

# 防己 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 Nitric Oxide production에 미치는 영향

김대희 · 이종록 · 변성희 · 신상우 · 권영규 · 김상찬\*

대구한의대학교 한의과대학

## Inhibitory Effect of Stephannieae Tetrandrae Radix Extract on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide - Activated RAW 264.7 Cells

Dae Hee Kim, Jong Rok Lee, Sung Hui Byun, Sang Woo Shin, Young Kyu Kwon, Sang Chan Kim\*

College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Tetrandra is the root of *Stephania tetrandra* S. Moore (family Menispermaceae), or of *Aristolochia frangchi* Wu (family Aristolochiaceae). It is a bitter-flavored and cold-property herb acting on the urinary bladder, kidney and spleen meridiands. Known biological effects of this herb are expelling wind to relieve pain and inducing diuresis to alleviate edema. This herb also has anti-inflammatory and anti-hypersensitivity actions. Recent studies have shown that *Stephannieae Tetrandrae Radix* has antimicrobial effects, namely, a protective effect on acute renal failure induce by gentamicin sulfate and a suppressive effect against clostridium perfringes. However, there is a lack of studies concerning the immunological activities of this herb. The present study was conducted to evaluate the immunological activities of *Stephannieae Tetrandrae Radix* on the regulatory mechanisms of cytokines and nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells. Cell viability was measured by MTT assay after the treatment of *Stephannieae Tetrandrae Radix* extract (STRE) and NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. COX-2 and iNOS were determined by immunoblot analysis, and levels of cytokine were analyzed by sandwich immunoassays. Results provided evidences that STRE inhibited the production of nitrite and nitrate (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) in Raw 264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS). These findings showed that STRE could produce some anti-inflammatory effects which might play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

Key words : Tetrandra Root, Lipopolysaccharide, iNOS, Cytokine

### 서 론

大食細胞는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응 시에는 reactive oxygen species (ROS) 와 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-6와 같은 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 대식세

포가 탐식된 異物質을 분해시킬 때 생성되는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 nitric oxide (NO)는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>1-6)</sup>. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 *Melia azedarach*<sup>7)</sup>, 香附子<sup>8,9)</sup>, *Cudrania tricuspidat*<sup>10)</sup>, 當歸<sup>11)</sup> 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

防己는 방기과 (Menispermaceae)에 속한 여러해살이 덩굴성 식물인 粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore의 뿌리를 건조한 것으로, 가을에 채취하여 코르크층을 제거하고 햇볕에 말린다. 우

\* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247

· 접수 : 2006/06/01 · 수정 : 2006/07/01 · 채택 : 2006/07/26

리나라에서는 덩탕이덩굴 (*Cocculus trilobus* DC.)을 木防己로 사용하고 있다.<sup>12)</sup> 防己는 맛이 쓰고 매우며, 약성이 차다. 쓴맛으로 下降시키는 효력이 크고 利水除濕시키는 효능이 있으며, 특히 下行하여 下半身의 水濕停滯에 효과가 있고, 膀胱에 熱이 있어 나타나는 小便不利, 水腫을 치료한다. 또한 防己의 매운맛은 發散하여 風濕을 제거하여 止痛하므로 風濕熱邪가 經絡에 壅滯하여 關節이 紅腫熱痛한 증상의 치료에 자주 사용된다. 아울러 濕熱로 발생하는 癰腫, 濕疹을 치료한다.<sup>13)</sup> 防己의 성분으로는 phenanthrene alkaloid, aporphine alkaloid, berberine alkaloid 등이 있으며, 약리작용으로는, 消炎作用, 항알러지작용, 解熱鎮痛作用, 심혈관계에 대한 작용, 抗癆作用, 抗酸化作用등이 알려져 있다<sup>14)</sup>.

지금까지 防己에 대한 연구로는 정 등<sup>15)</sup>이 局所腦虛血損傷에 미치는 효과를 밝혔고, 김<sup>16)</sup>이 류마티스관절염에 관한 효과를 밝혔으며, 오 등<sup>17)</sup>은 사구체 여과기능의 저하에 대한 개선 작용이 있음을 밝힌 바 있으며, 신 등<sup>18-20)</sup>은 장내의 유해균에 대한 생육억제 효과를 밝혔다. 또한 防己의 독성관련연구로는 片 등<sup>21)</sup>이 木防己와 漢防己를 mouse에 30일간 투여한 결과 유의한 독성 변화가 없음을 보고하였다.

