

# RAW 264.7 면역세포에서 염증유발인자의 유전자 발현에 대한 軟玉水와 軟玉粉의 억제 효과

염미정 · 최보희<sup>2</sup> · 한동오 · 이혜정 · 심인섭 · 김성훈<sup>1</sup> · 함대현\*

경희대학교 동서의학대학원 침구경락학교실, 1: 종양학교실, 2: (주)보경연옥

## In Vitro Inhibition of Pro-inflammatory Mediator mRNA Expression by Nephrite in Lipopolysaccharide-induced Mouse Macrophage Cells

Mi-jung Yeom, Bo-Hee Choi<sup>2</sup>, Dong-Oh Han, Hye-Jung Lee, Insop Shim, Sung-Hoon Kim<sup>1</sup>, Dae-Hyun Hahm\*

Department of Acupuncture & Meridian, 1: Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, 2: Bokyung Nephrite Co., Kyungpook 755-881, Korea

Nephrite has been widely used as a medicinal mineral resource to treat a numerous chronic diseases and to replenish vital essence and blood in the Korean traditional medicine. However, as of yet, there is little understanding of the pharmacological and biochemical mechanisms of its therapeutic effects as regards anti-inflammation. We therefore examined whether nephrite represses the expression of major inflammation mediators, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2), in LPS-stimulated murine macrophage cell line, RAW264.7 by using RT-PCR. The powder suspension and water extracts of nephrite significantly inhibited the mRNA expression of the mediators, despite a little toxic effects on growth of RAW 264.7 cells within the concentration range tested. These experimental results suggested that the nephrite can be utilized as a functional mineral exerting the anti-inflammation medicinal effect.

Key words : nephrite(軟玉), inflammation, pain, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS

### 서 론

생체 조직의 손상에 대한 능동적인 생체 방어 과정으로 설명되는 염증반응은 생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 이에 대한 반응을 시작하여 손상을 극소화시키고, 손상된 부위를 복구시키려는 일련의 생체과정을 일으키게 된다.<sup>1)</sup> 염증 반응 시, 면역세포인 macrophage는 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )나 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 cytokine류 또는 nitric oxide (NO)나 prostaglandin (PG) 등의 다른 inflammatory mediator를 생산함으로써 반응 진행과정에서 중요한 역할을 수행한다. Macrophage에 의한 이런 매개체의 생산은 많은 염증성 조직에서 발견된다. 예를 들어 생체가 bacterial endotoxin인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 외부 면역 자극 물

질에 노출되면 생체신호전달 경로를 거쳐 면역세포들이 활성화되며 동시에 이들 세포에 의한 염증 유발 인자들의 발현양이 증가하게 되는데, 이 과정의 첫 단계로 해당 인자의 mRNA 발현이 증가하게 된다. 염증 매개 인자의 과생산은 류마티스성 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 만성 간염, 폐섬유화증 등과 같은 많은 염증성 질환에서 쉽게 발견되며 이들 질환의 병리현상에 대한 주요인이 된다.<sup>2-5)</sup>

따라서, 이러한 염증 유발 매개 인자에 대한 유전자 발현의 저해방법은 다양한 염증성 질환을 예방하거나 억제할 수 있는 치료원리 및 방법이 될 수 있다. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2 등과 같은 사이토카인이나 생체 효소들은 염증(inflammation), 통증조절 (pain control), 세포사멸(apoptosis), 종양생성(tumorigenesis), 자기면역반응(autoimmune response) 등의 약리학적 또는 생리학적 생체반응에서 중요한 역할을 수행 한다.<sup>6)</sup>

