

활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀 에탄올 추출물의 항염증 효과

장선일, 김형진¹, 황기명, 배현옥¹, 윤용갑, 정헌택, 김윤철
임뮤노피아, ¹원광대학교 의약자원연구센터

Abstract

Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract of *Angelica uchiyamana* in Activated Murine RAW 264.7 macrophages.

S.I. Jang, H.J. Kim¹, K.M. Hwang, H.O. Pae¹,
Y.G. Yun, H.T. Chung, Y.C. Kim

Institute of Immunopia, Iksan, Chonbug, 570-749, Republic of Korea.

¹Medicinal Resources Research Center of Wonkwang University, Iksan, Chonbug, 570-749, Republic of Korea.

The inhibitory effects of ethanol extract of Radex *Angelica uchiyamana*, on LPS- or IFN- plus LPS-induced production of NO, and TNF- α , and expression of iNOS and COX-2 were investigated in the activated RAW 264.7 cells. This extract significantly inhibited the production of NO and TNF- α , and suppressed the expression of iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner. These results show that ethanol extract of Radex *Angelica uchiyamana* may explain some known biological activities including anti-inflammatory effect, and is of considerable benefit in the treatment for NO and pro-inflammatory cytokine overproduction related immunological diseases.

Key word : Nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2), ethanol extract, *Angelica uchiyamana*. RAW 264.7 macrophages.

교신저자: 김 윤 철

전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 약학대학 생약학실

TEL : 063)850-6823

E-mail : yckim@wonkwang.ac.kr

접수일자 : 2002. 11. 26

채택일자 : 2002. 12. 21

* 본 연구는 보건복지부의 벤처 및 중소기업기술개발지원 연구개발사업(01-PJ4-PG4-01VN01-0325)의 일환으로 수행되었음.

I. 서 론

당귀(*Angelica uchiyamana*)는 한국을 비롯한 동양권에서 보혈, 심장질환, 항균작용 등 인체질환에 빈번히 쓰여온 식물성 한약제다. 최근에 천연물에 대한 관심이 높아지면서 당귀가 함유한 유용물질에 대한 연구가 활발한데, 뿌리는 decursin, decursinol, nodakenin 등의 coumarin 유도체와 α -pinene, limonene), β -eudesmol, elemol 등 주요성분을 함유하고 있고, 이들은 자궁기능 조절작용, 진정작용, 진통작용, 항균작용, 설사작용 및 비타민E 결핍치료작용에 효과가 있는 것으로 알려졌다¹⁻⁴⁾.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부물질에 노출되면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응에 원인이 되는 많은 인자를 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속시킨다^{5,6)}.

Nitric oxide(NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-argine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 interferon- γ (IFN- γ) 또는 lipopolysacchride (LPS)로 자극될 때 inducible NOS(iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 많은 양의 NO는 염증반응 매개물질의 역할을 하게 된다⁵⁻⁷⁾. 또한 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor(TNF- α)와 같은 pro-inflammatory cytokine과 cyclooxygenase-2(COX-2)와 같은 염증 매개물질을 과량 생산하게 된다.

이와 같이 염증 매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, TNF- α , COX-2와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 중요한 도움이 될 것이다^{5-7, 8-10)}.

최근 천연물로부터 염증반응 억제 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 전개되고 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 본 연구에서도 천연물, 특히 프로쿠마린계열의 화합물을 함유한 당귀의 유효성분을 에탄올로 추출한 다음 이 추출물이 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 분비되는 NO, iNOS, TNF- α , 및 COX-2 등 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 당귀에탄올 추출물은 이들 염증 매개물질을 뚜렷하게 억제시키는 항염증 효과가 있었다.

