약학회지 제 47 권 제 5 호 311~318 (2003)
Yakhak Hoeji Vol. 47, No. 5

Murine Macrophage RAW 264.7 세포에서 우묵사스레피에 의한 염증성 사이토카인 억제효과

박수영 · 이혜자 · 현은아* · 문지영** · 양홍철** · 이남호** · 김세재* · 강희경 · 유은숙#
제주대학교 의과대학 약리학교실, *자연과학대학 생명과학과, **자연과학대학 화학과

(Received July 25, 2003; Revised September 15, 2003)

Inhibitory Effect of *Eurya emarginata* on the Production of Pro-inflammatory Cytokines in Murine Macrophage RAW264.7

Soo-Young Park, Hye-Ja Lee, Eun-A Hyun*, Ji-Young Moon**, Hong-Chul Yang**, Nam-Ho Lee**, Se-Jae Kim*, Hee-Kyoung Kang and Eun-Sook Yoo#
*Department of pharmacology, College of Medicine, *Department of Life Science, College of Natural Science, **Department of Chemistry, College of Natural Science, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea*

Abstract — *Eurya emarginata* (Thunb.) Makino (Theaceae) is distributed in coastal areas of island. The leaves of *Eurya* are used in the traditional medicine of the coastal areas of jeju island with the aim of diuresis or to treat ulcers. Nevertheless, there are few reports on the biological activity and constituents of *E. emarginata*. In this study, we investigated the pharmacological activity of the solvent extracts of *E. emarginata* on the several inflammatory markers (TNF-α, IL-1β, IL-6, NO, iNOS and COX-2). Also we examined the antioxidizing effect of the solvent extracts by determination of DPPH radical-scavenging activity. Among the solvent fractions, EtOAc and BuOH extracts showed potent radical scavenging activity (RC_{50}=10.9 and 12.7 respectively). The subfractions of EF 5-4-6-3-2 and BF 1 potentially inhibited the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 and TNF-α) at the concentration of 100 μg/ml. Also the fractions inhibited the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 and TNF-α) and protein expression of iNOS and COX-2 at the concentration of 100 μg/ml. And then, the inhibition of iNOS was correlated with the decrease of nitrite level. These results suggest that *E. emarginata* may have anti-inflammatory activity through the inhibition of pro-inflammatory cytokines, iNOS and COX-2.

Keywords □ RAW264.7, *Eurya emarginata*, interferon-γ (IFN-γ), Nitric Oxide (NO), Nitric Oxide Synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX-2), tumor necrosis factor-α, interleukin-6, interleukin-1β, inflammation

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며,[1,2] 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonine, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다.[3] 그러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다.