옥(jade)은 비취로 알려진 경옥(jadeite)과 푸른색이 감도는 각섬석 계열의 연옥(nephrite)으로 대별되는데, 경옥은 휘석족(輝

\* 교신저자 : 함대현, 용인시 기흥읍 서천리 1 경희대학교 동서의학대학원

· E-mail : dhhahm@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2176

· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

石族: pyroxene family)에 속하는 납 휘석 조(組)의 광물로서 규산, 산화 알루미늄, 소다(soda)로 된 단사정계(單絲晶系) 물질이고, 수정과 같은 수준의 경도를 가지면서 투명 혹은 반투명의 흑색, 청록, 녹색 등의 다양한 색채를 띠기 때문에 장신구 등의 소품 재료로 주로 이용된다. 연옥은 이노규산염(Inosilicates)의 단사정계 휘석석 광물체로서, 고도질 대리암 중의 연옥과 사문석화 초염기성 연옥(蛇紋石化超鹽基性軟玉)으로 다시 나뉘는데 이들의 품질은 미세한 구조 즉, 투각섬석-양기석정자가 속조(束組)와 섬유로 되는 조세(細細)한 정도로 결정되며 가늘수록 품질이 좋은 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup> 경옥 및 연옥과 관련하여 발표된 독일 의학계의 보고에 의하면 경옥과 연옥은 서로 다른 두 가지의 상이한 광석으로서 이들은 대부분의 보석처럼 실리콘과 산소를 함유하고 있으며, 경옥은 과립형 크리스탈로 형성되어 있는 데에 반해 연옥은 섬유질, 머리털과 비슷한 무수한 크리스탈 미립 집합체로 이루어져 있는 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 한편, 나트륨과 알루미늄 등의 주요 미네랄 성분을 갖는 경옥과는 달리, 연옥은 인체에 유익한 3가지 광물 즉, 칼슘, 철분, 마그네슘 등을 주성분으로 하고 있어 연옥 착용 시 고혈압, 당뇨병 순환기 장애, 심장병 및 신장장애로 인한 병고의 치유에 커다란 영향을 미친다고 한다.<sup>8)</sup>

동의보감에 따르면 약으로 쓰이는 광물소재의 구슬은 모두 4가지인데, 그 중 하나가 옥으로 되어있다. 약재용 연옥 가루인 옥설(玉屑)에 관하여 맛은 달고[甘] 성질은 평(平)하며 독이 없으며, 위(胃) 속의 열을 없애고 천식과 속이 답답하고 그득한 것을 낫게 하며 갈증을 멎게 한다고 알려져 있다.<sup>9)</sup> 신농본초(神農本草), 당본초(唐本草), 본초강목(本草綱目) 등에 의하면, 옥을 가루로 내어 깨알만 하게 하여 복용을 하면 오장육부를 윤택하게 하고 체내의 노폐물을 완전히 배출시켜 주는 효과가 있을 뿐 아니라, 위(胃)중의 열을 제거하여 소화계통에 효과가 있고, 기관지 천식과 신열이 나고 가슴이 답답한 빈열증에 좋고 갈증을 멎게 해주며, 깨알같이 부쉬 장복을 하면, 몸이 날아갈듯 가벼워지고 장수하게 되며, 폐장의 기능을 윤택하게 해주고 인후에 종아 성대의 발성을 도와주며, 모발에 영양을 주고 오장의 기능을 자양해주며 특히 스트레스성 신경질환을 가라앉히는 효과가 있고, 이외에, 근육이 긴장되고 쥐가 날 때 백옥을 가루로 내어 먹으면 좋고 얼굴, 몸에 상처 자국이 있을 때 연옥으로 상처부위를 수일간 문지르면 흉터가 없어지는 등, 연옥의 주된 성분들은 부작용이 없이 인체의 모든 부분에 탁월한 약리적 효능을 발휘하는 것으로 일찍부터 알려져 왔다.<sup>10)</sup>

그러나 연옥은 이상과 같이 고분현상에 탁월한 의학적 효능이 있는 것으로 알려져 있음에도 불구하고 과학적으로 충분히 입증되지 않았거나 그 희소성으로 인하여 보석, 장신구 등의 소재로 사용되거나 찜질방, 옥장관 등의 건강용품 소재 등으로만 유통되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 마우스 유래의 대식세포주인 RAW 264.7에서 LPS로 유도되는 대표적인 proinflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등의 유전자, 그리고 주요 염증 및 통증의 생리학적 매개체인 prostaglandin(PG)과 생체기능 조절물질의 하나인 nitric

oxide를 합성하는 효소인 COX-2 와 iNOS 유전자의 발현에 대한 연옥분 및 연옥수의 분자생물학적 영향을 조사함으로써, 연옥(nephrite)의 소염 및 통증 조절 효과를 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

Mouse macrophage cell line인 RAW264.7은 (사)한국세포주은행 으로부터 분양받았다. RAW264.7은 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS)과 penicillin 100U/ml와 streptomycin 100 $\mu$ g/ml의 항생제를 포함하는 DMEM 배지를 사용하여 실험실에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  공급조건을 갖춘 동물세포배양기에서 배양하였다.

### 2. 연옥수 및 연옥분의 준비

연옥분(nephrite powder, NP)은 연옥을 나노크기의 미세입자로 가공하여 준비하였다. 연옥수(nephrite water, NW)는 연옥분을 phosphate-buffered saline (PBS)에 100mg/ml 농도로 준비하여 pH를 7.2로 보정하고 하룻밤 방치한 후, 2,500rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액(supernatant)을 일컫는다. RAW 264.7에 연옥분 및 연옥수를 처리하기 위하여, FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지를 이용하여 연옥분은 0.1mg/ml, 1mg/ml, 5mg/ml로, 연옥수는 0.1%, 1%, 5% (v/v)으로 준비하였다.

