

토복령의 항염증 및 세포보호 효과에 미치는 영향

이선구*

상지대학교 한의과대학 병리학교실

Anti-Inflammatory Effects and Cytoprotective Effects of *Smilacis Chinae Radix*

Seongoo Lee*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Sangji University

Smilacis Chinae Radix has been used as an anti-inflammatory agent. This study was performed to anti-inflammatory and MAP kinase signaling pathway in vitro. Experimental studies were obtained by measuring the Cytotoxicity, production of NO, PGE2, TNF- α and protein level of catalase, SOD, MAP kinase. The results were summarized as follows: *Smilacis Chinae Radix* was not cytotoxic effects against Raw264.7 and HEK293 cells. Concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Smilacis Chinae Radix* inhibited the production of NO in the Raw264.7 cell stimulated with LPS. All concentrations of *Smilacis Chinae Radix* not significantly inhibited the production of PGE2 in the Raw264.7 cell stimulated with LPS. All concentrations of *Smilacis Chinae Radix* did not inhibit the production of TNF- α in the Raw264.7 cell stimulated with LPS. *Smilacis Chinae Radix* has not effect of blocking NF- κB into nucleus in LPS-induced macrophage Raw264.7 cell. *Smilacis Chinae Radix* has the effect of Cytoprotection through activation of ERK and inhibition of p38 and JNK. Accordingly the results show *Smilacis Chinae Radix* could induce anti-inflammation and Cytoprotection effects against *In vitro*, but it needs more research on the precise mechanism of such effects.

Key words : *Smilacis Chinae Radix*, NO, ERK, p38, JNK

서 론

토복령(*Smilacis Chinae Radix*)은 본초강목¹⁾에 수재되어 있으며, 해독약으로 만성피부질환, 임질, 이뇨, 매독성피부질환의 치료 약물로 사용되어 왔다^{2,3)}. 토복령의 성분으로는 spirostane 배당체와 furostane 배당체로서 6종의 steroid계 saponin이 보고되었다^{4,5)}. 염증은 생물학적, 물리적, 화학적, 면역학적 원인에 의하여 유발되는 손상을 국소화 시키고, 손상부위를 정상으로 되돌리는 생체의 반응이다⁶⁾. 산화적 스트레스는 이러한 손상을 일으키는 물질 중 하나이다. 천연물질을 이용한 항염증제나 세포보호물질의 개발연구는 전세계적인 추세이다. 본초서에 기재된 토복령의 효능은 독소를 제거함으로써 염증반응에 관여하고, 손상세포를 정상세포로 회복을 유도하는 것으로 사료된다. 이에 본 연구는 토복령의 항염증 효과와 세포보호효과를 알아보기 위하여 세

포독성, NO 생성 저해능, PGE2 생성 저해능, TNF- α 생성 저해능, 항산화효소 단백질의 발현, MAPK 단백질의 발현등을 시행하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 토복령은 국내에서 재배(전라북도 남원)한 것을 사용하였으며, 건조된 토복령 50 g을 3000 ml의 물과 함께 추출하여 동결건조시켜 14.59 g(수득률 29.18%)을 얻었다. 실험에 앞서 실험에 필요한 농도로 조정하여 사용하였다.

2) 세포주

본 실험에 사용한 세포주로는 Raw264.7 세포와 HEK293세포로서 한국 세포주은행과 한림대학교 TIC에서 분양받아 사용하였다. 분양 즉시, 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA), penicillin(100 units/mL)(Sigma, USA), streptomycin(100 μg

* 교신저자 : 이선구, 강원도 원주시 우산동 660 상지대학교 한의과대학

· E-mail : returnto@sangji.ac.kr, · Tel : 033-730-0664

· 접수 : 2009/01/13 · 수정 : 2009/01/20 · 채택 : 2009/02/05

/mL)(Sigma, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Hyclone, USA)배지로 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

