrane filter(Whatman, Philadelphia, PA, USA)를 사용하여 靑皮의 물 추출물(*Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, 이하 CRE)을 얻었다. Stock solution의 농도는 Phosphate Buffered Saline(PBS)를 사용하여 건조 중량에 대하여 100 mg/ml의 농도로 준비하여 4℃에 보관하면서 실험에 적용하였다.

2) 시 약

세포 배양을 위한 Roswell park memorial institute(RPMI)-1640 medium, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotic-antimycotic mixture는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하였고, 염증 유도를 위한 LPS와 NO 분석을 위한 Griess reagent는 Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다. 세포독성 효과 분석을 위한 Cell counting kit(Ez-Cytox)는 Daeil Lab.(Seoul, Korea)에서, TNF-α, PGE2, IL-6 및 IL-10 분석을 위한 Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)에서 구입하였다. 신호전달 분석을 위한 anti-NFκB 및 anti-β-actin, and horseradish peroxidase(HRP)-conjugated secondary antibodies 등의 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA)에서 구입

하였고, anti-pospho-JNK, anti-pospho-ERK 및 anti-pospho-p38 항체는 Cell Signaling Technology(Boston, Massachusetts, USA)에서 구입하였다.

3) 세포주 및 세포 배양

RAW 264.7 cell은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. RAW 264.7 cell은 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지를 이용하여 온도 37℃, 습도 95%, 5% CO₂의 함량을 유지하는 배양기(Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, USA)에서 배양하였다. 배양하는 세포는 2-3일 간격으로 계대 배양하면서 유지하였다.

2. 방 법

1) RAW 264.7 cell에 대한 세포독성 측정

RAW 264.7 cell을 4.0×10^4 /well의 밀도로 96 well plate의 각 well에 plating한 후, 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도의 CRE를 첨가하여 1일간 배양하였다. 세포 독성 효과는 water soluble tetrazolium(WST)를 이용하는 Ez-Cytox를 이용하여 제조사의 지침에 따라 30분 후에 흡광도를 450 nm에서 측정하였고, CRE를 첨가하지 않은 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

2) Macrophage에 LPS 처리 후 염증 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 24 well plate의 각 well에 2.0×10^5 /well이 되도록 분주하고 CRE의 최종 농도가 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml이 되도록 조정하여 2시간 동안 배양하였다. 이후 500 ng/ml 농도의 LPS를 첨가하고 24시간 동안 배양한 후 각 배양액에 생산된 염증 매개체인 NO, PGE2, TNF-α, IL-6

및 IL-10의 양을 측정하였다. NO의 함량은 세포 배양 상등액 및 Griess 시약을 각각 0.1 ml씩 혼합하여 암실에서 10분 동안 반응시킨 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite 표준용액을 이용하여 얻은 표준 곡선에 대입하여 표현하였다. PGE2, TNF- α , IL-6 및 IL-10의 함량은 각 cytokine에 대한 ELISA kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

3) Western blotting

RAW 264.7 cell을 2.5×10^6 /well로 조정하여 12시간 배양한 후 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 이후 500 ng/ml 농도의 LPS로 첨가하여 30분간 추가 배양한 뒤 잔존 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. Protease inhibitor cocktail (Roche diagnostics corporation, Indianapolis, Indiana, USA), Dithiothreitol(Wako, Tokyo, Japan), NaVO₄(Sigma), β -glycerophosphate (Sigma), Phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma)로 조성한 Radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer를 이용하여 30분간 4°C에서 세포를 용해하였다. RIPA buffer에 의해 용출된 단백질은 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4°C)하여 상등액을 얻은 후 Pierce BCA Protein Assay kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 군당 동량의 단백질(20 μ g/well)을 10% sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통하여 단백질을 분리한 후에 Polyvinylidene fluoride membrane(Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)에 80분간 전사하였다. 단백질이 전사된 membrane은 5%

skim milk in tris-buffered saline containing 0.1% Tween(TBST) 20을 이용하여 2시간 동안 blocking하였다. 1차 항체가 반응된 membrane은 TBST를 이용하여 세척단계를 거친 뒤, HRP가 표지된 2차 항체(HRP-conjugated anti-mouse IgG)를 2시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST 세척단계를 거친 후 항체반응이 완료된 membrane을 Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)와 반응시켜 X-ray film(Agfa, Mortsel, Belgium)에 현상하여 특정 단백질의 발현을 비교하였다.