### 3. 연옥분 및 연옥수의 처리

동일한 수의 RAW 264.7 세포를 준비하여 우선 FBS가 포함되지 않은 최소 배지에 3시간 동안 적응시키고 이후 각각의 농도로 준비된 연옥분 혹은 연옥수를 2시간 동안 전처리 하였다. 1 $\mu$ g/ml 농도로 LPS를 추가 첨가하여 6시간 또는 24시간 배양 후 실험하였다.

### 4. MTT Assay

RAW 264.7 세포에 대한 연옥분 및 연옥수의 독성 여부를 측정하기 위하여 세포 활성 측정법인 MTT assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포를 동물세포 배양용 96 well plate에 8.5 $\times$ 10 $^4$  cells의 농도로 준비하였다. 연옥분 및 연옥수 처리 전에 FBS가 포함되지 않은 배지에 3시간 동안 적응을 시켰다. 이후 각각의 농도로 준비된 연옥분 혹은 연옥수를 2시간 동안 전처리하였다. 1 $\mu$ g/ml 농도로 LPS를 추가 첨가하고 24시간 배양한 후 5mg/ml의 MTT를 각 well 당 10 $\mu$ l씩 첨가하였고, MTT가 환원되도록 1시간 더 배양하였다. 배양 종료 후, 상층액을 제거하고 배지와 동량의 acidified isopropanol을 첨가하여 10분간 방치하였다. 흡광도는 Emax<sup>TM</sup> ELISA reader (Molecular Devices Co., USA)로 570nm에서 측정하였다.

### 5. RT-PCR

well당 1.5 $\times$ 10 $^6$  농도로 준비된 RAW 264.7세포를 FBS가 포함되지 않은 배지에 3시간 동안 적응을 시켰다. 이후 각각의 농도로 준비된 연옥분 혹은 연옥수를 2시간 동안 전처리 하고 1 $\mu$

g/ml 농도로 LPS를 첨가하여 6시간 동안 추가 배양하였다. Total RNA는 TRIzol™(GIBCO BRL Co., MD, USA)을 사용하여 추출하였고, 분광분석기(Spectrophotometer)로 260nm에서 정량한 후 -80℃에서 보관하였다. 1µg의 total RNA를 65℃에서 15분 동안 denaturation시킨 후, 200U moloney murine leukemia virus(MuLV) reverse transcriptase (GIBCO BRL Co., MD, USA)을 이용하여 최종 부피가 20µl인 반응 혼합액에서 역전사 반응을 수행하여 cDNA mixture를 얻었다. cDNA는 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.4 mM의 각 primer와 0.5U Taq polymerase (TaKaRa Co., Shiga, Japan)을 포함한 20 µl의 반응 혼합액에서 PTC-100 Programmable Thermal Controller™ (MJ Research Co., Waltham, MA, USA)를 사용하여 증폭되었다. 각각의 primer는 Genbank에 기록된 염기 서열을 토대로 적당한 부위를 선택하여 제작하였으며 각각의 염기서열 및 증폭 조건은 table 1과 같다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. gel 상의 band intensity는 ImageMaster TotalLab™ (Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ)를 이용하여 분석하였고 내부 표준물질로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하여 유전자의 정량적 발현 수준을 보정하였다

6. 통계처리

통계처리는 Student's t-test에 준하였고, 실험치의 표현은 평균±표준오차로 하였으며, p-value가 최대치 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. RAW264.7 세포독성에 대한 연옥분 및 연옥수의 영향

연옥분 및 연옥수의 세포독성을 알아보기 위하여, 다양한 농도의 연옥분 및 연옥수를 24시간 동안 RAW 264.7에 처리한 후, 생존율을 관찰하였다. 생존율은 연옥분 혹은 연옥수를 처리하지 않은 경우를 100%로 하여, 상대적으로 나타내었다. 연옥분의 경우 0.1mg/ml, 1mg/ml, 5mg/ml의 농도에서 생존율이 각각 102.9%, 57.1%, 50.0%로 나타났다. 0.1mg/ml의 농도에서는 RAW 264.7 세포에 독성이 없음을 확인할 수 있었으나, 1mg/ml 이상의 농도에서는 세포독성이 확인되었다. 그러나 이는 현미경을 사용하