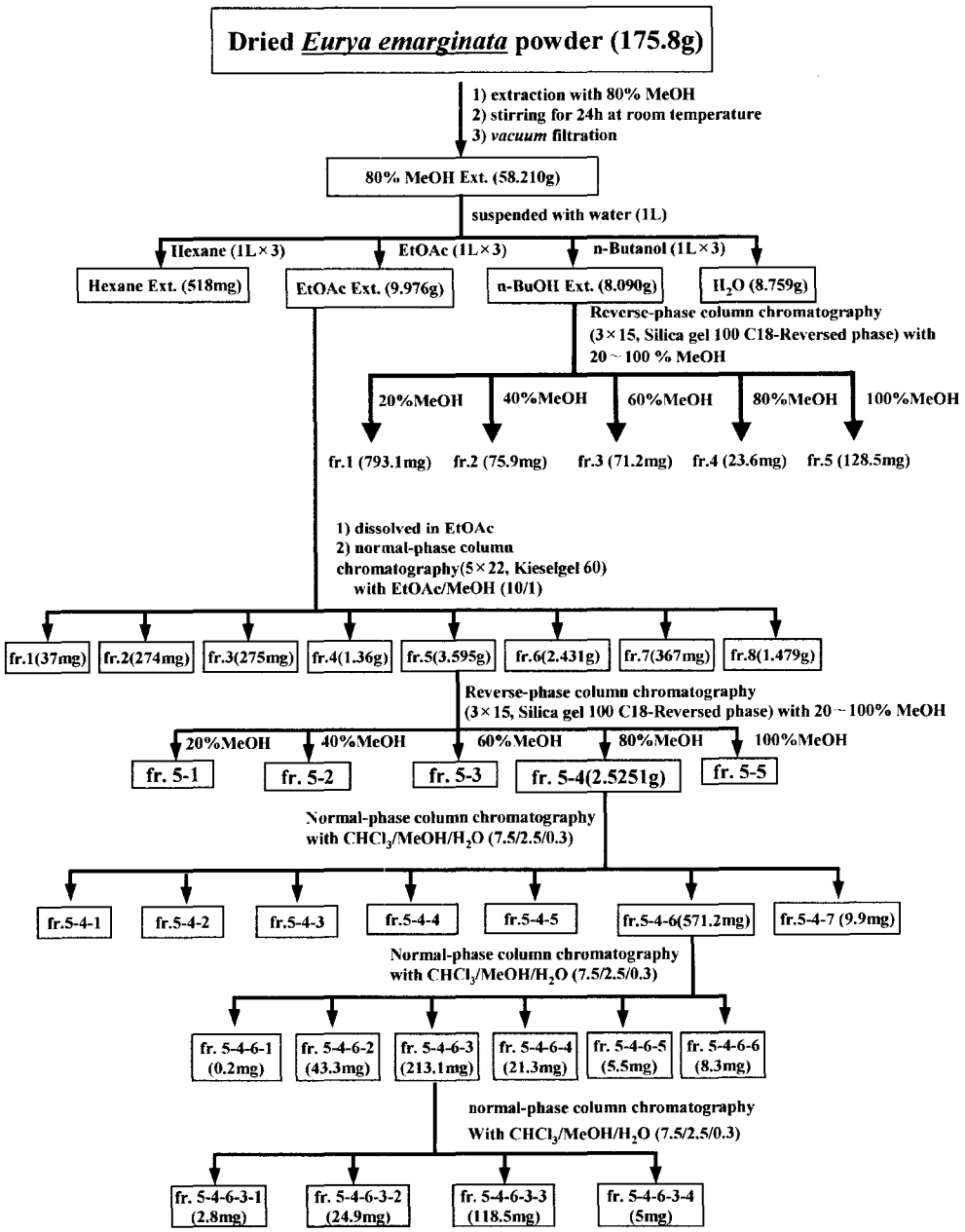
내독소로 잘 알려진 lipopolysaccaride(LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW264.7와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor - alpha, interleukin-6, interleukin-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[4-8] 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A_2의 활성으로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게된다.[9,10] 체내 염증과정에서는 과량의 nitric oxide(NO) 및 prostagladin E_2(PGE_2) 등의 염증인자가 nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다.[11,12] Tumor necrosis factor - alpha(TNF-α)와 같은 다 기능성 cytokine은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 특히, 암촉진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다. TNF-α가 인간의 염증성 피부질환과 관련이 있음은 이미 많이 보고되어 왔다.[13-15] TNF-

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 064-754-3847 (팩스) 064-702-2687
(E-mail) eunsyoo@cheju.ac.kr

α는 호중성 백혈구를 활성화 시켜 과산화수소 생성를 증가시킴으로 내인성 암촉진제로서의 기능도 하고 있다. 따라서, 발암촉진 단계와 밀접한 관계가 있는 염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 cytokine인 TNF-α의 발현을 저해시키거나 COX-2 활성저해에 기인하는 PGE_2의 생성 억제를 통해 proinflammatory molecule의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다.

우묵사스레피(*Eurya emarginata*)는 차나무과의 상록 관목수로 제주도 같은 따뜻한 도서지방의 바닷가 산지에서 주로 자생하며, 특히 건조, 해풍, 먼지, 대기오염 등 각종 공해에 강하다. 지역적으로 중국, 대만, 일본, 인도 등에 분포하며, 열매가 쥐똥 같고 해변에 자생한다하여 섬쥐똥나무라 불리워지기도 하며 사스레피나무와 생김새가 비슷하나 잎끝이 뒤로 말리어 우묵하게 들어가서 우묵사스레피라 한다.

민간에서는 잎을 이뇨와 담 제거 및 종기제거 등의 약재로 쓰이고 있다.[16] 그러나, 그 잎의 유효성분이나 생리활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 최근 이러한 민간에서 쓰이고 있는 천연물의 유효 활성 성분을 추출하여 분리된 물질들로 여러 염증인자들의 생성억제를 검색 및 기전 연구를 통해 새로운 항염제 개발이 많이 시도되고 있다. 이에 본 연구는 우묵사스레피(*Eurya*



Scheme 1 – Systematic purification using solvent partitioning and silica gel chromatography from *Eurya emarginata*.

emarginata)의 추출물 및 분획물로부터 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에서 NO의 생성억제 효과 및 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 iNOS, COX-2의 생성 및 활성저해 정도를 검색하였다.