4) 통계 분석

실험 결과의 통계 분석 처리는 SPSS (version 24.0)를 사용하였고, 실험군과 대조군의 비교는 student's t-test로 분석하여 p-value가 0.01 및 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. RAW 264.7 cell에 대한 세포독성 평가

RAW 264.7 cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 세포독성을 측정된 결과, 각각 $102.98 \pm 11.03\%$, $109.42 \pm 3.73\%$, $113.19 \pm 4.48\%$ 및 $115.41 \pm 0.80\%$ 로 나타났다(Fig. 1).

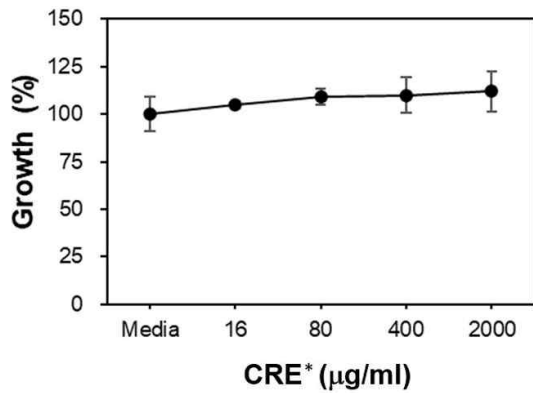


Fig. 1. Cytotoxicity of CRE on RAW 264.7 cell.

*CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract

2. Macrophage에 LPS 처리 후 염증 억제 효과

1) NO

RAW 264.7 cell에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 NO의 분비를 측정하는 결과, LPS만 처리한 경우 21.82±0.82 µM에 비하여 400 µg/ml 및 2000 µg/ml에서 각각 15.49±0.93 µM, 13.12±1.0 µM로 나타나 통계적으로 유의하게 (**p<0.01) 억제되었다(Fig. 2).

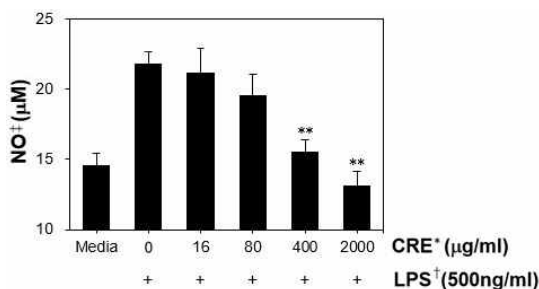


Fig. 2. Production of NO from macrophage stimulated by CRE and LPS (**p<0.01).

*CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, †LPS : lipopolysaccharide, *NO : nitric oxide

2) PGE2

RAW 264.7 cell에 16 µg/ml, 80 µg/ml,

400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 PGE2의 분비를 측정하는 결과, LPS만 처리한 경우 3997.18±954.26 pg/ml에 비하여 400 µg/ml 및 2000 µg/ml에서 각각 2122.08±639.50 pg/ml, 2045.19±760.82 pg/ml로 나타나 통계적으로 유의하게 (*p<0.05) 억제되었다(Fig. 3).

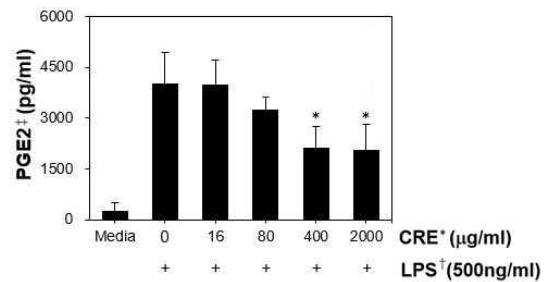


Fig. 3. Production of PGE2 from macrophage stimulated by CRE and LPS (*p<0.05).

*CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, †LPS : lipopolysaccharide, *PGE2 : prostaglandin E2

3) TNF-α

RAW 264.7 cell에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 TNF-α의 분비를 측정하는 결과, LPS만 처리한 경우 358.92±51.97 pg/ml에 비하여 400 µg/ml 및 2000 µg/ml에서 각각 221.35±27.38 pg/ml, 149.51±18.70 pg/ml로 나타나 통계적으로 유의하게 (**p<0.01) 억제되었다(Fig. 4).