여 관찰한 결과 5mg/ml에서는 연옥분이 세포층을 뒤덮고 있어 세포를 관찰할 수 없었던데 반하여, 1mg/ml의 농도에서는 세포가 여전히 살아 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 미루어 볼 때, 1mg/ml 이상의 농도에서는 세포독성으로 세포의 사멸을 초래했다고 보다는 연옥분의 물리적인 작용으로 인하여 세포의 성장이 저해된 것이라 추측된다. 연옥수의 경우 0.1%, 1%, 5%의 농도로 처리하였는데, 생존율이 152.4%, 91.3%, 107.8%로 나타났다. 이러한 결과로 연옥수는 5%의 농도까지는 세포독성이 없는 것으로 보이고, 오히려 0.1%의 농도의 경우 세포증식을 촉진하는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

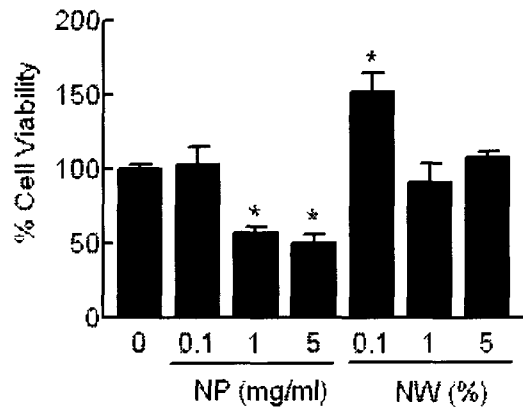


Fig. 1. The cytotoxic effect of nephrite powder (NP) or nephrite water (NW) on LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of NP or NW, and cytotoxicity was measured by using MTT assay. (\*p<0.05 as compared to LPS-treated control, lane 1)

2. IL-1β와 TNF-α 유전자 발현에 대한 연옥분 및 연옥수의 영향

연옥분 및 연옥수의 IL-1β와 TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RT-PCR을 시행하여 IL-1β와 TNF-α의 mRNA 발현에 대한 효과를 평가하였다 (Fig. 2). 각각의 PCR 산출물은 house-keeping gene인 GAPDH로 표준화하였다. RAW 264.7에 LPS를 처리하지 않았을 경우 IL-1β와 TNF-α mRNA가 전혀 발현하지 않았으나, 1µg/ml 농도의 LPS를 처리하였을 경우 각각 64.3%, 53.8%로 발현량이 급격히 증가하였다. IL-1β에 대한 연옥분 및 연옥수의 효과를 살펴보면, LPS와 함께 연옥분을 0.1mg/ml이나 1mg/ml로 처리한 경우 40.1%, 10.7%로 나타나 LPS 처리한 군에 비해서 통계적으로 유의한 감소를 나타내었

Table 1. Primers used in PCR reactions

Name	Primer sequence	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Cycle numbers
IL-1β	5'-tgcagagttccccaactggtacatc-3'	387	58	23
	5'-gtgctgcclaatgtccccttgaatc-3'			
TNF-α	5'-ccttagcaccacgtctagc-3'	374	58	23
	5'-ttgacctcagcgtgagttg-3'			
COX-2	5-ccccacagtcaaagacact-3	771	58	23
	5-ccccaaagatagcatctgga-3			
iNOS	5'-atgtccgaagcaaacatcac-3'	401	55	30
	5'-taatgtccaggaagttaggtg-3'			
GAPDH	5'-atcccatcaccatctccag-3'	579	58	30
	5'-cctgtctcaccacctcttg-3'			

다. 연옥수를 0.1%, 1%, 5%로 LPS와 함께 처리한 경우에는 43.3%, 28.3%, 15.2%로 나타났다. LPS 처리군과 비교할 때, 연옥수의 농도가 증가함에 따라 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현에 대한 연옥분 및 연옥수의 효과도 살펴보았다. 측정결과 LPS와 함께 0.1mg/ml 연옥분을 처리한 군에서는 48.3%로 약간 감소하는 경향을 보였으나, 1mg/ml 연옥분을 처리한 군의 경우 24.9%로 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다. 연옥수를 0.1%, 1%, 5%로 LPS와 함께 처리한 경우에는 40.1%, 46.6%, 38.8%로 약간 감소하는 경향을 보였으나, 유의성은 없었다. 5mg/ml 농도의 연옥분 처리군의 경우 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  유전자의 발현이 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 GAPDH의 발현 또한 관찰되지 않았으므로 5mg/ml 농도의 연옥분이 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제한다고 결론지을 수는 없었다.