II. 재료 및 방법

1) 재 료

DMEM과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, U.S.A)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-L]-2,5-dephenyltetrazolium bromide(MTT), trypan blue, DAPI와 propidium iodide(PI)은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Anti-iNOS는 Santa Cruz (California, U.S.A.)에서 구입하였다. Anti-COX-2는 BD bioscience(California, U.S.A.)에서 구입하였다. 모든 용매는 분석등급으로 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2) RAW 264.7 세포주의 배양

당귀 에탄올 추출물이 염증반응 매개물질의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 설치류의 대식세포 RAW 264.7을 사용하였다. 설치류의 대식세포 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC TIB TIB-71, Rockville, MD)에서 구입하여, DMEM 배지로 1×10^6 세포/ml의 농도를 유지했고, 여기에 10%의 열에 비활성화된 우태아 혈청, 페니실린 G (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 μ g/ml) 및 L-글루타민 (2 mM)를 보충하여, 5% CO₂와 95%의 공기를 포함하는 가습 조건 하에서 37°C 온도를 유지하여 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 에탄올 추출물을 여러 가지 농도 (1~100 μ g/ml)로 2시간 전 처리하고 10 ng/ml의 LPS와 10 U/ml의 IFN- γ 또는 LPS 단독으로 자극하여 염증 매개물질의 생성능력을 측정하였다.

3) 당귀의 수집 및 추출

실험에 사용한 당귀(*Angelica uchiyamana*)는 전북 익산시 소재 한약건재상에서 구입하였으며, 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 증거표본(WK 089)은 원광대학교 약학대학 표본실에 보관 중에 있다. 공기에 충분히 건조된 당귀의 뿌리는 절단한 후 세절된 당귀 (300 g)을 에탄올 (1 L)에 넣고 2시간 동안 가열 추출한 다음 여과하고 여액을 감압 농축하여 에탄올 추출물 40.5 g(13.5 w/w%)을 얻었다.

4) MTT 분석

NBT-II 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 간단

히 말해서 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서 1×10^6 cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간동안 배양한 뒤 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액이 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH4.7)을 첨가함으로써 용해했다. 그리고 계속해서 20-24시간동안 배양하였다. formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

5) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-아지닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griss reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μ l씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토메타(MD, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

6) Western blot

당귀 에탄올 추출물과 IFN- γ + LPS 또

는 LPS가 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 μg 을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 TTBS로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 TBS로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1: 1,000) 또는 anti-COX-2 antibody (1: 1,000)을 주입하여 3 시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG(1 : 100)을 주입하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL방법으로 발색시켰다.

7) TNF- α 의 측정

LPS로 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀 에탄올 추출물이 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TNF- α assay kit(R&D System Inc., Minneapolis, U.S.A.)을 이용하여 ELISA법으로 정량하였다. 즉, 2시간동안 에탄올 추출물(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 전처리하고 6시간동안 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극한 후 R&D System에서 제공된 방법에 준하여 TNF- α 를 정량하였다.

8) 통계 분석

각각의 실험들은 적어도 3번 이상 실행되었다. 결과는 평균값 \pm 표준편차로 표현했다. 통계 분석은 Student's t-test를 이용했다.

III. 결과 및 고찰

당귀(*Angelica uchiyamana*)의 뿌리는 decursin, decursinol, nodakenin 등의 coumarin 유도체와 α -pinene, limonene), β -eudesmol, elemol 등 주요성분을 함유하고 있고, 이들은 자궁기능 조절작용, 진정작용, 진통작용, 항균작용, 설사작용 및 비타민E 결핍치료작용에 효과가 있는 것으로 알려져 있지만¹⁻⁴⁾, 항염증 효과에 대한 작용은 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 당귀에탄올 추출물이 염증성 매개물질로 알려진 NO, TNF- α 및 COX-2의 생성 능력에 미치는 영향을 조사하였다.

IFN- γ 와 LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 당귀 에탄올 추출물의 농도에 따른 세포 생존율을 MTT assay법에 준하여 조사한 결과 Fig. 1과 같다. 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 IFN- γ 와 LPS 처리군의 생존율은 약 70%로 감소하였으나, 당귀 에탄올 추출물을 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 세포 생존율이 높아졌다. 특히 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 대조군과 비슷하게 세포 생존율이 향상되었다.