4) IL-6

RAW 264.7 cell에 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 IL-6의 분비를 측정하는 결과, LPS만 처리한 경우 1232.80±117.4 pg/ml에 비하여 2000 µg/ml에서 790.84±60.7 pg/ml로 나타나 통계적으로 유의하게 (**p<0.01) 억제되었다(Fig. 5).

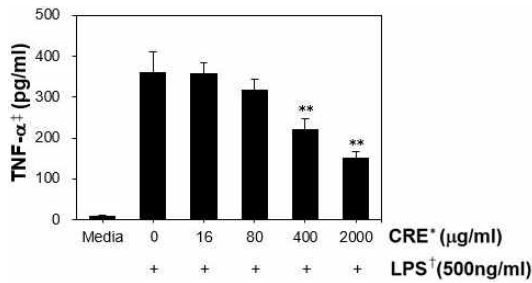


Fig. 4. Production of TNF-α from macrophage stimulated by CRE and LPS (**p<0.01). *CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, †LPS : lipopolysaccharide, †TNF-α : tumor necrosis factor-α

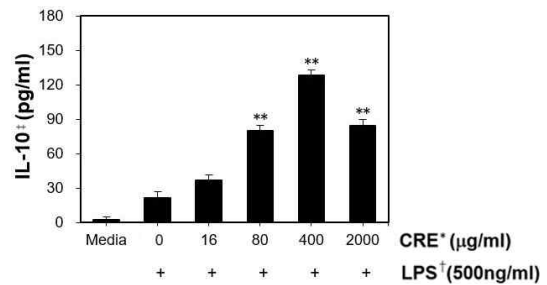


Fig. 6. Production of IL-10 from macrophage stimulated by CRE and LPS (**p<0.01). *CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, †LPS : lipopolysaccharide, †IL-10 : interleukin-10

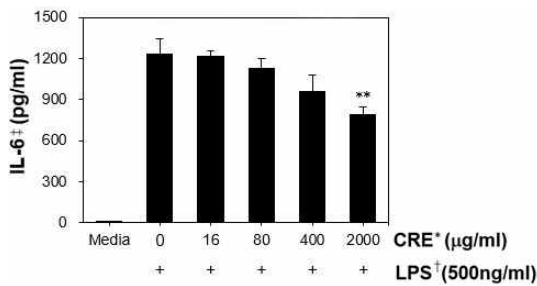


Fig. 5. Production of IL-6 from macrophage stimulated by CRE and LPS (**p<0.01). *CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, †LPS : lipopolysaccharide, †IL-6 : interleukin-6

5) IL-10

RAW 264.7 cell에 16 μg/ml, 80 μg/ml, 400 μg/ml 및 2000 μg/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 IL-10의 분비를 측정하는 결과, LPS만 처리한 경우 21.81±5.29 pg/ml에 비하여 80 μg/ml, 400 μg/ml 및 2000 μg/ml에서 각각 80.25±4.45 pg/ml, 128.59±4.33 pg/ml, 84.43±5.43 pg/ml로 나타나 통계적으로 유의하게(**p<0.01) 증가하였다(Fig. 6).

3. MAPK(pERK, ERK, pp38, p38) 신호전달 경로의 활성화 억제 효과

RAW 264.7 cell에 80 μg/ml, 400 μg/ml 및 2000 μg/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 신호전달 관련 단백질의 변화를 측정하는 결과, LPS 단독 처리한 대조군에 비해 인산화된 pp38 및 pERK가 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 7).

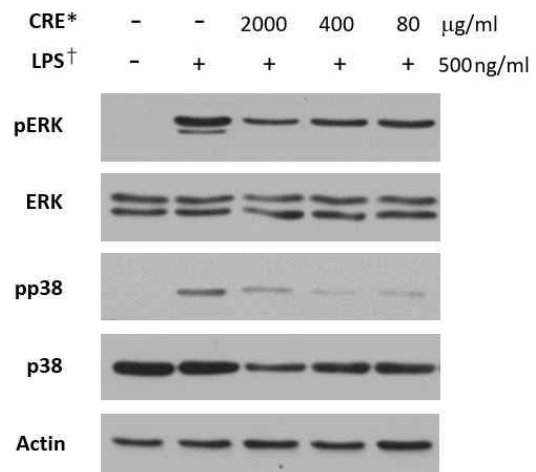


Fig. 7. Inhibition of MAPK pathway activation by CRE and LPS on RAW 264.7 cell.

*CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, †LPS : lipopolysaccharide

4. NF-κB(pp65, p65) 신호전달 경로의 활성화 억제 효과

RAW 264.7 cell에 80 μg/ml, 400 μg/ml 및 2000 μg/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 신호전달 관련 단백질의 변화를 측정된 결과, 모든 농도의 CRE 처리군에서 인산화된 pp65가 크게 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 8).

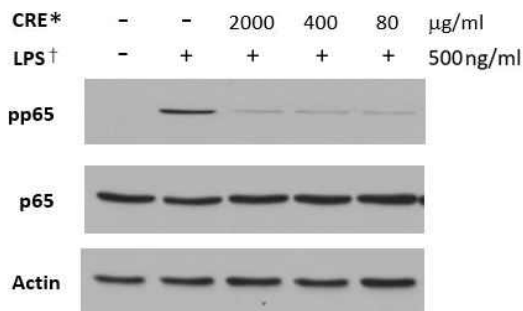


Fig. 8. Inhibition of NF-κB pathway activation by CRE and LPS on RAW 264.7 cell.

*CRE : *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract, †LPS : lipopolysaccharide

IV. 고찰

여성의 골반 내 자궁, 난관, 난소 등의 장기에 발생하는 염증성 질환은 성적 활동이 활발한 가임기 여성에게 상행성 감염으로 발생하며, 전체 가임기 여성의 10-15%가 한 번 이상 치료를 받을 정도로 흔한 질환이다¹⁸⁾. 골반염은 급성 복통, 고열 같은 전형적인 증상 외에도 질 분비물 증가, 성교통, 생리불순, 오심 및 구토 등의 다양한 증상이 나타나고, 때로는 증상이 미묘하거나 전혀 없는 경우도 있다^{19,20)}. 일반적으로 급성으로 시작하여 완전 치료가 되지만, 치료 후에도 약 25%에서 만성 골반염으로 이행되어 난관 인자의 난임, 자궁 외 임신, 복강

내 유착, 만성 골반통 같은 심각한 후유증을 남길 수 있어 적절한 염증 치료가 임상적으로 매우 중요하다²¹⁾.

靑皮는 性이 微溫하고 味는 苦辛하여 辛味는 發散하고 苦味는 泄氣시키며 溫性은 通氣시켜 肝膽 二經에 들어가 疏肝破氣, 散結消痰하는 효능이 있다. 三稜, 莪朮, 鬱金 등과 배합한 梔子清肝湯은 氣滯血瘀로 인한 癥瘕積聚를 치료하고, 柴胡, 香附子, 靑橘葉 등과 배합한 大七氣湯은 肝氣鬱結로 인한 乳房脹痛을 치료한다. 이처럼 靑皮는 부인과 질환에서 氣滯證에 多用하는 本草이다¹²⁾.

귤나무의 미성숙한 과피인 靑皮와 성숙한 과피인 陳皮의 지표성분으로는 flavanone glycoside인 hesperidine, narirutin, naringin 과 alkaloid 성분인 synephrine이 있다. 靑皮와 陳皮의 함유 성분은 유사하지만, 과실이 성숙하면서 성분의 함량이 감소하는 것으로 알려져 있으며, 이는 약리 작용에도 차이가 있을 수 있다^{13,22,23)}. 靑皮 추출물과 陳皮 추출물을 각각 생쥐에게 경구투여한 후 복강 macrophage에 대한 면역능을 측정된 결과 陳皮 추출물은 macrophage의 NO 생성 및 phagocytic activity에 영향을 주지 않았으나 靑皮 추출물은 macrophage의 염증 매개 물질인 NO 생성을 억제하고 phagocytic activity를 증가시켜 陳皮보다 靑皮가 면역조절능력이 탁월한 것으로 보고되었다²²⁾. 하지만 대식세포에서 靑皮 추출물이 염증 매개물질을 억제하는 기전에 관한 연구는 아직까지 없었다.