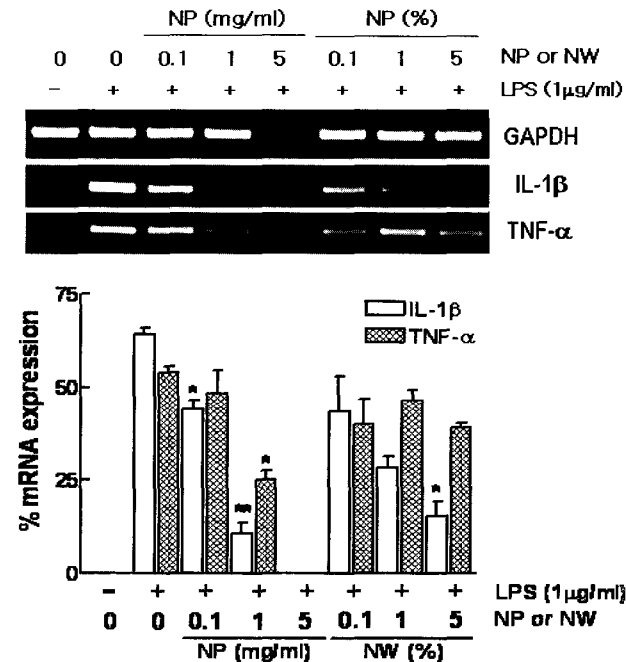


Fig. 2 Effect of nephrite powder (NP) or nephrite water (NW) on mRNA expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . RAW 264.7 cells were incubated in the presence of LPS with or without NP (or NW) for 6 hours. Each target PCR product was normalized to GAPDH, a housekeeping gene. (\*p<0.05, \*\*p<0.01 as compared to LPS-treated control)

3. COX-2 및 iNOS 유전자 발현에 대한 연옥분 및 연옥수의 영향  
연옥분 및 연옥수의 LPS로 유도된 COX-2 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RT-PCR을 시행하여 COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현에 대한 효과를 평가하였다 (Fig. 3). 각각의 PCR 산출물은 house-keeping gene인 GAPDH로 표준화하였다. RAW 264.7에 LPS를 처리하지 않았을 경우 COX-2와 iNOS mRNA가 전혀 발현하지 않았으나, 1 $\mu$ g/ml 농도의 LPS를 처리하였을 경우 각각 45.7%, 48.1%로 발현량이 급격히 증가하였다. COX-2에 대한 연옥분 및 연옥수의 효과를 살펴보면, LPS와 함께 연옥분을 0.1mg/ml이나 1mg/ml로 처리한 경우 32.1%, 4.2%로 나타나 LPS 처리한 군에 비해서 통계적으로 유의

한 감소를 나타내었으며, 특히 1mg/ml로 처리한 경우 현저한 감소를 보였다. 연옥수를 0.1%, 1%, 5%로 LPS와 함께 처리한 경우에는 COX-2 유전자의 발현량이 32.3%, 34.2%, 11.5%로 나타났다. LPS 처리군과 비교할 때, 0.1%와 1%의 연옥수의 농도에서 유사한 감소율을 나타내었고, 5% 연옥수에서 뚜렷한 감소를 나타내었다. 또한 iNOS의 mRNA 발현에 대한 연옥분 및 연옥수의 효과도 살펴보았다. 측정결과 LPS와 함께 0.1mg/ml 연옥분을 처리한 군에서는 28.0%, 1mg/ml 연옥분을 처리한 군의 경우 13.0%로 농도가 증가함에 따라 급격한 감소를 나타냈다. 연옥수를 0.1%, 1%, 5%로 LPS와 함께 처리한 경우에는 25.0%, 22.0%, 12.0%로 점차 감소하는 경향을 보였다. 5mg/ml 농도의 연옥분 처리군의 경우 COX-2 및 iNOS 유전자의 발현이 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 GAPDH의 발현 또한 관찰되지 않았으므로 5mg/ml 농도의 연옥분이 COX-2 및 iNOS의 발현을 억제한다고 결론지을 수는 없었다.