본 연구는 濕熱을 제거하는 防己가 消炎, 항알러지, 解熱, 鎮痛, 抗癆의 약리적 작용을 가지는 것에 근거하여, 防己의 추출물 (STRE; *Stephaniae Tetrandrae Radix Extract*)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell의 NO production, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등의 cytokine에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 추출물의 제조

防己 (Wolsung, Daegu, Korea) 300 g을 물 9 L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000 $\times$ g에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 0.2  $\mu$ m filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 freezer dryer (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20  $^{\circ}$ C에서 보관하였다. STRE의 수율은 10.5%였으며 실험에서 STRE는 배지에 녹여 사용하였다.

### 2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10 % fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80-90 %의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

### 3. 시약

LPS (lipopolysaccharide)와 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입

하였고, fetal bovine serum (FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (USA), Cayman (USA), Zymed (USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (USA)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 분주한 다음 STRE를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1 - 3.0 mg/ml의 농도로 STRE를 처리하고 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 50  $\mu$ l의 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100 $\times$ /(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

### 5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% *n*-naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

### 6. Immunoblot analysis

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10 % glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM *b*-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 $\times$ g로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2 protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

### 7. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells (1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml)을 분주하고 STRE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70  $^{\circ}$ C에서 보관하였

다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

### 8. 통계적 검증

실험 결과는 mean $\pm$ S.D로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

## 결 과

### 1. STRE가 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 STRE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 STRE를 0.1~3.0 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS의 농도 및 시간 의존적으로 증가하였으며, STRE를 0.1~0.3 mg/ml 처리한 실험군에서는 LPS로 유도된 NO의 분비증가를 억제하지 못하였으며, STRE 1.0과 3.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 18 h 및 24 h에서 유의한 NO생성억제를 나타내었다 (Fig. 1).

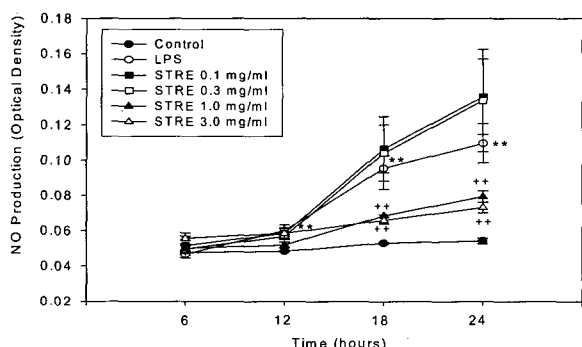


Fig. 1. Effects of STRE on the production of NO in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of STRE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the materials and methods. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with eight separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P<0.01, +: significant as compared to LPS alone, ++P<0.01).

### 2. STRE가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

STRE가 1.0 및 3.0 mg/ml (6 h, 12 h, 18 h, 24 h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 결과가, STRE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, STRE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 STRE의 1.0 및 3.0 mg/ml농도는 6-18시간 동안 LPS군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2). 이러한 결과는 STRE에 NO의 생성 억제효능이 있음을 시사하는 결과이다.

### 3. STRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS, COX-2 발현에 미치는 영향

NO 생성 억제기작에 관련된 iNOS단백질의 발현량을 관찰

하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 STRE 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었으며, STRE 3.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소하여, STRE는 농도 의존적으로 iNOS단백질의 양을 감소시킴을 관찰할 수 있었다. 또한, Prooxidant나 TPA, LPS, TNF- $\alpha$  등의 proinflammatory stimuli에 의해 MEKK-1, NF $\kappa$ B의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다<sup>22,23</sup>. 본 실험에서 LPS 처리시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 STRE 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양이 줄어들었으며, STRE 3.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양이 현저히 감소하여, STRE는 농도 의존적으로 COX-2 단백질의 양을 감소시킴을 관찰할 수 있었다.