이에 저자는 靑皮的 염증 억제 효과를 확인하고자 RAW 264.7 cell에 CRE를 첨가하고 LPS로 염증을 유도한 뒤, RAW 264.7 cell에서 NO, PGE2, TNF-α, IL-6

및 IL-10을 관찰하고, western blotting을 통해 MAPK(pERK, ERK, pp38, P38) 및 NF- κ B(pp65, p65) 활성화를 확인하였다.

CRE의 macrophage에 대한 세포독성을 살펴보기 위해 RAW 264.7 cell에 CRE를 첨가하고 측정된 결과 100%에 가까운 세포 증식을 확인하여 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다.

선천 면역에서 대식세포는 병원균을 탐식하고 항원으로 제시하며, T세포는 항원의 정보를 인식하여 자기, 비자기의 여부를 판단한다. 이 과정에 관여하는 T cell helper(Th)는 Th1, Th2, Th17 및 regulatory T cell(Treg)로 분류하는데, T세포의 분화와 작용에 Interferon- γ (IFN- γ), IL, TNF와 같은 cytokine들이 관여한다. Cytokine은 세포 사이의 정보전달을 하는 단백질로 T세포, 대식세포, 단핵구 등에서 생산된다. macrophage에서 분비되는 cytokine은 TNF- α , IL-6, IL-10 등이 있다^{24,25}). TNF- α 는 원래 종양 괴사를 유발할 수 있는 순환 인자로 알려졌으나, 이후에 염증 반응과 세포의 증식에 중요한 역할을 하는 pro-inflammatory cytokine으로 밝혀졌다²⁶⁻⁸). TNF- α 는 발열, 부종, 혈관 확장 등의 염증 반응에 관여하고 reactive oxygen species(ROS) 생산을 유도하며, 혈관 내피 세포에서 백혈구 유착, 혈관 누출, 혈관 내 응고 촉진의 역할을 한다^{29,30}). IL-6은 감염이나 조직 손상에서 즉각적으로 생산되어 급성 염증 반응과 면역 반응, 조혈을 통해 숙주 방어에 기여한다. 또한, 급성 염증 및 감염의 표지자인 C-reactive protein(CRP)의 발현을 유도하는데 주요한 역할을 한다³¹). IL-10은 대표적인 항염증

cytokine으로 처음에는 Th2 type의 cytokine으로 소개되었지만 이후에 Treg과 연관성이 밝혀졌고, 현재는 적응 면역계의 Th1, Th17, B세포와 선천 면역계의 대식세포, natural killer(NK) cell 등 다양한 세포에서 발현되어 염증 반응, 종양 발생 및 자가면역 질환에서 중요한 역할을 담당한다^{32,33}).

염증 유도물질로 흔히 사용하는 LPS는 그람음성균의 세포 외막에 존재하는 endotoxin이다. LPS의 과도한 염증 자극은 활성화된 대식세포 표면의 toll-like receptor4(TLR4)에 감지되어 TNF- α , IL-6 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하고, inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 COX-2의 발현을 유도하여 염증 매개 물질인 NO와 PGE2를 생성한다³⁴). 염증 반응의 지표물질인 NO는 면역조절, 혈관 확장, 신경신호 전달 등의 기능을 가진 free radical로 L-arginine에서 NO synthase(NOS)라는 효소에 의해 생산된다^{35,36}). NOS는 크게 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)로 분류된다. 특히 iNOS는 LPS 또는 pro-inflammatory cytokine에 의해 발현되어 과다한 NO를 생성하면 부적절한 염증 반응을 일으켜 조직 및 신경 손상, 유전자 변이, 악성 종양 등을 유발하기 때문에 iNOS에 의한 NO의 생성경로는 염증 반응의 연구 분야에서 병리학적으로 중요하게 여겨진다³⁷⁻⁹). PGE2는 세포막의 인지질 분해 산물인 arachidonic acid으로부터 유래하는 prostaglandin 중 하나로, COX라는 효소에 의해 합성이 촉진된다. COX에는 두가지 이상의 isoenzyme이 존재하는데, COX-1은 위 점막 보호, 신장 혈류조절, 혈소판 응집 등의 정상적인