3) 시약 및 재료

실험에 사용한 시약인 Bovine serum albumin(BSA), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), Griess-reagent(modified), NG-Methyl-L-arginine acetate salt(L-NMMA), Lipopolysaccharide(LPS), RIPA Buffer, Bicinchoninic acid(BCA)는 Sigma (USA) 에서 구입하였다. 또한 catalase, SOD, ERK1/2, p38, JNK는 Santa Cruz Biotechnology(CA, U.S.A.)에서 구입하였다. NF-κB/P65(Rel A)Ab-1는 Labvision에서 구입하였으며 2차 Antibody로 사용한 Cy3-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)은 Jackson Lab(USA)에서 구입하여 사용하였다. ELISA reader (PerkinElmer, USA)과 멀티포톤 공초점 레이저 주사 현미경 (Multiphoton Confocal Laser Scanning Microscope system, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)을 사용하여 실험하였다.

2. 항염증 실험

1) Raw264.7세포에 대한 세포독성 측정

지수증식기의 Raw264.7 세포를 5×10^5 cells/mL의 농도로 희석하여 100 μL씩 96well plate에 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 무혈청 배지 90 μL씩을 각 well에 넣고, 20, 50, 100 μg/mL 농도의 토복령 시료를 10 μL씩 각 well에 처리하여 주었다. 24시간 배양 후 PBS를 이용하여 5 mg/mL의 농도로 녹인 MTT를 20 μL씩 각 well에 넣고 4시간 배양하였다. 배양 후 MTT와 시료가 포함된 배지를 모두 제거하고 각 well에 acid isopropanol(0.04N HCl in iso-propanol) 100 μL를 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다⁷⁾.

2) NO 생성 저해능 측정

지수증식기의 Raw264.7 세포를 5×10^5 cells/mL의 농도로 희석하여 100 μL씩 96well plate에 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 무혈청 배지 90 μL씩을 각 well에 넣고, 20, 50, 100 μg/mL 농도의 토복령 시료를 10 μL씩 각 well에 처리한 후 염증 반응 유도인자인 LPS를 100 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후 배지를 이용하여 NO의 생성 정도를 측정하였다⁸⁾. 세포배양액 50 μL와 Griess시약 50 μL를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 NO 생성 억제제인 L-NMMA를 50 μM이 되도록 시료와 같은 방법으로 처리하여 NO 생성 저해 효능을 비교하였다. 표준검량선의 작성은 sodium nitrate를 표준품으로 사용하였다.

3) PGE2 생성 저해능 측정

PGE2의 생성 저해능은 Immunoassay kit(R&D system, KGE004, USA)를 사용하였으며, 제조사의 지침에 따라 아래와 같이 수행하였다. Raw264.7 세포를 1×10^6 cells/well의 농도로 조정하여 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지

를 이용하여 시료의 최종 농도가 20 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL 이 되도록 처리한 후 LPS를 100 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24 시간 후 배지를 회수하여 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 회수하여 -70°C에서 보관하였다. 상온에서 측정 배지를 녹인 후 Calibrator Diluent를 사용하여 5배 희석하였고, PGE2 standard를 2500, 1250, 625, 312.5, 156, 39의 농도가 되도록 Calibrator Diluent를 이용하여 희석하였다. 희석되어진 시료와 standard를 각 well에 100 μL씩 넣고, PGE2 conjugate와 PGE2 antibody 용액을 각각 50 μL씩 넣어준 후 shaker위에서 2 시간 반응시킨 후 PGE2는 washing buffer를 이용하여 4~5번 세척하였다. Substrate Solution을 각 well에 200 μL씩 넣어 준 후 빛이 들어오지 않는 곳에서 30분 동안 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위하여 2N HCl 용액을 각 well당 50 μL씩 넣어준 후 ELISA를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) TNF-α 생성 저해능 측정