실험방법

시료의 추출

제주도에 자생하고 있는 우묵사스레피의 잎을 채집하여 음건한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 미세말 시료(175.8 g)를 80% methanol(MeOH)로 3회 교반 추출 후 여과하여 감압농축하였다. 농축한 MeOH 추출물(58.21 g)을 물에 현탁시킨 후 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획(0.518 g), ethylacetate (EtOAc) 분획(9.976 g), butanol(n-BuOH) 분획(8.09 g), H_2O 분획(8.759 g)을 얻었다. 여기서 얻은 각각의 추출물 및 분획물을 항산화 작용 및 염증성 cytokine 억제효과 검색의 시료로 사용하였다(Scheme 1).

세포 및 시약

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포는 KCLB (Korean Cell Line Bank)로 부터 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* serotype 0111 : B4)는 Sigma로부터 구입하여 사용하였으며, Interferon-γ(mIFN-γ, recombinant *E. coli*)는 Roche로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

항산화활성은 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Aldrich)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법을 활용하였다.[17] DPPH 약 2 mg을 에탄올 15 ml에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 이 용액 12 ml에 DMSO 6.25 ml를 첨가한 후, 이때 517 nm의 파장에서 대조군의 UV-Vis. 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 에탄올로 희석하여 10초간 진탕시켰다. 그리고, 용매 1 ml에 분말로 추출된 시료 1 mg을 섞은 후 충분히 녹이고, 준비된 DPPH 450 μl에 시료용액 50 μl를 넣어 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 butylated hydroxy anisole(BHA), 비타민 C, 비타민 E, 소나무 추출물인 pycnogenol 등을 사용하였고, 항산화효과는 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 첨체의 농도(RC_{50})로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

*In vitro*에서 pro-inflammatory cytokine 생성 및 정량

Murine macrophage cell line 인 RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.0×10^6 cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO_2 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도(1 mg/ml)로 조제된 시험물질 50 μl와 450 μl의 LPS 최종농도 (1 μg/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 6시간 후 TNF-α와 IL-6는 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다. IL-1β의 정량은 TNF-α와 같은 방법으로 시험 약물을 처리하고 6시간 배양 후 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl (pH 7.6), 1.0 mM PMSF, 그리고 0.25% Nonidet P-40을 포함하는 1 ml의 lysis buffer를 이용하여 4°C에서 10 min 방치 후, 원심분리(12,000 rpm에서 2 min)하여 상층액을 얻었다. 모든 시료는 정량전까지 -20°C 이하에 보관하였다.

TNF-α 및 그 외의 cytokine 정량은 mouse ELISA kit를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

Nitric oxide(NO) assay

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시료 농도 100 μg/ml과 LPS 1 μg/ml를 동시에 처리하여 48시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μl와 Griess 시약 [1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 μl를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 540 nm는 ELISA reader를 이용하여 측정하였으며, sodium nitrite($NaNO_2$)를 standard로 비교하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절하여 접종 한 후, 18시간 전배양 하였다. 이 후 배지를 제거하고 시료 농도 100 μg/ml과 LPS 1 μg/ml를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 6시간 배양 후 세포를 수집하여 실험에 이용하였다. Total RNA 추출은 TRI-reagent(MRC)를 이용하였으며, RNase-free한 조건하에서 이루어졌다. 1 μg의 Total RNA를 oligo $(dT)_{18}$ primer, dNTP(0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase(2U)로 70°C 5 min, 37°C 5 min, 37°C 60 min, 그리고 70°C에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다.

Polymerase Chain Reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 TNF-α, IL-6, IL-1β, iNOS, COX-2, β-Actin를 증폭시키기 위하여 2 μl cDNA, 4 μM의 5'과 3' primer, 10×buffer(10 mM Tris-

Table I – Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene		Primer sequences	Fragment size (bp)
TNF-α	F	5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'	364
	R	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	
IL-1β	F	5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'	447
	R	5'-CTCTGCAGACTCAAACTCCAC-3'	
IL-6	F	5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	308
	R	5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
iNOS	F	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	496
	R	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	
COX-2	F	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'	696
	R	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'	
β-Actin	F	5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	603
	R	5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	

HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25 mM $MgCl_2$, 1 unit Taq polymerase(Promega, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μl로 맞춘 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94°C/45초, 55~60°C/45초, 72°C/60초, 35회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band을 확인하였다. 본 실험의 RT-PCR에 사용된 primer는 Table I에 제시하였다.