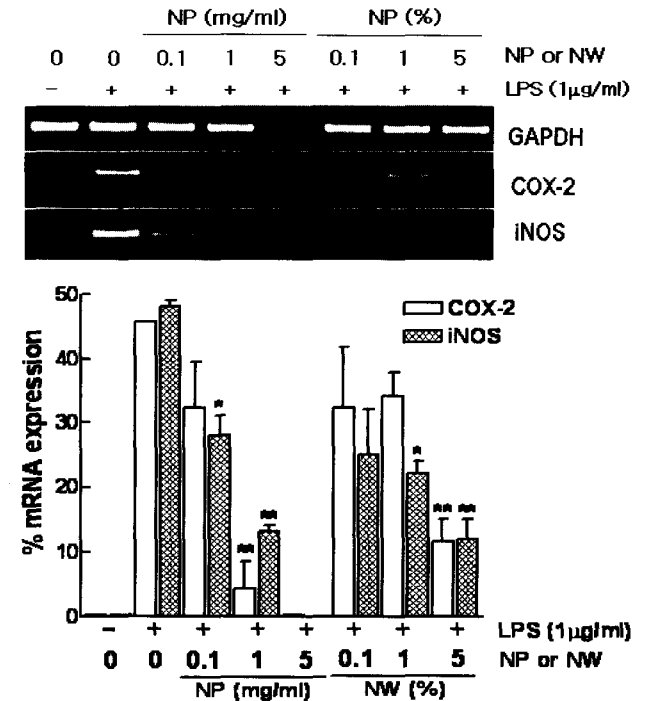


Fig. 3 Effect of nephrite powder (NP) or nephrite water (NW) on mRNA expression of COX-2 and iNOS. RAW 264.7 cells were incubated in the presence of LPS with or without NP (or NW) for 6 hours. Each PCR product was normalized to GAPDH, a housekeeping gene. (\* p<0.05, \*\* p<0.01 as compared to LPS-treated control)

### 고찰

염증성 질환은 감염, 외상, 면역학적 반응을 포함한 인체 내의 반응이다. 발열, 홍조, 부종, 통증 등의 급성 염증 증후가 있으며, 염증과정의 후반에는 염증부위로의 백혈구의 이주 및 cytokine, degradative enzyme, bioactive lipid intermediate, transient reactive oxygen species, sensitized lymphocyte의 생성 등 세포내의 변화가 일어난다. 만성적인 염증질환에서는 백혈구의 침윤에 의해 cell activation 및 세포사멸이 일어난다.<sup>11)</sup> 염증반

음의 화학매개물 중 prostaglandins (PG)과 nitric oxide (NO)는 발암 및 염증의 진행과정에 중요한 매개물질이다.<sup>12-13)</sup> 염증이거나 통증을 조절하는 약물 중 가장 흔히 사용되는 약물인 nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs)는 체내에 prostaglandin을 생성하는 COX를 저해함으로써 약리작용을 나타내는데<sup>14)</sup> cyclooxygenase는 COX-1과 COX-2의 두 가지 isoform으로 존재한다는 것이 밝혀졌다. 이 중 COX-1은 정상상태에서 위장관 점막과 혈소판, 신장에서 세포 보호 작용과 조절 작용에 관여하는 PG류 생성에 관여하는 효소인데 반해, COX-2는 정상세포에서는 그 농도가 매우 낮으나 염증관련세포에서 여러 자극(cytokine, endotoxin, mitogen)에 의해 유도 발현되어 통증이나 염증에 관여하는 PG류 생성에 관여한다.<sup>15)</sup> 또한 nitric oxide synthase (NOS)는 vascular tone, neurotransmission, 세균 및 암세포의 사멸과, homeostatic mechanism 조절에 관여한다.<sup>16)</sup> 또한 높은 농도의 NO는 circulatory shock<sup>17)</sup>, inflammation<sup>18)</sup>, carcinogenesis<sup>19)</sup> 등의 생리반응에서 나타난다. Neuronal NOS와 endothelial NOS는 정상적인 상태에서 존재하며, 반면 iNOS (NOS typeII)는 LPS, cytokine 등에 의해 유도 발현된다. 염증이거나 통증을 조절하는 약물 중 NSAIDs는 인체 내에서 염증 반응에 관여하는 PG류 이외에 위점막 보호, 혈소판기능과 관련된 PG의 생성도 억제하여, 위장관 장해나 출혈 등의 부작용도 함께 나타내게 된다.<sup>16)</sup> 따라서 inducible form의 enzyme만을 선택적으로 억제시킬 수 있는 치료제의 개발이 요구되었다.

광물인 연옥의 치료 효능은 많은 문헌에 기록되어 있다. 동의보감에 따르면 약으로 쓰이는 구슬은 모두 4가지인데, 그 중 하나가 옥이다. 옥설(玉屑)에 관하여 맛은 달고[甘] 성질은 평(平)하며 독이 없다. 위(胃) 속의 열을 없애고 천식과 속이 답답하고 그득한 것을 낮게 하며 갈증을 멎게 한다.<sup>9)</sup> 신농본초(神農本草), 당본초(唐本草), 본초강목(本草綱目)들에 의하면, 옥을 가루로 내어 깨알만 하게 하여 복용을 하면 오장육부를 윤택하게 하고 체내의 노폐물을 완전히 배출시켜 주는 효과가 있을 뿐 아니라, 위(胃)중의 열을 제거하여 소화계통에 효과가 있고, 기관지 천식과 신열이 나고 가슴이 답답한 빈열증에 좋고 갈증을 멎게 해 주며, 깨알같이 부숴 장복을 하면, 몸이 날아갈듯 가벼워지고 장수하게 되며, 폐장의 기능을 원활하게 해주고, 성대의 발성을 도와주고 인후에 좋으며, 모발에 영양을 주고 오장의 기능을 자양해주며 특히 스트레스증 신경성 질환을 같이 앓히는 효과가 있으며, 이외에도, 근육이 긴장되고 쥐가 날 때 백옥을 가루로 내어 먹으면 좋고 얼굴, 몸에 상처 자국이 있을 때 연옥으로 상처부위를 수일간 문지르면 흉터가 없어지는 등 연옥의 주된 성분은 부작용이 거의 없이 인체에 탁월한 효능을 발휘하는 것으로 일찍부터 알려져 왔다.<sup>10)</sup>