TNF-α의 생성 저해능은 Immunoassay kit(eBioscience, 88-7324, USA)를 사용하였으며, 제조사의 지침에 따라 아래와 같이 수행하였다. Raw264.7 세포를 1×10^6 cells/well의 농도로 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지를 이용하여 시료의 최종 농도가 20 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL가 되도록 처리한 후 LPS를 100 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 배지를 회수하여 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 회수하여 -70°C에서 보관하였다. 상온에서 측정 배지를 녹인 후 1× assay diluent를 사용하여 50배 희석하였다. 새 plate에 antibody를 코팅해주고 1× coating buffer로 capture Ab를 1/250으로 희석한 후 100 μL/well 넣어 주고 4°C에서 보관하였다. washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. 1× assay diluent 용액을 200 μL/well 넣어주고 실온에서 1시간 반응시킨 후 washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후, 1~2분 정도 washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. TNF-α standard를 100 μg/mL 넣어주고, TNF-α를 측정할 세포 배양액을 1× assay diluent 용액으로 50배~100배 희석하여 100 μL/well 넣어주고 실온에서 2시간 반응시켰다. washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. Detection Ab를 1× assay diluent 용액으로 1/250으로 희석하여 100 μL/well 넣어주고 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. Avidin-HRP를 1× assay diluent 용액으로 1/250으로 희석하여 100 μL/well 넣어주고 실온에서 30분간 반응시켰다. washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. TMB solution을 100 μL/well 넣어주고 실온에서 15분간 반응시킨 후 stop solution을 50 μL/well 넣어주고 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) NF-κB 발현 측정

6 well plate에 coverglass를 넣고 coverglass위에 Raw264.7 세포를 1.5×10^5 cell/ μ l의 농도로 300 μ l 접종한 후 24시간 배양하였다. 시료를 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml씩 농도별로 처리하였다. LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였고 처리 1시간 후에 PBS를 이용하여 2~3번 세척한 후 100% MeOH을 이용하여 4°C에서 15분 동안 고정하였다. 0.1% Triton X-100(in PBS)를 이용하여 15분간 투과한 후 PBS를 이용하여 3번 세척하였다. 5% BSA(in PBS)로 45분 동안 고정 하였다. 1차 Antibody(NF-κB, RB-1638 -P1)를 1:100으로 1% BSA가 포함되어 있는 PBS에 희석한 후 2시간 동안 반응시킨 후 PBS를 이용하여 3번 세척한 후 2차 Antibody(Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti -Rabbit IgG (H+L), 111 -165-003)를 1:1000으로 1% BSA가 포함되어 있는 PBS에 희석한 후 1시간 동안 37°C, 어두운 곳에서 반응시켰다. PBS를 이용하여 3번 세척한 후 1분 동안 DAPI(10 μ g/ μ l in PBS)로 착색하였다. PBS를 이용하여 3번 세척한 후 coverglass에 Mounting medium을 떨어뜨리고 slideglass에 고정했다. 그 후 멀티포톤 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하였다.

6) 세포보호효과

(1) HEK293세포에 대한 세포독성 측정

토복령이 HEK293세포에 독성을 나타내는지 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 지수증식기의 HEK293세포를 5×10^5 cells/ml의 농도로 희석하여 100 μ l씩 96well plate에 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 무혈청 배지 90 μ l씩을 각 well에 넣고, 40, 100, 200 μ g/ml 농도의 토복령 시료를 10 μ l씩 각 well에 처리하여 주었다. 24시간 배양 후 PBS를 이용하여 5 mg/ml의 농도로 녹인 MTT를 20 μ l씩 각 well에 넣고 4시간 배양하였다. 배양 후 MTT와 시료가 포함된 배지를 모두 제거하고 각 well에 acid isopropanol(0.04N HCl in iso-propanol) 100 μ l를 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Raw264.7 세포에 대한 독성이 없으므로, HEK세포에서는 토복령의 농도를 조정하여 실험하였다.

(2) Catalase, SOD, ERK1/2, p38, JNK 단백질 발현

세포보호에 관여하는 단백질 발현 유무를 확인하기 위하여 HEK293세포에 농도별로 토복령을 처리하고 western-blot을 수행하였다. 단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10^7 의 세포당 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100 μ l로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다. 단백질 정량은 BCA용액을 이용하여 BSA를 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 μ g/ μ l)를 0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ μ l에 BCA 용액 100 μ l를 첨가하여 20분간 37°C에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μ l와 BCA 용액 100 μ l을 섞은 뒤 20분간 37°C에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다. 추출한 단백질 100 μ g를 15%

SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween 20 (0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 Catalase, SOD, ERK1/2, P38, JNK의 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하였다. membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween 20으로 4회 세척하고, chemiluminescence (DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Hyperfilm ECL(Amersham Bioscience, USA)으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

3. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS 12 (SPSS Inc, USA)를 이용하였고, 통계방법은 student's T-test와 one-way ANOVA로 하였으며 p-value가 0.05미만인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. Raw264.7 세포에 대한 세포독성

Raw264.7세포에 토복령 추출물을 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도별로 처리한 후, 농도 증가에 따른 세포독성에 미치는 효과를 측정된 결과, 각각 113.3±2.6%, 107.6±1.9%, 107±1.3%를 나타냈으며, 세포독성은 없었다(Fig. 1).

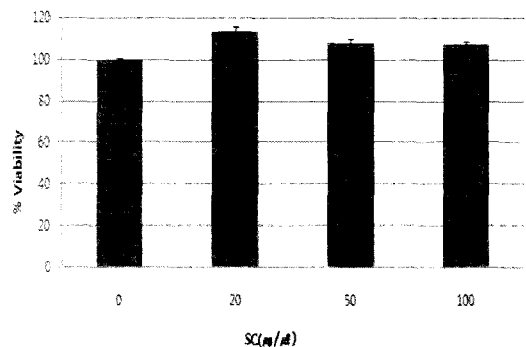


Fig. 1. Cell survivals ratio in Raw264.7 cells by *Smilacis Chinae Radix* treatment. SC : *Smilacis Chinae Radix*

2. NO 생성 저해능

LPS로 유도된 Raw264.7세포의 NO생성 억제를 살펴보기 위하여 NO생성을 억제하는 물질로 대표적으로 알려진 L-NMMA를 처리하여 대조군으로 사용하였다. 토복령 추출물의 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml농도별로 처리하여 NO 생성억제를 확인 한 결과, 각각 36.1±4.7%, 48.3±4.4%, 57.6±4.2%의 억제를 보였다 (Table 1).

3. PGE2 생성 저해능

LPS로 유도된 Raw264.7세포의 PGE2의 생성 억제력을 확인하기 위하여 토복령을 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 결과 값을 측정할 수 없었고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 각각 24.2 \pm 1.4%, 42.1 \pm 5.3%의 억제력을 보였으나, 양성대조군인 Indometacin 투여군에 비하여 좋은 결과는 없었다(Table 2).

Table 1. Inhibitory Effect of *Smilacis Chinae Radix* on NO Production in LPS-induced Raw264.7 cell

Group	Inhibition Rate (%) [#]
Normal	100
LPS (100 ng/ml)	0
LPS + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-NMMA	53.4 \pm 2.9 ^{ab}
LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SC	36.1 \pm 4.7 ^{ab}
LPS + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SC	48.3 \pm 4.4 ^{ab}
LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SC	57.6 \pm 4.2 ^{ab}

SC : *Smilacis Chinae Radix*, LPS : Lipopolysaccharide, L-NMMA : NG-methyl-L-arginine acetate salt, # : Mean \pm Standard Deviation, a) Statistical significant (versus Normal) (p<0.05), b) Statistical significant (versus LPS + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-NMMA) (p<0.05)

Table 2. Inhibitory Effect of *Smilacis Chinae Radix* on PGE2 Production in LPS-induced Raw264.7 cell

Group	Inhibition Rate (%) [#]
Normal	98.5 \pm 0.2
LPS (100 ng/ml)	0
LPS + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Indometacin	95.0 \pm 2.7
LPS + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Indometacin	94.0 \pm 2.2
LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Indometacin	94.4 \pm 1.5
LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SC	N.D
LPS + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SC	24.2 \pm 1.4 ^{ab}
LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SC	42.1 \pm 5.3 ^{ab}

SB : *Smilacis Chinae Radix*, LPS : Lipopolysaccharide, # : Mean \pm Standard Deviation, N.D : non detected, a) Statistical significant (versus Normal) (p<0.05), b) Statistical significant (versus LPS + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Indometacin) (p<0.05)

4. TNF- α 생성 저해능

LPS로 유도된 Raw264.7세포의 TNF- α 의 생성 억제력을 확인하기 위하여 토복령을 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 확인 한 결과, 각각 0.1 \pm 3.3%, 2.7 \pm 0.8, 0.4 \pm 1.1%의 억제력을 보였다(Table 3).

