

## 薏苡仁의 염증성 사이토카인 발현 및 조절에 관한 연구

윤혜진 · 이유진 · 강미선 · 백정환

대구한의대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### Inhibitory Effect of Coicis Semen Extract(CSE) on Pro-inflammatory Mediator

Yun Hye Jin, Lee Yu Jin, Kang Mi Sun, Baek Jung Han

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

#### Objectives

This study was evaluated the effects of CSE the regulatory mechanism of NO and cytokines in the LPS-stimulated Raw 264.7 cells.

#### Methods

The Coicis Semen MeOH extract dissolved in EMEM for 1 hour prior to the addition of LPS(1 $\mu$ g/ml). The cell viability was measured by MTT assay, and Nitric Oxide production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. The levels of cytokine and PGE2 were analyzed by sandwich immunoassays.

#### Results

CSE inhibited the production of NO (0.03 and 0.1 mg/ml), TNF- $\alpha$  (0.03 and 0.1 mg/ml), IL-1 $\beta$  (0.03 and 0.1 mg/ml), IL-6 (0.03, 0.1 mg/ml) and PGE2(0.03 and 0.1 mg/ml) in Raw 264.7 cells activated with LPS(lipopolysaccharide).

#### Conclusion

According to the results above, Coicis Semen can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

**Key words** : Coicis Semen, LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2

■투 고 : 2009년 3월 27일, 수 정 : 2009년 4월 15일, 채 택 : 2009년 4월 20일  
■교신저자 : 백정환, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속 대구한방병원 소아과  
(Tel : 053-770-2128, E-mail : lee100@dhu.ac.kr)

## I. 緒 論

薏苡仁(Coicis Semen)은 벼과(Poaceae)에 속한 일년생 초본인 율무(Coix lachryma-jobi var. mayuen)의 성숙한 종인을 건조한 것으로 amino acid, coixol, coixenolid, triterpenoids 등을 함유한다. 薏苡仁은 性涼하며, 味甘淡하고, 入脾胃肺하며, 健脾滲濕 除痺止瀉 清熱排膿의 효능을 가지고 있으며, 水腫脚氣 小便不利, 濕痺拘攣, 脾虛泄瀉, 肺癰, 腸癰 등에 치료효과가 있다<sup>1)</sup>.

薏苡仁과 관련된 최근의 연구 경향으로 이 등<sup>2,3)</sup>의 고지혈증 흰쥐에 대한 薏苡仁의 효과, 윤 등<sup>4)</sup>의 高脂肪食餌로 誘發된 肥滿白鼠모델에서 薏苡仁 藥鍼 등이 血清脂質 및 肝機能에 미치는 影響, 홍 등<sup>5)</sup>의 薏苡仁이 생쥐의 기아 Stress에 미치는 影響, 김 등<sup>6)</sup>의 薏苡仁이 3T3-L1 Adipocytes에서 인슐린성 작용과 인슐린 민감성에 미치는 영향에 관한 실험적 연구들이 있었다.

대식세포는 염증 반응시에 IL(interleukin), TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )와 같은 cytokine을 생산하고, COX-2(Cyclooxygenase-2)를 활성화시켜 PG(Prostaglandin)를 생산하여 감염초기의 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있고<sup>7,8)</sup>, 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  및 NO(nitric oxide)는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>7-12)</sup>.

Gram-negative 박테리아의 세포벽 구성성분인 LPS(lipopolysaccharide)는 인지질, 다당류 및 소량의 단백질로 구성되며, 염증반응을 유발하는 유력한 인자로 대식세포의 TLR (Toll-Like Receptor)과 결합하여 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증반응 연구에서 빈용되는 실험모델이며<sup>13)</sup>, LPS는 septic shock을 유도하고, NO,

TNF- $\alpha$ , interleukin, prostanoid, leukotriene 등의 염증매개물질의 생산을 자극한다. 이러한 염증반응은 bacteria의 제거에 유리하게 작용하지만, 통제범위를 넘어선 과도한 염증반응은 TNF- $\alpha$ , IL-1(interleukin-1) 및 IL-6 (interleukin-6) 등의 염증매개 cytokine을 다량 생산하게 되고, 이러한 염증매개물질들은 조직손상이나, 장기의 부전을 유발한다<sup>14)</sup>.

NO 생성 저해제는 septic shock, 다발성 경화증, 류마티스 관절염과 같은 각종 염증성 질환의 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 최근에는 이러한 조절제를 찾기 위해 苦楝皮<sup>15)</sup>, 玄蔘<sup>16)</sup>, 龍膽草<sup>17)</sup> 등의 한약재와 鹿茸藥鍼<sup>18)</sup>, 紅花子藥鍼<sup>19)</sup>, 紫何車藥鍼<sup>20)</sup> 등의 약침 및 托裏消毒飲<sup>21)</sup>, 龍膽瀉肝湯<sup>22)</sup>, 加味清上防風湯<sup>23)</sup> 등의 처방에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

이에 본 연구는 薏苡仁의 메탄올 추출물(CSE)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 NO production 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 과 PGE<sub>2</sub>(Prostaglandin E<sub>2</sub>) 등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 추출물의 제조

薏苡仁 추출물(Coicis Semen Extracts, CSE)은 薏苡仁(Coicis Semen) 300 g을 MeOH 3 L에 넣고 4일간 추출한 다음 추출물을 거어지로 1차 여과하고 3000 $\times$ g에서 3분간 원심분리하고, 상층 액만을 취하여 0.2  $\mu$ m filter(Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator

(EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. CSE의 수율은 10.62%였으며 실험에서 CSE는 EMEM(Eagle's minimum essential medium)에 녹여 사용하였다.