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. 특히 interferon- γ (IFN- γ) 또는 lipopolysacchride(LPS)로 대식세포를 자극하면 iNOS가 과량 발현되면서 많은 양의 NO를 생성하게 된다⁵⁻⁷⁾. NO는 외부물질에 대한 개체 방어작용에 중요한 생체 분자지만, 많은 양의 NO가 생산되면, 염증반응 매개물질로 작용하여 TNF- α , IL-1 및 IL-6 등 pro-inflam-

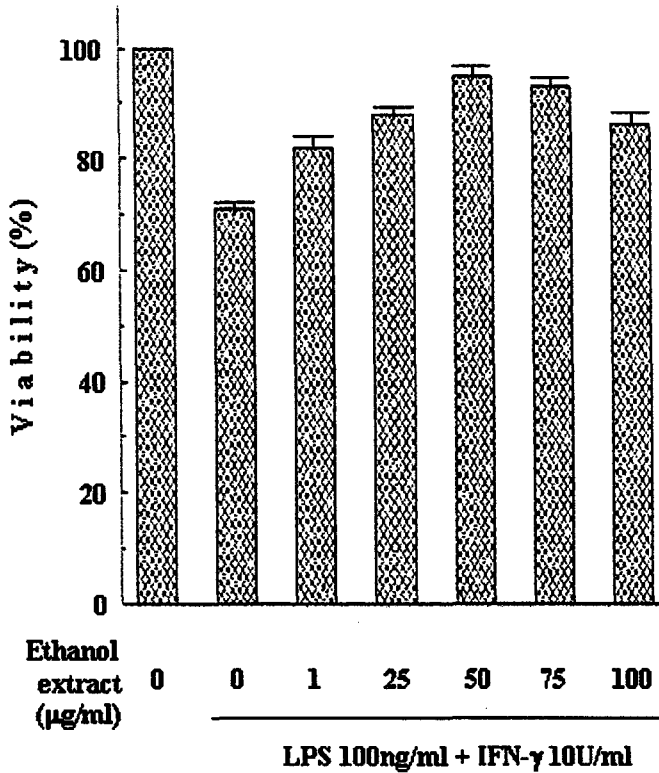


Fig. 1. Dose-dependant cell viability in *Angelica uchiyamana* ethanol extract-treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 (1×10^6 /well plate) with or without IFN- γ (10 U/ml) plus LPS (10 ng/ml) for 24 h in the presence or absence of *Angelica uchiyamana* ethanol extract at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means \pm SD of three independant experiments.

matory cytokine 뿐만 아니라 COX-2의 분비를 촉진하여 심각한 염증반응을 일으킨다. 따라서 본 연구에서는 당귀 에탄올 추출물이 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생산량에 미치는 영향을 알아 보았다. 그 결과 농도에 의존적으로 NO 생산량이 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1

과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다⁸⁻¹⁰. 그래서 본 연구에서도 NO 생산에 직접적으로 영향을 미치는 iNOS의 발현과 염증반응 매개물질로 알려진 COX-2의 발현을 immunoblot 방법으로 조사하였다. 그 결과 당귀 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 iNOS와 COX-2의 발현이 현저하

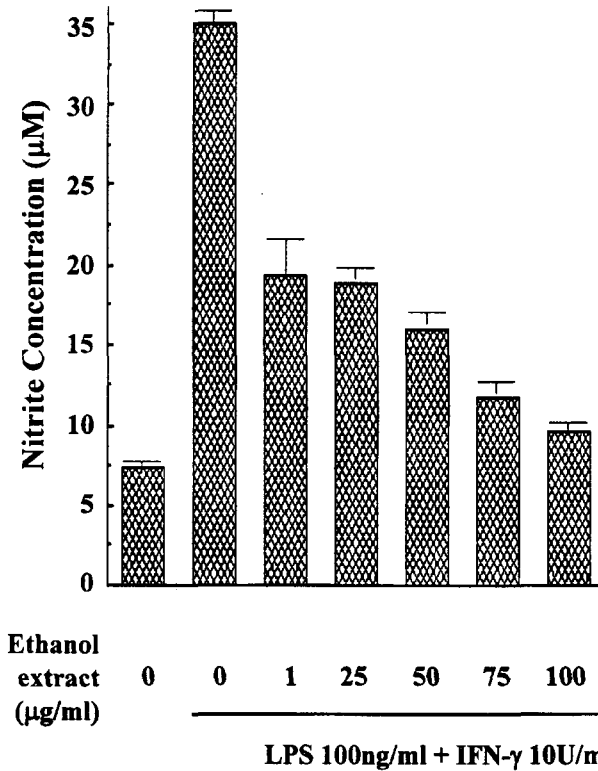


Fig. 2. Inhibitory effects of ethanol extract of *Angelica uchiyamana* on NO production by IFN- γ plus LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells (1×10^6 /ml) were incubated with or without IFN- γ plus LPS for 24 h in the presence or absence of ethanol extract of *Angelica uchiyamana* at indicated doses. NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are means \pm SD of three independent experiments.