이에 본 연구진은 연옥이 독이 없고, 열을 없애고, 흉터가 없앤다는 연옥의 효능에 착안하여, 발열, 부종, 통증을 수반하는 염증의 치료에 효과가 있을 것이라 가정하였다. 아직까지 연옥의 소염 효과는 보고된 바가 없다. 연옥의 소염 효과를 평가하기 위하여, 연옥을 나노입자로 분쇄한 연옥분과 연옥분을 생리식염수에 포함시킨 후 얻은 상층액인 연옥수로 준비하였다. 준비된 연

옥분과 연옥수의 소염효과를 확인하기 위하여, 염증의 in vitro system인 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포주를 이용하였다. LPS는 동물에서 각종 실험적 자가면역질환을 유발하는 물질로<sup>20)</sup>, 대식세포를 자극하여 IL-1 $\beta$ 나 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증 반응 매개체의 분비를 유발시키며<sup>21-22)</sup>, PGE2의 생성도 증가시켜서<sup>23)</sup>, 일과성의 급성염증을 유발한다고 알려져 있다.

연옥분 및 연옥수의 세포 독성을 살펴보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 연옥분의 경우, 1mg/ml과 5mg/ml의 농도에서 MTT의 환원력이 떨어지는 것으로 관찰되었다. 그러나 현미경을 이용하여 관찰한 결과 연옥분이 바닥에 가라앉아 있는 것을 볼 수 있었는데, 이는 연옥분의 세포 독성으로 인한 것이라기보다는 가라앉은 연옥분으로 인한 물리적인 요인에 기인한 것이라 판단된다. 연옥수의 경우 세포 독성이 관찰되지 않았으며 오히려 1%의 농도에서는 세포증식을 촉진하는 것으로 나타났다.

연옥분과 연옥수의 소염효과를 알아보기 위한 지표로 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS를 선택하였다. LPS로 유도된 IL-1 $\beta$  mRNA 발현에 대한 연옥분의 억제 효과는 농도가 증가하면서 통계적으로 유의성이 있게 뚜렷이 증가하였다. 연옥수의 경우 또한 0.1%에서 5%로 농도가 증가함에 따라 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$  mRNA 발현이 크게 감소함을 확인할 수 있었다. 그러나 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$  mRNA 발현과 관련해서는 연옥분과 연옥수 모두 근소하게 억제하는 경향은 보였으나 그 정도가 미미하였다. 단 연옥분의 0.1mg/ml의 농도에서는 뚜렷한 억제 효과를 볼 수 있었다. 이는 연옥분나 연옥수가 TNF- $\alpha$ 보다는 IL-1 $\beta$ 의 발현 저해에 더 효과적임을 시사한다.

또 다른 주요 염증 및 통증의 지표인 COX-2와 iNOS에 대해서도 실험해 보았다. LPS에 의해 유도된 COX-2 및 iNOS 유전자 발현은 연옥분과 연옥수에 의해 억제 되었다. 특히 iNOS의 경우 연옥수의 농도가 증가함에 따라 LPS에 의해 유도되는 유전자의 발현이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었다. LPS에 의한 COX-2의 발현도 연옥분과 연옥수 모두에 의해 저해됨을 관찰할 수 있었으나, iNOS의 발현을 더욱 뚜렷이 억제함을 확인할 수 있었다. 특이한 사항은 1mg/ml 연옥분의 경우 LPS에 의해 유도되는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS 유전자 발현을 모두 현저히 억제한다는 것이다. 이는 1mg/ml에서 나타난 세포독성으로 인하여 문제가 제기될 수 있으나, 이는 house-keeping gene인 GAPDH의 발현에는 아무런 문제가 없었으므로 그 억제 효과에 가치를 둘 수 있다 생각된다. 또한 이는 가라앉은 연옥분의 물리적인 문제에 대한 in vitro 실험의 한계로 앞으로 진행될 in vivo 실험에서 적용 가능성은 충분할 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과는 연옥분 및 연옥수가 LPS로 유도된 in vitro 염증 세포 모델에 있어서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS와 관련하여 소염 효과가 있다는 것을 보여 준다. 이는 각종 염증성 질환의 예방과 치료에 연옥분 및 연옥수를 의학적 기능소재로 이용할 수 있다는 사실을 시사하는 것으로서 앞으로도 다양한 in vivo 염증 동물 모델 혹은 임상 실험을 통해 연옥의 소염, 진통 효능을 재검증하고 의학적 기능의 기능성소재로서 개발하기 위한 다각적인 추가 연구가 지속되어야 할 것으로 판단된다.