Table 3. Inhibitory Effect of *Smilacis Chinae Radix* on TNF- α Production in LPS-induced Raw264.7 cell

Group	Inhibition Rate (%) [#]
LPS (100ng/ml)	0
LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SB	0.1 \pm 3.3
LPS + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SB	2.7 \pm 0.8
LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SB	0.4 \pm 1.1

SC : *Smilacis Chinae Radix*, LPS : Lipopolysaccharide, # : Mean \pm Standard Deviation

5. NF- κ B 발현

LPS로 유도된 Raw264.7 세포에 염증유발 전사인자인 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것에 작용하는지 확인하기 위하여 토복령을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 실험한 결과 NF- κ B의 저해는 볼 수 없었다(Fig. 2).

6. HEK293 세포에 대한 세포독성

HEK293 신장세포에서의 세포보호효과를 알아보기 위하여 토복령 추출물을 각 농도별로 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로

처리한 결과 대조군과 비교하여 독성을 보이지 않았다(Fig. 3).

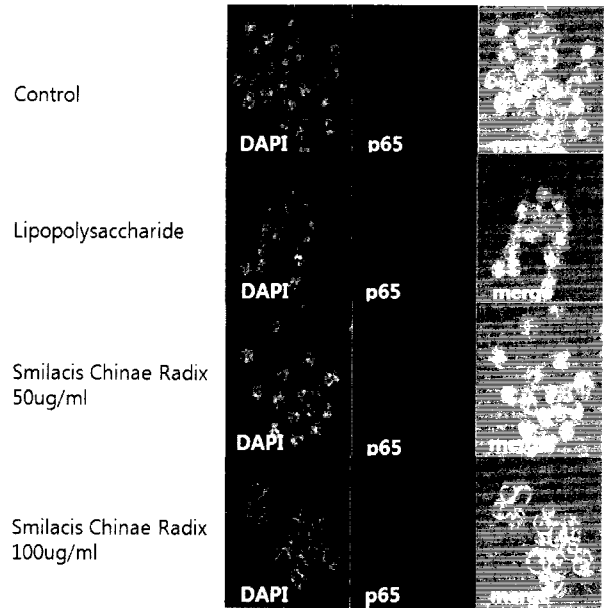


Fig. 2. The Effect of *Smilacis Chinae Radix* on Blocking NF- κ B into Nucleus in LPS-induced Raw264.7 cell.

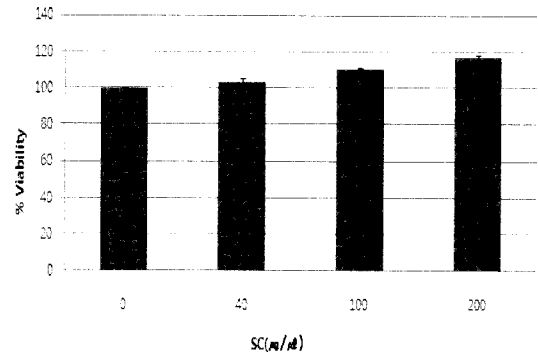


Fig. 3. Cell survival ratio in HEK293 cells by *Smilacis Chinae Radix* treatment. SC : *Smilacis Chinae Radix*

7. Catalase, SOD 발현

토복령을 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 항산화효소로 활성산소와 free radical을 제거하는 Catalase와 SOD 단백질의 발현 정도를 western-blot으로 측정하였다. 그 결과, Catalase 단백질의 경우 발현이 다소 증가함을 확인 할 수 있었고, SOD의 발현의 경우 농도가 증가할수록 대조군보다 비교군이 상대적으로 발현이 증가함을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