게 감소됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

한편 당귀 에탄올 추출물이 pro-inflammatory cytokine의 대표적인 TNF- α 의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해서 설치류 RAW 264.7 대식세포를 대상으로 여러 가지 다른 농도로 당귀 에탄올 추출물을 2시간 전 처리한 후 LPS로 6시간 자극하여 배양액으로 방출된 TNF- α 의 농도를 ELISA법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 당귀 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 현저히 감소

되었음을 확인할 수 있었다.

최근 인체 질환 치료에 적용할 수 있는 새로운 대상의 의약품소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있는데, 특히 천연물을 대상으로 그 연구가 진행되고 있다. 즉, 천연물 유래 flavonoid계열 중 genistin, bacalin, wogonin 등은 pro-inflammatory cytokine, NO 및 COX-2와 같은 염증 매개물질을 억제시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 저자들은 이미 인진쑥으로부터 분리한 coumarin계열의 scopoletin

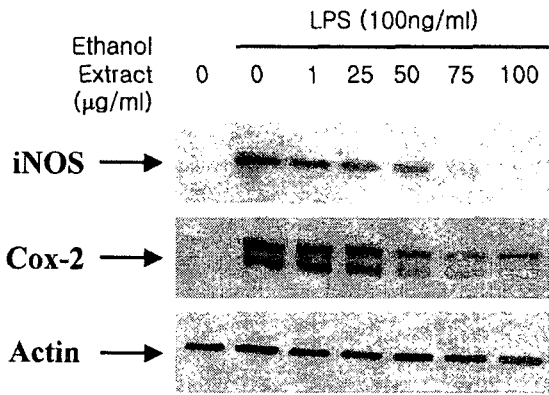


Fig. 3. Immunoblot analysis for iNOS and COX-2 expression in *Angelica uchiyamana* ethanol extract-treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 /ml) were preincubated with or without ethanol extract of *Angelica uchiyamana* for 2 h at indicated doses, and then were incubated with or without LPS for 6 h. iNOS and COX-2 were visualized by western blot analysis as described in materials and methods.

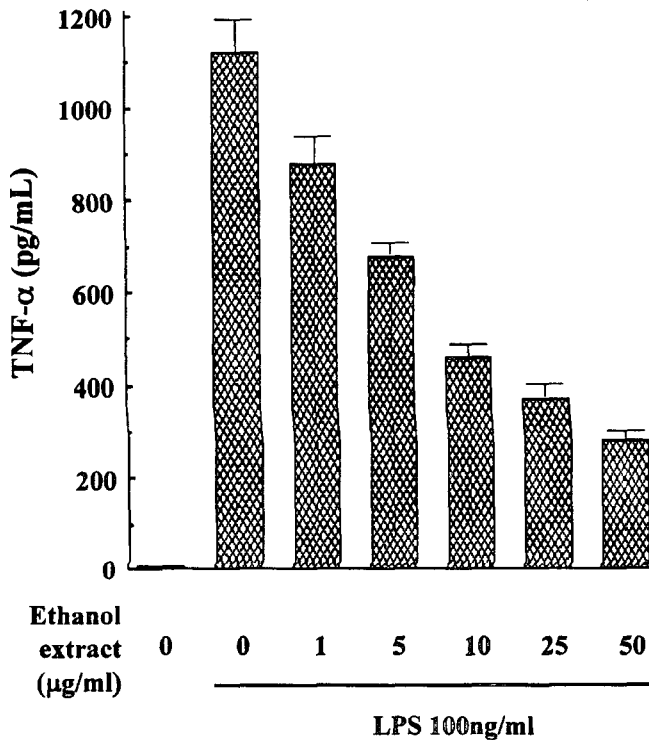


Fig. 4. Inhibitory effect on TNF- α release in *Angelica uchiyamana* ethanol extract-treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 /ml) were incubated with or without IFN- γ plus LPS for 6 h in the presence or absence of ethanol extract of *Angelica uchiyamana* at indicated doses. TNF- α was measured by ELISA assay as described in materials and methods. Data are means \pm SD of three independent experiments.