생리적 기능을 담당하는 반면, COX-2는 외부 자극으로 발현되어 염증 반응 및 세포 증식에 관여한다⁴⁰⁾. 이러한 COX-2에 의해 생산되는 PGE2는 발열, 통증, 부종 등의 염증 반응을 매개하고, 면역반응을 조절한다. 또한, 대식세포에서 PGE2는 염증성 cytokine의 생성을 억제하고 IL-10과 같은 염증 억제 cytokine의 생성을 유도한다⁴¹⁾. IL-10은 LPS로 활성화된 단핵구와 대식세포에서 iNOS, COX-2 같은 염증 관련 효소의 발현을 억제하여 NO와 PGE2의 생산을 조절하고, TNF- α , IL-6 같은 pro-inflammatory cytokine의 생성과 분비를 억제한다⁴²⁻⁵⁾.

CRE의 염증 억제 활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 CRE를 첨가하고 LPS로 염증을 유도한 뒤, macrophage에서 분비되는 NO, PGE2, TNF- α , IL-6 및 IL-10을 측정하였다. 그 결과 NO, TNF- α 는 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었고, PGE2, IL-6는 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었다. 반면에 IL-10은 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 증가하였다. 따라서 CRE의 염증 억제 효과는 항염증성 cytokine인 IL-10의 발현을 유의미하게 증가시켜 염증성 cytokine과 염증 매개물질의 생산을 조절하는 것에서 기인할 것으로 생각한다.

LPS는 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 세포 내부의 신호 전달경로인 MAPK와 NF- κ B의 활성화를 유도하여 염증성 cytokine과 염증 매개 인자를 발현시킨다³⁴⁾. MAPK는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun amino-terminal kinases(JNK), p38이라는 protein을 포함하는 신호전달 경로인데, ERK, JNK, p38은 기저 상태

에서 인산화되지 않은 상태로 세포 내에 존재하다가 LPS 같은 외부 염증성 자극을 받으면 인산화를 통해 핵으로 전위하여 염증 반응을 매개한다⁴⁶⁻⁸⁾. NF- κ B는 대부분 세포에 존재하는 전사인자로 p50과 p65가 가장 대표적이며, 염증 반응과 면역조절 등에 관여하는 신호전달 경로이다. 기저 상태에서는 I κ B와 결합하여 세포질 내에 활성화되지 않은 상태로 존재하다가 감염 혹은 LPS 같은 endotoxin이나 염증성 cytokine에 의해 I κ B가 인산화되면 핵 속으로 이동해 유전자의 κ B element에 결합해 전사를 가져온다⁴⁹⁻⁵³⁾. 따라서 MAPK 및 NF- κ B는 염증 반응과 관련된 유전자의 발현에 있어서 주요한 신호전달 경로이며, LPS로 자극된 대식세포에서 MAPK와 NF- κ B의 활성을 억제하는 약물은 과도한 염증 반응을 치료하는 데 활용 가능성이 있다⁵⁴⁾.

CRE의 신호전달 경로의 활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 western blotting을 이용하여 pERK, ERK, pp38, p38, pp65, p65 단백질의 변화를 측정하였다. 그 결과, LPS 단독 처리군에 비해 인산화된 pp38 및 pERK가 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였는데, 이는 CRE가 MARK 경로의 활성화를 억제하여 LPS에 의한 염증 반응을 감소시킬 가능성을 시사한다. 또한, 모든 농도의 CRE 처리군에서 인산화된 pp65가 크게 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 CRE가 NF- κ B 경로의 활성화를 억제하여 염증 반응을 감소시킬 가능성이 존재할 것으로 생각한다.

결론적으로 CRE는 항염증성 cytokine인 IL-10의 분비를 증가시켜 염증 억제

를 유도하는 것으로 사료된다. 하지만 본 연구는 macrophage에서의 면역 활성화와 염증 억제 측면만을 관찰했다는 한계점이 있어 향후 BALB/c mouse를 이용한 생체 외 실험으로 경구 투여 시 적응면역계와 장관면역계의 반응에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 이러한 점을 보완하여 염증 억제 활성을 가진 靑皮의 유효성분을 확인하고 그 기전에 관한 후속 연구들이 이뤄진다면 IL-10 발현과 연관된 염증성 질환에 활용 가능성이 있을 것이라고 생각한다.