8. ERK1/2, p38, JNK 발현

MAPK의 단백질은 세포사멸, 세포생존에 여러 가지 신호전달 경로를 통하여 관여하고 있다. 활성산소에 의해 세포가 손상을 받으며, 여러 가지 단백질 발현에 영향을 미친다. 그 단백질 중에 ERK, p38, JNK의 발현정도를 살펴본 결과 ERK는 세포 생체반응에서 세포의 생존에 관여하는 단백질로서 토복령 추출물이 증가될 경우 약간 감소하는 경향을 보였다. p38, JNK는 세포

사멸에 관여하는 단백질이며, 토복령 100, 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도에서 발현이 점점 감소되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

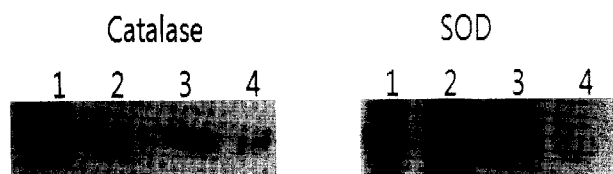


Fig. 4. Expression of Catalase, SOD protein. 1: control. 2: 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Smilacis Chinae Radix*. 3: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Smilacis Chinae Radix*. 4: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Smilacis Chinae Radix*

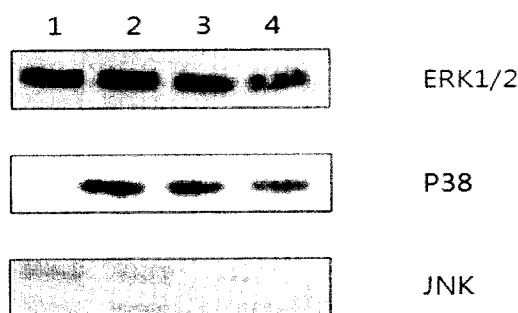


Fig. 5. Expression of ERK1/2, p38, JNK protein. 1: control. 2: 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Smilacis Chinae Radix*. 3: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Smilacis Chinae Radix*. 4: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Smilacis Chinae Radix*

고찰 및 결론

토복령은 肝과 胃經에 작용하며, 除濕, 解毒, 通利關節하여 濕熱淋濁, 帶下, 癰腫, 瘰癧, 梅毒 및 수은중독으로 인한 肢體拘攣, 關節疼痛에 사용한다⁹. 효능에 제시된 증상은 대부분 염증반응과 연관된 것으로 토복령이 염증에 사용할 수 있음을 암시하는 것이다.

토복령에 대한 연구는 차 등¹⁰의 항산화 연구, 손 등¹¹의 Didscin 함량연구, 박 등¹² 생약학적 연구와 정 등¹³의 HgCl_2 중독 흰쥐의 손상신에 미치는 영향, 오 등¹⁴의 Inflammatory Cytokines의 발현에 미치는 영향등이 있다.

염증은 외부자극에 대한 인체의 방어반응¹⁵으로 이해된다. 염증반응에서 활성화된 염증세포들은 NO, Prostaglandins 및 각종 사이토카인을 분비한다¹⁶. NO는 체내 방어, 신호전달, 혈관확장 등의 다양한 기능을 가지며¹⁷, 염증반응에 관여하는 사이토카인에 의해 과잉생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시킨다¹⁸. PGE2는 염증반응에서 백혈구의 염증부위로의 화학주성을 증가시키며¹⁹, TNF- α 의 경우 NO의 생성을 매개하는 물질로 알려져 있다²⁰. NF- κ B는 산화적 스트레스에 의하여 활성화²¹되며 종양, 염증, 면역계에 작용한다.

본 실험의 경우 Raw264.7세포에 대한 토복령의 직접적인 독성은 없었다. LPS로 유도된 Raw264.7세포에서의 NO생성은 농도 의존적인 억제 효과를 보였으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조약물인 L-NMMA에 비하여 높은 억제능을 보였다(Table 1). PGE2나 TNF- α 의 경

우 농도별로 의미있는 결과를 나타내지는 않았다(Table 2, 3). 토복령 추출물이 염증을 유발하는 전사인자인 NF- κ B의 핵내로 이동하는 것을 방어시켜주는 것인지는 확인하지 못했다.

Catalase와 SOD는 활성산소 소거물질인데, HEK293세포에 토복령 추출물을 처리 할 경우 신장세포의 대사과정에서 생성되는 프리라디칼을 약간 제거하는 것을 확인 할 수 있었다.