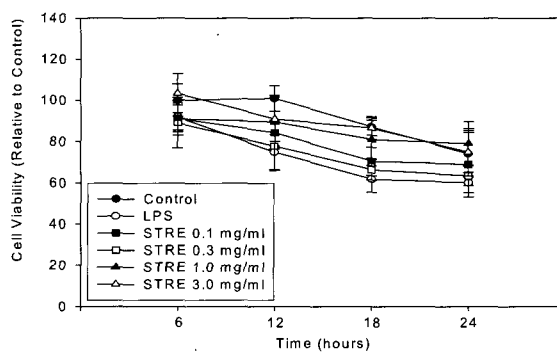


Fig. 2. Effects of STRE on the cell viability in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of STRE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/ml), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with eight separate experiments.

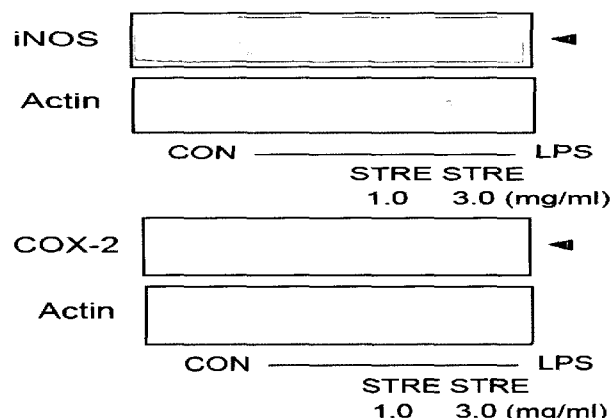
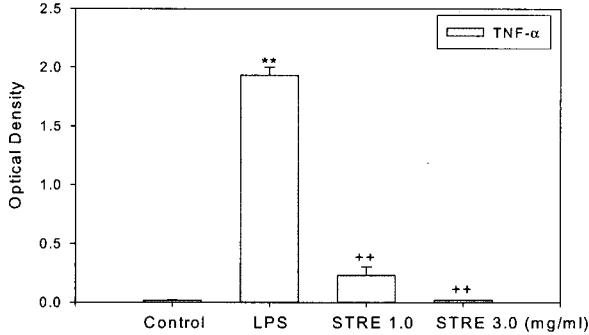


Fig. 3. Effect of STRE on the LPS-stimulated iNOS and COX-2 protein expression. The levels of proteins were monitored 18h after treatment of cells with LPS (1 $\mu$ g/ml) with or without STRE pretreatment (i.e. 1h before LPS). The amount of protein loaded in each lane was confirmed by actin protein expression.

### 4. STRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 TNF- $\alpha$ 에 미치는 영향

TNF- $\alpha$ 는 LPS반응의 주요 매개체로서 내재면역반응에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>24</sup>. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>25</sup>. 본 실험에서 LPS는 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰고, STRE 1.0 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된

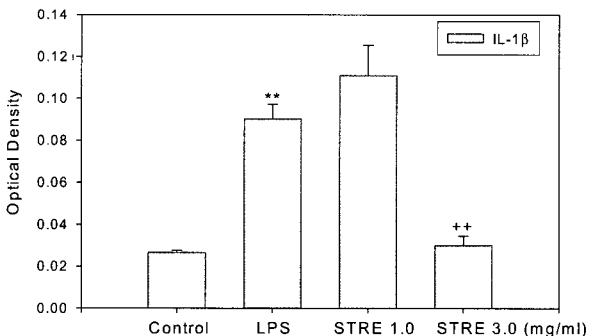
TNF- $\alpha$ 를 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰다. 특히 3.0 mg/ml의 STRE는 LPS에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ 의 분비를 완벽하게 억제하였다(Fig. 4).



**Fig. 4. The effect of STRE on LPS-stimulated TNF- $\alpha$  production.** Production of TNF- $\alpha$  was measured from the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of STRE for 6 h. The amount of TNF- $\alpha$  was measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, ++P < 0.01)

5. STRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1 $\beta$ 에 미치는 영향

IL-1 $\beta$ 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다<sup>25)</sup>. 또한 IL-6와 함께 macrophages의 포식작용을 화렷화시키고, microorganism을 살멸하며, T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>25,26)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, STRE 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$ 를 유의성있게 감소시켰다. 그러나 STRE 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$ 를 감소시키지 못하였다 (Fig. 5).