V. 결 론

靑皮의 염증 억제 효과를 확인하고자 RAW 264.7 cell에 CRE를 첨가하고 LPS로 염증을 유도한 뒤, NO, PGE2, TNF- α , IL-6 및 IL-10을 관찰하고 western blotting을 이용하여 MAPK(pERK, ERK, pp38, P38)와 NF- κ B(pp65, p65) 신호전달 경로의 활성화 억제를 분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. RAW 264.7 cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가한 결과 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다.
2. RAW 264.7 cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극 후 NO를 측정하는 결과 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었다.
3. RAW 264.7 cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극 후 PGE2를 측정하는 결과 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었다.
4. RAW 264.7 cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극 후 TNF- α 를 측정하는 결과 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었다.
5. RAW 264.7 cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극 후 IL-6를 측정하는 결과 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 억제되었다.
6. RAW 264.7 cell에 16 μ g/ml, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극 후 IL-10을 측정하는 결과, 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도에서 유의하게 증가하였다.
7. RAW 264.7 cell에 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 western blotting 결과, MAPK 신호전달 경로에서 pp38, pERK의 발현이 농도 의존적으로 억제되었다.
8. RAW 264.7 cell에 80 μ g/ml, 400 μ g/ml 및 2000 μ g/ml 농도의 CRE를 첨가하고 LPS로 자극한 후 western blotting 결과, NF- κ B 신호전달 경로에서 pp65의 발현이 크게 감소되었다.

Received : Jan 10, 2021

Revised : Jan 18, 2021

Accepted : Feb 26, 2021

References

1. Weiss G, et al. Inflammation in reproductive disorders. *Reprod Sci.* 2009;16(2):216-29.
2. Korean Obstetrics and Gynecology compilation committee. *Korean Obstetrics and Gynecology II.* Seoul:Euseongdang. 2012:157.
3. Ahn GY, Bae SH. Strategies for the safe use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Korean Med Assoc.* 2018;61(6):367-75.
4. Kim JM, Park SH. Risk and benefit of steroid therapy. *Korean J Med.* 2009;77(3):298-303.
5. Kim YK, et al. COX-2 Inhibition and Anti-inflammatory Effects of Traditional Herbal Medicine. *Korean Journal of Oriental Medicine.* 2002;8(1):65-74.
6. Min KR, et al. Inhibitory effects of herbal extracts on cyclooxygenase activity of prostaglandin H2 synthase from sheep seminal vesicle. *Natural Product sciences.* 1996;2(1):56-74.
7. Lee DH, et al. detection of antiinflammatory agents from natural products as inhibitors of cyclooxygenase I and II. *Natural Product sciences.* 1997;3(1):19-28.
8. Kim HP, et al. effects of naturally occurring flavonoids on inflammatory responses and their mechanisms. *Natural Product sciences.* 2000;6(4):170-8.
9. Noh MS, et al. Inhibitory activities of natural products in lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. *Yakhak Hoeji.* 1998;42(6):558-66.
10. Moon TC, et al. Screening of cyclooxygenase -2 (COX-2) inhibitors from natural products. *Yakhak Hoeji.* 1998;42(2):214-9.
11. Lee JA, et al. Comparative study of 25 herbal formulas on anti-inflammatory effect. *J Korean Obstet Gynecol.* 2010;23(3):101-11.
12. Herbology compilation committee of Korean Traditional Medical colleges. *Herbology.* Seoul:YoungLim Co. 2006:394-5.
13. Herbal pharmacology textbook compilation committee, *Herbal pharmacology.* 3th ed. Seoul:Shinilbooks. 2010:103, 219-23.
14. Ye YJ, Kim YB, Kang MS. Effects of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* on 4-Hydroxynonenal-induced inflammation in PC12 cells. *J Korean Med Res.* 2016;16(2):79-84.
15. Li X, Huang Y, Chen D. Protective effect against hydroxyl induced DNA damage and antioxidant activity of *Citri Reticulatae Pericarpium.* *Adv Pharm Bull.* 2013;3(1):175-81.
16. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994;269(7):4705-8.
17. Jeong HY, Oh CH, Eun JS. Effect of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* water extract on immunocytes in mice. *Korean J Orient Med Pathol.* 1998;12(2):55-62.
18. Yudin MH, et al. Vaginal polymorphonuclear