MAP(mitogen-activated protein) kinase family가 작용하는데 ERK(extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-JUN NH2-terminal protein kinase), p38 등이 포함²²되며, 세포사멸이 일어나면 JNK와 p38은 활성화되고 ERK는 억제된다²³. 본 연구의 경우 토복령 추출물의 농도가 증가되면서 p38과 JNK의 발현이 억제되는 경향을 보였다(Fig. 5).

이상의 결과를 보면 토복령 추출물은 세포에 독성이 미약하고, NO의 생성을 억제하며, 세포사멸 신호전달경로에 작용하는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 실험에 사용된 방법에 모두 효과적인 결과를 보여주는 것은 아니어서 추후 지속적인 연구가 필요하다고 생각한다.

감사의 글

본 논문은 삼지대학교 2006년 전반기 교내연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이시진. 분초강독 상책 1294. 인민위생출판사, 1959.
2. 난과항웅. 원색화한약도감 12, 보육사. 1980.
3. Son, K.H., Seo, J.H., Lee, J.M., Kwon, S.J., Chang, S.Y., Lee, K.S. Isolation and quantitative determination of dioscin from *Smilacis Chinae Radix*. *Kor J Pharmacogn* 32: 153-156, 2001.
4. Song, J.H., Kwon, H.D., Lee, W.K., Park, I.H. Antimicrobial activity of crude extracts from *Smilax China Root*. *Kor J Biotechnol Bioeng* 12: 560-564, 1997.
5. Kim, S.W., Chung, K.C., Son, K.H., Kang, S.S. Steroidal saponins from the Rhizomes of *Smilax china*. *Kor J Pharmacogn* 20: 76-82, 1989.
6. 대한병리학회. 병리학. 고문사, pp 71-73, 1994.
7. T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application of proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 65: 55, 1983.
8. S.M. Han, K.G. Lee, J.H. Yeao, H.Y. Kweon, K.K. Park. Anti-inflammatory effect of the venom from asian honeybees (*Apis cerana L.*) on inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in Raw 264.7 cell line. *Korean J Apiculture* 19: 89, 2004.
9. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 영림사, pp 211-212, 1991.
10. 차배천, 이은희, 노미애. 토복령의 항산화 활성. *생약학회지* 36(3):195-200, 2005.

11. 손건호, 서정화, 이주미, 권순진, 장승엽, 이경순. 토복령으로부터 Dioscin의 분리 및 함량분석. *생약학회지* 32(2):153-156, 2001.
12. 박종희, 김정묘, 도원입. 토복령의 생약학적 연구. *생약학회지* 33(3):169-172, 2002.
13. 정혜윤, 강성길, 김용철, 박영배, 고희균, 김창환. 토복령약침 자극이 HgCl₂중독 흰쥐의 손상신에 미치는 영향. *대한침구학회지* 15(2):331-348, 1998.
14. 오승규, 박종오, 남궁욱, 강탁립, 김동희. 토복령이 IL-1 β 와 TNF- α 로 유발된 Inflammatory Cytokines의 발현 및 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지* 18(1):49-64, 2003.
15. Zedler, S., Faist, E. The impact of endogenous trighers on trauma-associated inflammation. *Current Opinim in Critical Care* 12: 595-601, 2006.
16. Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J., Willoughby, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 2046-2050, 1994.
17. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
18. McCann, S.M., Mastronardi, C., Laurentiis, A. de, Rettori, V. The nitric oxide theory og aging revisited. *Annals of the New York Academy of Science* 1057: 64-84, 2005.
19. 대한병리학회. *간추린병리학*. 정문각, pp 63-79, 2002.
20. Murphy, S. Production of nitric oxide by glial cells : regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29: 1-13, 2000.
21. Li, N., Karin, M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?. *FASEB J* 13: 1137-1143, 1999.
22. Kyriakis, J.M., Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2):807-869, 2001.
23. Zhengui Xia, Martin Dickens, Joël raingeaud, Roger J. Davis, Michael E. Geenberg. Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science* 270(5240):1326-1331, 1995.