Western blot analysis

RAW264.7 세포(1.0×10^6 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 5% CO_2 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도(1 mg/ml)로 조제된 시험물질과 LPS(1 μg/ml)와 INF-γ(50 U/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 1 ml의 lysis buffer을 첨가, 30분~1시간 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(Bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 40 μg의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane(BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(TBS+0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS(1 : 1000)(Santa-Cruz)을 COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-rabbit COX-2(1 : 1000)(Santa-Cruz)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG(Amersham Co.)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Co.)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

실험결과

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

우묵사스레피의 80% MeOH 추출물과 각각의 용매분획물을 기존에 잘 알려져 있는 합성 항산화제인 BHA와 천연 항산화제인 비타민 C, E 및 소나무 추출물인 pycnogenol을 대조군으로 하여 DPPH radical 소거법에 의한 항산화활성 실험을 실시하였다. 실험결과 합성 항산화제인 BHA와 천연 황산화제인 비타민 C, 비타민 E, 소나무 추출물인 pycnogenol의 RC_{50}값과 비교해 보면 EtOAc 분획물, BuOH 분획물, EF 5-4-6, EF 5-4-7, BF 1에서는 각각 10.9 μg/ml, 12.7 μg/ml, 9.93 μg/ml, 10.09 μg/ml, 9.09 μg/ml 정도의 높은 항산화활성을 보였다(Table II).

Proinflammatory molecule 생성에 미치는 영향

내독소로 잘 알려진 LPS는 그람음성균의 세포외막에 존재하며, RAW264.7와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[4-8] 1 μg/ml의 LPS를 사용하여 RAW 264.7 세포로부터 이러한 cytokine의 발현 정도를 RT-PCR를 통해 알아보았다. 본 실험에 사용된 우묵사스레피 시료(100 μg/ml) 단독

Table II – Comparison DPPH radical-savenging activities of several extracts of *Eurya emarginata*

Sample	RC_{50} (μg/ml)
	DPPH radical scavenging effect
Vitamin C	3.0
Vitamin E	17.0
Pycnogenol	6.3
Butylated hydroxy anisole (BHA)	9.04
80% MeOH Ext.	32.3
Hexane fr.	89.0
EtOAc fr.	10.9
n-BuOH fr.	12.7
H_2O fr.	89.3
BuOH-20%MeOH fr.(BF1)	9.93
BuOH-40%MeOH fr.(BF2)	19.74
BuOH-60%MeOH fr.(BF3)	87.91
BuOH-80%MeOH fr.(BF4)	97.94
BuOH-100%MeOH fr.(BF5)	>100
EtOAc fr.5-4-1(EF 5-4-1)	>100
EtOAc fr.5-4-2(EF 5-4-2)	>100
EtOAc fr.5-4-3(EF 5-4-3)	>100
EtOAc fr.5-4-4(EF 5-4-4)	>100
EtOAc fr.5-4-5(EF 5-4-5)	78.9
EtOAc fr.5-4-6(EF 5-4-6)	10.09
EtOAc fr.5-4-7(EF 5-4-7)	9.09

처리시에는 cytokine이 발현되지 않았으며, 세포독성 시험 결과도 실험에 사용된 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다(data not shown). LPS 자극과 함께 처리하여 TNF-α, IL-6, IL-1β 생

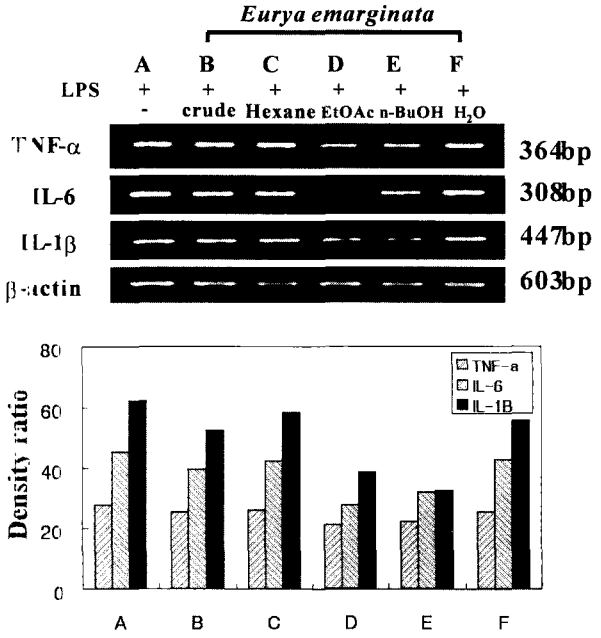


Fig 1 – Inhibition of the several extracts of *Eurya emarginata* on pro-inflammatory cytokine mRNA expression in activated macrophages. RAW 264.7 cells were pre-incubated for 18 h, and then pro-inflammatory cytokines mRNA expression was determined from the 6 h culture of stimulated by LPS (1 μg/ml) in the presence of testing sample (100 μg/ml). β-actin was performed on each sample. The product of PCR were electophoresed and stained with ethidium bromide. A: control (LPS+), B: 80% MeOH extract, C: Hexane fraction, D: EtOAc fraction, E: n-Butanol fraction, F: H_2O.