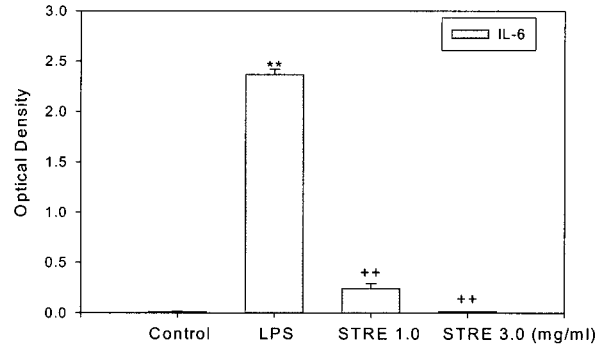


**Fig. 5. The effect of STRE on LPS-stimulated IL-1 $\beta$  production.** Production of IL-1 $\beta$  was measured from the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of STRE for 12 h. The amount of IL-1 $\beta$  was measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, ++P < 0.01)

6. STRE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-6에 미치는 영향

주로 Monocyte, macrophage에서 분비되는 IL-6는 B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진한다. IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, STRE 1.0 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6

를 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰으며, 특히 3.0 mg/ml의 STRE는 LPS에 의해 증가된 IL-6의 분비를 완벽하게 억제하였다(Fig. 6)



**Fig. 6. The effect of STRE on LPS-stimulated IL-6 production.** Production of IL-6 was measured from the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of STRE for 12 h. The amount of IL-6 was measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, ++P < 0.01)

고찰

防己는 방기과(Menispermaceae)에 속한 여러 해 살이 덩굴성 식물인 粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore.의 뿌리를 건조한 것으로, 防己에는 粉防己와 木防己 두 종류가 있는데 모두 利水祛風하는 효능이 있으나, 粉防己는 利水消腫清熱시키는 작용이 크고, 木防己는 去風止痛하는 작용이 크다<sup>12)</sup>.

防己는 맛이 쓰고 매우며, 약성이 차다. 쓴맛으로 下降시키는 효력이 크고 利水除濕시키는 효능이 있으며, 특히 하행하여 하반신의 水濕停滯에 효과가 있고, 방광에 熱이 있어 나타나는 小便不利, 水腫을 치료한다. 또한 본품의 매운맛은 發散하여 풍습(風濕)을 제거하여 지통하므로 風濕熱邪가 경락에 壅滯하여 관절이 紅腫熱痛한 증상에 자주 사용하여 치료한다. 아울러 濕熱로 발생하는 癰腫, 습진을 치료한다<sup>13)</sup>.

방기의 성분으로는 pheanthrene alkaloid로서 sinomenine, disinomenine, isosinomenine 등과 aporphine alkaloid로서 magnoflorine, tuduranine등과, berberine alkaloid로서 sinacutine 등이 있으며, 약리작용으로는, 소염작용, 항알러지작용, 해열진통작용, 심혈관계에 대한 작용(항부정맥, 혈압강하, 혈관확장, 항심근허혈, 혈소판응집억제), 항암작용, 항산화작용등이 알려져있다<sup>14)</sup>.

지금까지 防己에 대한 연구로는 정<sup>15)</sup> 등이 防己가 백서 중대 뇌동맥 폐쇄에 의한 局所腦虛血損傷에 미치는 효과를 밝혔고, 김<sup>16)</sup>이 防己의 류마티스양 관절염에 관한 효과를 밝혔으며, 신<sup>18)</sup>등은 防己가 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 및 19114에 대하여 증식저해 효과를 나타냄을 밝혔고, 신 등<sup>20)</sup>은 防己의 물추출물이 Clostridia 및 주요장내 세균의 생육억제 효과를 밝혔으며, 오 등<sup>17)</sup>은 防己煎湯液이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성사구체신염에서 발생하는 사구체 여과기능의 저하를 부분적으로 개선시키며, 또한 질소노폐물의 축적을 부분적으로 감소시키는 효능이 있음을 밝힌 바 있으며, 신<sup>19)</sup> 등은 防己가 장내의 대표적 유해균인 *Clostridium perfringens*, *Cl. paraputrificum*, *Cl.*