## 결 론

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 염증 반응에서 연옥분 및 연옥수의 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS 유전자 발현에 대해 어떠한 영향을 미치는지 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 연옥분은 대체로 LPS에 의해 유도된 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS의 유전자 발현을 저해하였다. 특히 IL-1 $\beta$ 와 iNOS의 저해 효과가 뚜렷하였으며, 1mg/ml의 농도에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS 모두 확실한 저해 효과를 나타내었다. 연옥수 또한 LPS에 의해 유도된 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS의 유전자 발현의 저해 효과를 보였으며, TNF- $\alpha$ 를 제외하고는 농도에 비례하여 그 효과가 커졌다. 연옥수 또한 특히 IL-1 $\beta$ 와 iNOS의 저해 효과가 분명하였다.

이상의 실험결과로부터 LPS로 유도된 면역세포의 *in vitro* 염증 모델에 있어서, 연옥분 및 연옥수가 대표적 염증유발 생체인자들인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2와 iNOS의 유전자 발현을 억제하는 약리효과를 확인할 수 있었으며, 향후 연옥이 효과적인 소염기능을 갖는 식품, 의약품, 생활용품 등의 기능성 소재로서 활용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

## 참고문헌

- 대한병리학회. 병리학. 고문사. 서울. 1995.
- Isomaki P, Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med.* 29(6):499-507, 1997.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 105(9):1135-43, 2002.
- Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology.* 103(1):264-74, 1992.
- Coker RK, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J.* 11(6):1218-21, 1998.
- Kim KM, Kwon YG, Chung HT, Yun YG, Pae HO, Han JA, Ha KS, Kim TW, Kim YM. Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits *in vitro* and *in vivo* inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 190(1):1-8, 2003.
- 광업진흥 1993년 신년호. 대한광업 진흥공사. 1993.
- Mauda Palmer Die Verborgene. KRAFT der KRISTALLE und der EDELSTEINE.
- 허준, 대역 동의보감 (對譯 東醫寶鑑), 법인문화사, 서울, 1999.
- 이시진, 국역 본초강목 (國譯 本草綱目), 일증사, 서울, 1992.
- Underwood JCE, General and Systemic Pathology. 119-127, 159-163, 222-244.
- Pettipher, E. R., Whittle Brendan, T. R., Prostaglandins. 1279-1282.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E. A., Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacological Review* 43(2):109-142.
- Barrios-Rodiles, M., Keller, K., Belley, A., and Chadee, K. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit cyclooxygenase-2 enzyme activity but not mRNA expression in human macrophages. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 225:896-900, 1996.
- Battistini, B., Botting, R. and Bakhle, Y. S. COX-1 and COX-2: Toward the development of more selective NSAIDs *DN&P* 7(8), 501-512, 1994.
- Snyder SH : Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science* 257:494-496, 1992.
- G.J. Dusting, Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J. Vasc. Res.* 32:143-161, 1995.
- Stefanovic-racic, M., Stadler, J. and Evans, C.H. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis and Rheumatism.* 36(8), 1993.
- Buzard, G.S., Kasprzak, K.S., Possible roles of nitric oxide and redox cell signaling in metal-induced toxicity and carcinogenesis; a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19(3):179-99, 2000.
- 오찬호 역. 신면역학입문. 서울 : 지구문화사. 118-23, 1995.
- Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T, Takagi K, Yoshinaga M. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 93(2) : 206-11, 1993.
- Bomalaskim JS, Ford T, Hudson AP, Clark MA. Phospholipase A2 -activating protein induces the synthesis of IL-1 and TNF in human monocyte. *J Immunol.* 154(8):4027-31, 1995.
- Noyori K, Okamoto R, Takagi T, Hyodo A, Suzuki K, Koshino T. Experimental induction of arthritis in rats immunized with *Escherichia coli* 0:14 lipopolysaccharide. *J Rheumatol.* 21(3):484-8, 1994.