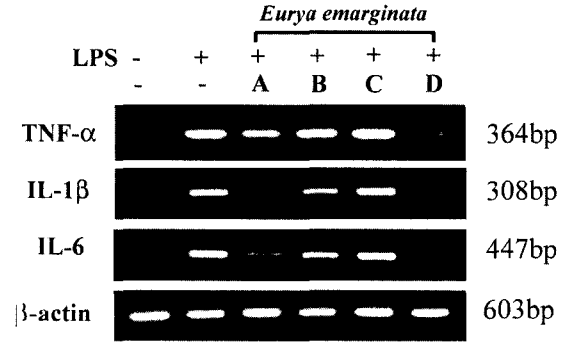


Fig 2 – Inhibition of the several subfraction of *Eurya emarginata* on pro-inflammatory cytokine mRNA expression in activated macrophages. RAW 264.7 cells. were pre-incubated for 18 h, and then pro-inflammatory cytokines mRNA expression was determined from the 6 h culture of stimulated by LPS (1 μg/ml) in the presence of testing sample (100 μg/ml). β-actin was performed on each sample. A: EF 5-4-6-3-2, B: EF 5-4-6-3-3, C: EF 5-4-7, D: BF 1.

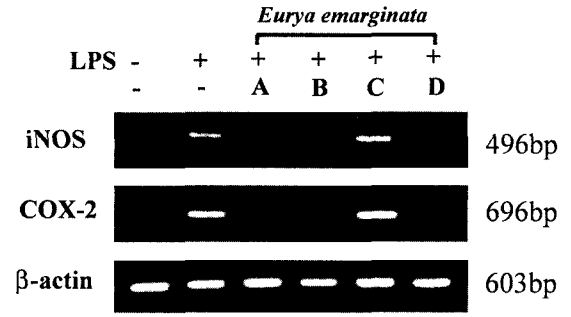


Fig. 3 – Inhibition of the several subfraction of Eurya emarginata on iNOS, COX-2 and β-actin mRNA expression in activated macrophages. RAW 264.7 cells were pre-incubated for 18 h, and then iNOS, COX-2 and β-actin mRNA expression was determined from the 6 h culture of stimulated by LPS (1 μg/ml) in the presence of testing sample (100 μg/ml). β-actin was performed on each sample. A: EF 5-4-6-3-2, B: EF 5-4-6-3-3, C: EF 5-4-7, D: BF 1.

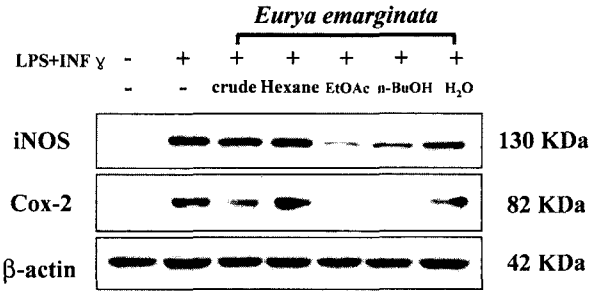


Fig. 4 – Inhibition of the several extracts of *Eurya emarginata* on iNOS, COX-2 and β-actin production protein expression in activated macrophages. RAW 264.7 cells were pre-incubated for 24 h, and then iNOS, COX-2 and β-actin production protein expression was determined from the 20 h culture of stimulated by LPS (1 μg/ml)+IFNγ (50 U/ml) in the presence of testing sample (100 μg/ml). β-actin was performed on each sample.

성 억제에 대한 우묵사스레피의 용매분획물을 100 μg/ml 농도로 처리하였을 때 TNF-α 생성 억제는 EtOAc 분획물에서 다소 억제 효과를 나타냈으며, IL-6 생성 억제는 EtOAc 분획물이, IL-1β 생성 억제는 n-BuOH 분획물에서 억제 효과를 보였다(Fig. 1). Subfraction에서는 EF 5-4-6-3-2과 BF 1에서 TNF-α 뿐만 아니라 IL-6, IL-1β에서도 아주 높은 억제 효과를 보였으며(Fig. 2), iNOS와 COX-2인 경우도 높은 억제 효과를 보였다(Fig. 3).