단일화합물이 염증 매개물질인 NO을 현저히 감소시킨다는 사실을 보고한 바 있다¹⁾. 본 연구에서도 당귀로부터 분리한 에탄올 추출물질이 염증반응에 매우 중요한 매개물질인 NO, COX-2 뿐만 아니라 TNF- α 등을 효과적으로 억제시키는 결과를 얻었다. 따라서 당귀 에탄올 추출물은 항염증 치료제로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

IV. 결 론

LPS 또는 IFN- γ +LPS로 자극된 설치류 RAW 264.7 대식세포를 대상으로 NO와 TNF- α 의 생산량과 iNOS 및 COX-2의 발현을 조사하였다. 그 결과 당귀 에탄올 추출물은 NO, TNF- α 의 생산과 iNOS 및 COX-2의 발현을 중요하게 억제시켰다. 이러한 결과는 당귀 에탄올 추출물이 항염증 효과를 포함한 지금까지 알려진 약리 효과가 있음을 설명해주고, 과량의 NO와 pro-inflammatory cytokine 생성과 관련된 면역질환의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

참 고 논 문

- Schinella G.R., Tournier H.A., Prieto J.M., Rijs J.L., Buschiazzo H., and Zaidenberg A.. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia*. 2002 ; 73: 569-575.
- Kang S.Y., Lee K.Y., Park M.J., Kim Y.C., Markelonis G.J., Oh T.H., and Kim Y.C.. Decursin from *Angelica gigas* mitigates amnesia induced by scopolamine in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2003; 79: 11-18.
- Jing-Ping O.Y., Baohua W., Yongming L., Lei W., and Jingwei Y.. Effect of angelica on the expressional changes of cytokines in endothelial cells induced by hyperlipidemic serum. *Biorheology*. 2003; 40: 395-399.
- Wilasrusmee C., Siddiqui J., Bruch D., Wilasrusmee S., Kittur S., and Kittur D.S.. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am Surg*. 2002; 68: 860-864.
- Miyasaka N., and Hirata Y.. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci*. 1997; 61: 2073-2081.
- Wang Y., Vodovotz Y., Kim P.K., Zamora R., and Billiar T.R.. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 962: 415-422.
- Chung H.T., Pae H.O., Choi B.M., Billiar T.R., and Kim Y.M.. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282: 1075-1079.
- Needleman P., and Isakson P.C.. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol*. 1997 ; 24 Suppl 49: 6-8.
- Brieva A., Guerrero A., Alonso-Lebrero J.L., and Pivel J.P..

- Immunoferon, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF-alpha production and inflammatory responses. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1: 1979-1987.
10. Luster M.I, Simeonova P.P., Gallucci R.M., Brucoleri A., Blazka M.E., and Yucesoy B.. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* 2001; 120: 317-321.
 11. Kang T.H., Pae H.O., Jeong S.J., Yoo J.C., Choi B.M., Jun C.D., Chung H.T., Miyamoto T., Higuchi R., and Kim Y.C.. Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*. *Planta Med.* 1999; 65: 400-403.
 12. Park B.K., Heo M.Y., Park H., Kim H.P.. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Eur J Pharmacol.* 2001; 425: 153-157.
 13. Nakagawa T., Yokozawa T.. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 1745-1750.
 14. Seo W.G, Pae H.O., Oh G.S., Chai K.Y., Kwon T.O., Yun Y.G., Kim N.Y., Chung H.T.. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76: 59-64.
 15. An S.J., Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Jeong S., Jang S.I., Oh H., Kwon T.O., Song C.E., and Chung H.T.. Inhibition of TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 productions and NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol.* 2002; 2: 1173-1181.