ramosum, *Cl. butyricum* 등의 *Clostridium*屬菌 및 *Bis. bifidum*, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium limosum*에 대하여 생육억제 효과가 있음을 밝혔다. 또한 일부보고<sup>27-29)</sup>에서는 방기가 포함된 한약이 간질성신염을 일으킨다는 연구결과가 보고되기도 하였으나, 片 등<sup>21)</sup>은 木防己와 漢防己를 mouse에 30일간 투여한 결과 일반 임상증상 및 혈청화학적 검사에서 유의한 독성 변화가 없음을 보고하기도 하였다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다<sup>30)</sup>. Inducible NOS (iNOS)는 염증시 대량으로 생성되고, constitutively expressed NOS (cNOS)는 저농도에서 생리적으로 작용한다<sup>31)</sup>. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>7,8,32,33)</sup>. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제제의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 STRE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 STRE를 0.1-3.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS농도 의존적으로 증가하였으며, STRE를 0.1~0.3 mg/ml 처리한 실험군에서는 실험시간내에 NO의 생성을 억제하지 못하였으나, STRE 1.0과 3.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 18 h 및 24 h에서 유의한 NO생성억제를 나타내었다. STRE가 1.0 및 3.0 mg/ml (18 h, 24 h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, STRE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, STRE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 STRE의 1.0 및 3.0 mg/ml농도는 6-24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 STRE이 어떠한 경로로든 NO의 생성 억제에 연루되어 있음을 시사하는 결과이다.

NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 STRE 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었으며, STRE 3.0 mg/ml을 처리

한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 STRE를 동시처리시 STRE 농도 의존적으로 iNOS단백질의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. STRE단독으로는 1.0 및 3.0 mg/ml에서 iNOS단백질의 양에는 변화를 일으키지 않았다.

COX-2는 prooxidant나 TPA, LPS, TNF $\alpha$ , ROI 등의 proinflammatory stimuli에 의해 MEKK-1, NF $\kappa$ B의 활성화를 경유하여 생성되고, prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다<sup>22-24)</sup>. 또 Monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다<sup>34)</sup>. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료의 target molecule이 되고 있다<sup>24)</sup>. 본 실험에서는 LPS 처리시에 COX-2 단백질이 강하게 유도되었고, LPS에 STRE 1.0 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 COX-2를 농도 의존적으로 감소시켰다.

TNF- $\alpha$ 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>24)</sup>. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>35)</sup>. 본 실험에서 LPS는 TNF- $\alpha$ 의 분비를 촉진시켰고, STRE 1.0 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ 를 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰다.

한편, IL-1 $\beta$ 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 $\beta$ 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>25)</sup>. 또한 IL-1은 septic shock<sup>36)</sup>, burn<sup>37)</sup>, 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury<sup>38)</sup>의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다<sup>39)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, STRE 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$ 를 유의성있게 감소시켰다. 그러나 IL-1 $\beta$ 의 감소가 STRE의 농도에 의존적이지는 않았다. Monocyte나 macrophage에서 분비되는 또 다른 cytokine인 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>25)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, STRE 1.0 및 3.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰다.

## 결론

방기 추출물 (STRE)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell의 NO 생성량, iNOS, COX-2발현 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 cytokine에 미치는 영향을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

STRE를 1.0과 3.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 18 h 및 24 h에서 유의한 NO 생성억제를 나타내었다. NO를 억제하는 농도인 STRE 1.0 및 3.0 mg/ml농도는 실험기간동안 LPS군에 비교하

여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. STRE는 1.0 및 3.0 mg/ml의 농도에서 LPS로 활성화되는 iNOS 및 COX-2 protein의 량을 농도의존적으로 감소시켰다. STRE는 1.0 및 3.0 mg/ml의 농도에서 LPS로 활성화되는 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 분비량을 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰다. IL-1 $\beta$ 에 있어서 STRE는 3.0 mg/ml의 농도에서만 유의한 억제 효과를 나타내었다. 특히 3.0 mg/ml의 STRE는 LPS로 유도된 이들 proinflammatory cytokine의 증가를 완벽하게 억제하였다.