IFN-γ(50 U/ml) 및 LPS(1 μg/ml)를 사용하여 RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 생성을 유도한 후 우묵사스레피에 의한 저해 정도를 Western blot를 통해 알아 보았다. 그 결과 EtOAc 분획물과 n-BuOH 분획물에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 4), 또한 subfraction EF 5-4-6-3-2과 BF 1에서도 RT-PCR 결과와 마찬가지로 현저히 iNOS의 단백질 발현이 저해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

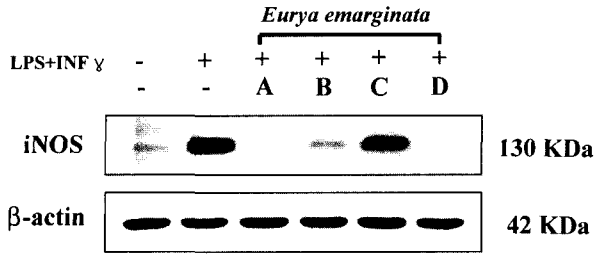


Fig. 5 – Inhibition of the several subfraction of *Eurya emarginata* on iNOS and β-actin production protein expression in activated macrophages. RAW264.7 cells were pre-incubated for 24 h, and then iNOS, COX-2 and β-actin production protein expression was determined from the 20 h culture of stimulated by LPS (1 μg/m*l*)+IFNγ (50 U/m*l*) in the presence of testing sample (100 μg/m*l*). β-actin was performed on each sample. A: EF 5-4-6-3-2, B: EF 5-4-6-3-3, C: EF 5-4-7, D: BF 1.

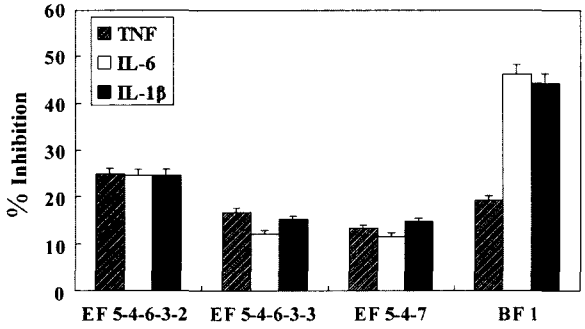


Fig. 6 – Inhibitory effect of solvent fractions on TNF-α, IL-6 and IL-1β production in RAW 264.7 cells. The productions of TNF-α, IL-6 and IL-1β were assayed from culture of RAW264.7 cells stimulated by LPS (1 μg/m*l*) in the presence of testing samples (100 μg/m*l*).

LPS에 의해 유도된 TNF-α, IL-6 와 IL-1β 생성 억제 활성 측정

Macrophage RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine 억제 효과를 mouse ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 그 결과 TNF-α 생성억제는 EF 5-4-6-3-2, EF 5-4-6-3-3, EF 5-4-7, BF 1에서 각각 24.84%, 16.77%, 13.39%, 19.35%의 억제 효과를 보였으며, IL-6 생성억제는 각각 24.67%, 12.1%, 11.71%, 46.14%를, IL-1β에서는 각각 24.65%, 15.21%, 14.82%, 44.32%의 생성억제효과를 나타내었다(Fig. 6).

NO 생성 억제효과

최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide(NO) 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포에 LPS와 우묵사스레피의 추출물 및 분획물을 동시 처리하여 그 생성억제 정도를 알아보았다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 실험결과 EtOAc 분획물, n-BuOH 분획물, EF 5-4-6-3-2, BF 1에서 대조군인 LPS 단독처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

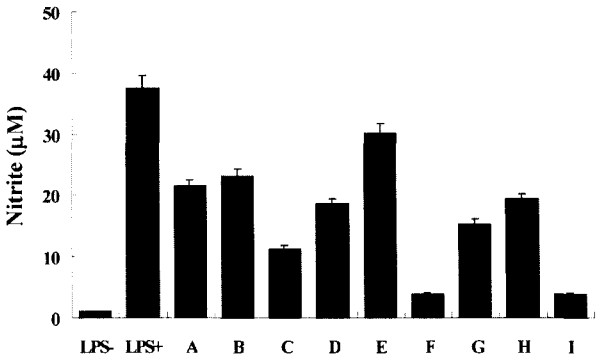


Fig. 7 – Effect of *Eurya emarginata* on nitrite accumulation in RAW264.7 Macrophages. Cells (1.5×10^5 cells/m*l*) were pre-incubated for 24 h, and then nitrite production was determined from the 48 h culture of stimulated by LPS (1 μg/m*l*) in the presence of testing sample (100 μg/m*l*). A: 80% MeOH extract, B: Hexane fraction, C: EtOAc fraction, D: n-Butanol fraction, E: H_2O, F: EF 5-4-6-3-2, G: EF 5-4-6-3-3, H: EF 5-4-7, I: BF 1.