- leukocytes and bacterial vaginosis as markers for histologic endometritis among women without symptoms of pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(2):318-23.
19. Hakakha MM, et al. Leukorrhea and bacterial vaginosis as in-office predictors of cervical infection in high-risk women. *Obstet Gynecol.* 2002;100(4):808-12.
 20. Shin JS, et al. Leukocytes and lactobacilli of vaginal discharge as a predictor of pelvic inflammatory disease. *J Korean Obstet Gynecol.* 2007;50(9):1247-53.
 21. Lee EK, et al. A Clinical Report on Two Patients with Chronic Pelvic Inflammatory Disease. *J Korean Obstet Gynecol.* 2018;31(3):109-20.
 22. Hosada K, et al. Studies on the preparation and evaluation of Kijitsu, the immature citrus fruits. III. Relation between diameter of Kijitsu and synephrine content. *Yakugaku Zasshi.* 1990;110(1):82-4.
 23. Eun JS, Yum JY. Effect of *Aurantii nobilis Pericarpium* and *Aurantii immaturi Pericarpium* on Immunocytes in Mice. *Kor J Pharmacogn.* 1998;29(3):173-8.
 24. Futoshi S. Immunity and allergic disease 7 : Futoshi S. *New SIM Internal Medicine.* 1st ed. Seoul:Jeongdam. 2008:5-13.
 25. Cavailon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother.* 1994;48(10):445-53.
 26. Carswell EA, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975;72(9):3666-70.
 27. Pennica D, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(18):6060-4.
 28. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001;11(9):372-7.
 29. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res.* 2013;62(7):641-51.
 30. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-60.
 31. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
 32. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-81.
 33. Asadullah K, Steery W, Volk HD. Interleukin-10 Therapy-Review of a New Approach. *Pharmacol Rev.* 2003;55(2):241-69.
 34. Matthay MA, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a national heart, lung, and blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(7):1027-35.
 35. Kang YJ, et al. Inhibitory effects of morachalcone a on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *J Cancer Prev.* 2009;14(2):118-23.
 36. Moncada S, Higgs EA. Molecular

- mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995;9(13):1319-30.
37. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6(12):3051-64.
38. Yang EJ. Anti-Inflammatory activity of *Euphorbia jolkini* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *KSBB J.* 2019;35(3):120-5.
39. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994;305(2):253-64.
40. Na HK, Surh YJ. Role of cyclooxygenase-2 and its products in the regulation of cell growth. *J Cancer Prev.* 2003;8(4):251-60.
41. Ji JD, et al. Prostaglandin E2(PGE2): roles in immune responses and inflammation. *J Rheum Dis.* 2004;11(4):307-16.
42. Niiro H, et al. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide stimulated monocytes : its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood.* 1995;85(12):3736-45.
43. Huang CJ, et al. Interleukin-10 inhibition of nitric oxide biosynthesis involves suppression of CAT-2 transcription. *Nitric Oxide.* 2002;6(1):79-84.
44. Fiorentino DF, et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991;147(11):3815-22.
45. Moore KW, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
46. Song HY, et al. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 T at protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)-induced inflammation in mice. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(6):1348-57.
47. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002;298(5600):1911-2.
48. Kim MJ, et al. Anti-inflammatory effect of *Chondria Crassicaulis* ethanol extract on MAPKs and NF- κ B signaling pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *KSBB J.* 2017;32(4):352-60.
49. Park GY, et al. Pro-inflammatory cytokine expression through NF- κ B/I κ B pathway in lung epithelial cells. *Tuberc Respir Dis.* 2000;49(3):332-42.
50. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell.* 1996;84(6):853-62.
51. Alkalay I, et al. Stimulation-dependent I κ B α phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(23):10599-603.
52. Finco TS, Baldwin AS. Mechanistic aspects of NF- κ B regulation: the emerging role of phosphorylation and

- proteolysis. *Immunity*. 1995;3(3):263-72.
53. Brockman JA, et al. Coupling of a signal response domain in I κ B α to multiple pathways for NF- κ B activation. *Mol Cell Biol*. 1995;15(5):2809-18.
54. Kim SY, et al. Anti-inflammatory effect of *Stevia Rebaudiana* as a results of NF- κ B and MAPK inhibition. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2013;26(3):54-64.