이러한 결과들은 防己가 gram-negative bacterial infection에 의한 염증질환 또는, 과량의 NO 및 과량의 cytokine생성으로 유도된 면역질환의 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Lee, Y.S., Kim, H.S., Kim, S.K., Kim, S.D. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.* 10, 8-15, 2000.
2. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* 144, 1425-1431, 1990.
3. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 211, 24-32, 1996.
4. Corbett, J.A., Mac Daniel, M.L. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J Exp Med.* 181, 559-568, 1995.
5. Cetkovic-Cvrlje, M., Eizirik, D.L. TNF and IFN $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6, 399-406, 1994.
6. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. *대한화학회지* 39, 52-63, 1999.
7. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 406, 301-309, 2000.
8. 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 production by murine macrophage cell line, Raw 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 76, 59-64, 2001.
9. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 17(3):771-776, 2003.
10. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. 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-and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 5, 21-28, 2000.
11. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정헌택, 김윤철. 활성화된 설치류 Raw 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지* 10(2):189-197, 2002.
12. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. *중약대사전*. 서울, 도서출판 정담. pp 1983-1992, 1998.
13. *전국한의대 본초학교실. 본초학*. 서울, 영림사. pp 264-265, 1992.
14. 임종필. *본초생약학*. 서울, 신일상사. pp 159-161, 2003.
15. 정혁상, 이현삼, 원란, 강철훈, 손낙원. 방기(防己)가 백서 중 대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상에 미치는 보호효과. *대한한의학회지* 22(1):10-21, 2001.
16. 김영훈. 류마티스관절염에 응용되는 방기(防己)의 효능에 관한 실험적 연구. *동서의학* 12, 37-57, 1987.
17. 오상덕, 조동현, 두호경, 안세영. 목통 및 방기전탕액이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성신부전에 미치는 영향. *경희의학* 10(1):13-25, 1994.
18. 신동화, 한지숙, 김문숙. 방기 및 감초의 에탄올 추출물이 *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 영향. *Kor J Food Sci Technol.* 26(5):627-632, 1994.
19. 신옥호, 유시승, 이완규, 신현경. 방기 (*Sinomenium acutum*)의 물추출물이 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol.* 20(5):491-497, 1992.
20. 신현경, 신옥호, 유시승. 방기 (*Sinomenium acutum*)의 물추출물이 *Clostridia* 및 주요장내 세균의 생육에 미치는 영향. '92 한국영양학회 춘계심포지움 및 발표논문 초록집. pp 28-29, 1992.
21. 편세현, 박재현. 방기의 안전성에 관한 연구. *동서의학* 24(1): 1-13, 1999.
22. Surh, Y.J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* 40(8):1091-1097, 2002.
23. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* pp 480-481, 243-268, 2001.

24. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by sauchinone effects on I- $\kappa$ Ba phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Brit J Pharmacol.* 139:11-20, 2003.
25. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1- $\beta$ , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 37(6):355-361, 2003.
26. Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Yang, C.H., Jeon, T.W., Yoo, W.K., Kim, S.H., Kim, H.J. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted Astragali radix in Raw 264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol.* 100(3):289-294, 2005.
27. Vanherweghem, J.L., Abramowicz, D., Tielemans, C., Depierreux, M. Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis: a pilot study in Chinese herbs nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 27(2):209-215, 1996.
28. Vanherweghem, J.L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet.* 341(8842):387-391, 1993.
29. 신영태, 빈기태, 김성숙, 정민수, 이순구, 이강욱 등. 약물에 의한 급성 과민성 간질성신염의 증상. *대한신장학회지* 13, 91-99, 1994.
30. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666, 1988.
31. Kubes, P. Inducible nitric oxide synthase; a little bit of good in all of us. *Gut.* 47, 6-9, 2000.
32. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in Raw 264.7 macrophages. *Life Sci.* 69, 625-635, 2001.
33. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated Raw264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 28, 217-226, 2000.
34. Linton, M.F., Fazio, S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 4(2):116-123, 2004.
35. Chen, F., Castranova, V., Shi, X. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 159(2):387-397, 2001.
36. Casey, L.C., Balk, R.A., Bone, R.C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 119, 771-778, 1993.
37. Wogensen, L., Jensen, M., Svensson, P., Worsaae, H., Welinder, B., Nerup, J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1 $\beta$  in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest.* 23, 311-319, 1993.
38. Shito, M., Wakabayashi, G., Ueda, M., Shimazu, M., Shirasugi, N., Endo, M., Mukai, M., Kitajima, M. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation.* 63, 143-148, 1997.
39. Takabayashi, T., Shimizu, S., Clark, B.D., Beinborn, M., Burke, J.F., Gelfand, J.A. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery.* 135(5):544-554, 2004.