고 찰

NSAIDs는 COX 저해제로서 PGs의 합성을 억제함으로써 염증반응을 차단한다. 최근 역학 조사에 의하면, NSAIDs를 복용했을 때 colon cancer로 사망한 경우가 40~50%로 감소된다는 사실을 새롭게 증명되고 있고,[18] 아스피린이나 다른 NSAIDs가 colon cancer를 억제한다는 주목할 만한 증거들이 보고되고 있어서[19,20] 암예방, 특히, colon cancer 억제효과를 갖는 것으로 알려져 있다. Cacinogenesis는 정상 점막조직이 양성의 polyphenol를 거쳐 암으로 진행되는데, 촉진 단계는 염증이나 산화적 손상에 의해 유도될 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 항산화 작용이나 항염증 작용을 갖는 물질의 경우 발암촉진의 억제제로 작용할 가능성이 높다. 최근 종양촉진제들의 피부 도포시 염증 발생이 밝혀지면서 항염증 물질의 암예방제로의 활용에 대한 기대가 점차 커지고 있다.

이에 본 실험에서는 항산화 작용 및 항염 작용이 prostaglangins 합성의 저해 및 TNF-α와 같은 cytokine의 억제와 관련이 있을 것으로 사료되어짐에 따라서, 우묵사스레피의 추출물이 염증반응의 주체가 되는 대식세포 모델계에서 LPS로 유도된 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine과 iNOS 및 COX-2의 발현 억제 효과를 알아 보았다.

산소는 식물을 포함하여 호기성 유기체의 대사과정을 위해서 필수적이나 생체조직내 과잉의 산소는 세포질 내에서 superoxide radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxy radical(OH ·)

등과 같은 반응성 높은 유해산소종(active oxygen sp ecies)을 생산하게 된다.[21] 활성 산소종은 강한 산화력이 있어 광합성 억제, 엽록체 파괴를 일으키며, 세포막 분해, 단백질 분해, 지질산화, DNA 손상, 돌연변이, 발암, 노화등의 심각한 생리장해를 유발하며,[22] 심장병, 파킨스씨병, Alzheimer's disease, 암등이 유발된다고 알려져 있다.[23] 생체는 이러한 활성 산소종의 독성으로부터 자기를 보호하기 위하여 superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT) 등의 항산화 효소와 ascorbic acid, α-tocopherol, glutathione 등의 항산화물질을 생산한다.[24,25] 우묵사스레피의 80% MeOH 추출물과 각각의 용매분획물 및 subfraction들을 기존에 잘 알려져 있는 합성 항산화제인 BHA와 천연 항산화제인 비타민 C, E 및 소나무 추출물인 pycnogenol을 대조군으로 하여 DPPH radical 소거법에 의한 항산화활성 실험을 실시하였다. 실험 결과 EtOAc 분획물, BuOH 분획물, EF 5-4-6, EF 5-4-7, BF 1에서 높은 항산화활성을 보였다. 여기서 얻은 결과를 통해 subfraction를 결정 하였다.

내독소로 잘 알려진 LPS는 그람음성균의 세포외막에 존재하며, RAW264.7와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[4-8] 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A_2의 활성으로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게된다.[9,10] 우묵사스레피의 잎 추출물이 murine macrophage cell line RAW264.7 으로부터의 LPS 자극에 의한 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine의 억제 효과 및 iNOS의 발현, COX-2의 생성 및 활성저해 정도를 알아본 결과, 우묵사스레피의 추출물 및 분획물들이 다소 차이는 있었지만 EtOAc 분획물에서 얻은 subfraction EF 5-4-6-3-2과 n-BuOH subfraction인 BF 1이 TNF-α, IL-6, IL-1β에서 높은 생성 억제 효과를 나타냈으며, iNOS의 발현 및 COX-2의 생성억제 효과도 나타냈다. 또한 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide(NO) 생성에 대한 효과를 측정하였는데, 그 결과 EtOAc 분획물(EF 5-4-6)에서 얻은 subfraction EF 5-4-6-3-2과 n-BuOH subfraction인 BF 1에서 높은 NO 생성억제 효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 항산화 효과를 갖는 분획물일수록 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine과 iNOS 및 COX-2의 발현 억제 효과에도 큰 영향을 미침을 보여 준다.

그리고 LPS에 의한 iNOS의 발현 및 NO 형성 또한 유사한 경향으로 나타남으로써 NO 억제는 iNOS의 발현 저해에 의한 것임을 알 수 있다. 또한, COX-2의 발현 억제도 두드러지게 나타난 것으로 보아 이에 따른 PGE_2의 형성도 감소될 것으로 사료되며 향후 염증억제의 *promoter*로 알려진 NF-κB같은 유전자 발현조절 등의 연구도 수반되어야 될 것으로 여겨진다.

본 실험 결과를 요약하면, 우묵사스레피의 EtOAc 분획물에서 얻은 subfraction EF 5-4-6-3-2과 n-BuOH subfraction인 BF 1에서 높은 항산화 효과, TNF-α, IL-6, IL-1β 형성억제 및 iNOS, COX-2의 발현억제를 나타냈으며, 이러한 결과는 우묵사스레피에서의 유효성분 추출을 통한 항염증 물질의 암예방제 연구 또는 예방하거나 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초(R05-2000-000-00146-0) 및 보건복지부 보건의료기술 진흥사업(01-PJ2-PG3-21605-0006)의 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Tizard, I. R. : Immunology: An introdution inflammation. 2nd ed., *Saunders college publishing, New York* 423 (1986).
2) Kim, C. J. : Pathophysiology. *Seoul Pub. Seoul.* **47** (1988).
3) Willoughby, D. A. : Human arthritis applied to animal models. T owards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **34**, 471 (1971).
4) Axtelle, T. and Pribble, J. : IC14, a CD14 specific monoclonal antibody is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J. Endotoxin Res.* **7**, 310 (2001).
5) Schutt, C. and Schumann, R. : The endotoxin recepter CD14. *Immun. Infekt.* **21**, 36 (1993).
6) Mukis, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S., Kuno, K., *et al.* : Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock; biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kapperB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin *in vivo. J. Leukoc. Biol.* **59**, 145 (1995).
7) Lazarov, S., Balutsov, M. and Ianev, E. : The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock. *Vutr. Boles.* **32**, 33 (2000).
8) Scott, M. G. and Hancock, R. E. : Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20**, 407 (2000).
9) Vane, J. A. : Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like durgs. *Nat. New. Biol.* **23**, 232 (1971).
10) Funk, C. D., Frunk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. : Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**, 2304 (1991).
11) Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. : Nitric oxide: physiology. pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109 (1991).
12) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian

cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
13) Groves, R. W., Allen, M. H., Ross, E. L. and Baker, J. N. W. N. : Tumour necrosis factor alphais pro-inflammatory in nomal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br. J. Dematol.* **32**, 345 (1994).
14) Wakefield, P. E., James, W. D., Samlaska, C. P. and Mettzes, M. S. : Tumour necrosis factor. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 675 (1991).
15) Piguet, P. F., Grau, G. E., Houser, C. and Vassalli, P. : Tumour necrosis factor is critical mediator s in hepten - induced irritant and contact hyper sensitivity reaction. *J. Exp. Med.* **173**, 673 (1991).
16) 김태정 : 한국의 자원식물(III). *서울대학교 출판부* 114 (1996).
17) Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1198 (1958).
18) Smally, W. and Dubois, R. N. : Colorectal cancer and non-steroidal anti- inflammatory drugs. *Adv. Phamacol.* B, 1 (1997).
19) Schiff, S. J. and Rigas, B. : Nonst eroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer : evaolving cancepts of the eir chemopreventive actions. *Gastroenterology* **113**, 1992 (1997).
20) Takayma, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato. J., Kogawa, K., Miyake, H. and Niilsu, Y. : Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adernoma and cancer. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1277 (1998).
21) Hewitt, N., Kok, G. and Fall, R. : Hydroperoxide in plants exposed to ozone mediates air pollution damage to alkene emitters, *Nature* **344**, 56 (1990).
22) Tottenpudi, K. P., Narc, D. A. and Cecil, R. S. : Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling acclimated maize seedlings, *Plants Physiol.* **108**, 1597 (1995).
23) Aruoma, O. I. : Free radicals oxidative stress and antioxdants in human health and disease, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **75**, 199 (1998).
24) Jeong, H. J. : The effect of cultivated environments in the antioxidant enzyme activities of codonpsis lanceolata, *Kor. J. Plant. Res.* **9**, 203 (1996).
25) Hahm, T. S., King, D. L. and Min, D. B. : Food antioxidants, *Food Sci. and Biotechnol.* **2**, 1 (1993).