## 2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 2647 cells은 한국세포주연구재단(서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10 % fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90 %의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

## 3. 시약

LPS(*Escherichia coli* O26B6 Dfco, Detroit, MI, USA)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 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 구입하였으며, PGE<sub>2</sub>의 ELISA Kit는 RnD Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

## 4. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu\text{l}$ 와 Griess시약(1 % sulfanilamide in 5 % phosphoric acid + 1 %  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu\text{l}$ 를 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><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

## 5. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 다음 CSE를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.01 - 0.1 mg/ml의 농도로 CSE를 처리하고  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ 에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 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) =  $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$ ].

## 6. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells( $1 \times 10^6/\text{ml}$ )을 분주하고 CSE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6는 ELISA Kit(Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

## 7. PGE2의 측정

CSE를 농도별로 처리하고, 1시간 후에 LPS를 처리한 후, 배양된 배지를 E-tube에 모아서

ELISA Kit(RnD Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용한 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였다. PGE<sub>2</sub>와 link된 acetylcholinesterase가 도포되어 있는 plate에 standard와 배양 배지를 첨가하여 4 °C에서 18시간 동안 반응시켰다. 18시간 후에 standard solution과 배지를 제거하고 Kit에 포함되어 있는 wash buffer로 5회 반복 세척하였다. 200 ul의 substrate reagent를 첨가하여 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후, stop solution을 첨가하여 반응을 종결시켰다. PGE<sub>2</sub>의 함량은 405 nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve에 준하여 결정하였다.

### 8. 통계적 검증

실험 결과는 mean±SD로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance(ANOVA)로 검정한 후 Newman - Keuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은  $p < 0.05$  또는  $p < 0.01$ 로 하였다.

## III. 結 果

### 1. CSE가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO 생성에 미치는 영향

CSE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml의 농도로 Raw 264.7 cell에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다. NO의 양은 처치를 하지 않은 control에 대한 비율로 나타내었다.

LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성( $P < 0.01$ ) 있게 증가하였으며, CSE 0.01 mg/ml를 처치한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성이 없었으나, CSE 0.03, 0.1 mg/ml를 처치한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성

( $P < 0.05$  또는  $P < 0.01$ ) 있게 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 1).

### 2. CSE가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

CSE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO 생성의 감소가 CSE의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여 THE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. LPS 단독 처리군과 CSE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml 군에서는 control군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

### 3. CSE가 LPS로 유도된 Raw cell의 TNF-α에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 CSE의 TNF-α 생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 TNF-α 생성 정도를 측정하였다.

LPS는 전염증성 cytokine인 TNF-α의 생성을 유의성 있게 증가시켰고, CSE 0.03, 0.1 mg/ml를 처치한 실험군에서는 LPS로 유도된 TNF-α를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성( $P < 0.05$  또는  $P < 0.01$ ) 있게 감소시켰다(Fig. 3).

### 4. CSE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1β에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 CSE의 IL-1β 생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-1β 생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine인 IL-1β의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, CSE 0.03, 0.1 mg/ml를 처치한 실험군에서는 LPS로 유도된 IL-1β를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유

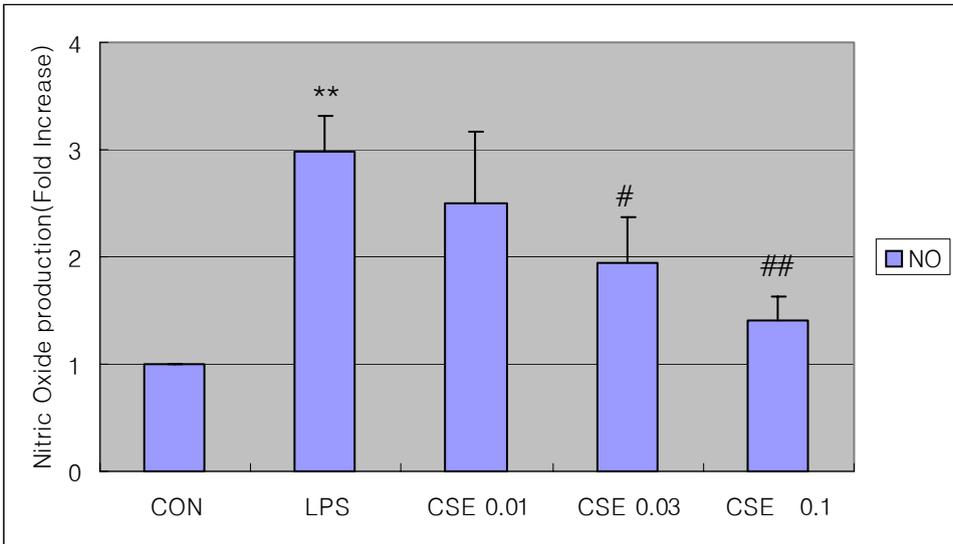


Fig. 1. Inhibition of NO production by Coicis Semen Extract(CSE) in Raw 264.7 cells  
 Raw 2647 cells were treated with various concentrations of CSE dissolved in EMEM for 1hr prior to the addition of LPS(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and the cells were further incubated for 18hr. Control cells were incubated with vehicle alone. the concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Methods section. Data represent the mean $\pm$ SD with three separate experiments(\*: significant as compared to control, \*\* $P<0.01$ , # significant as compared to LPS alone, ## $P<0.01$ ).

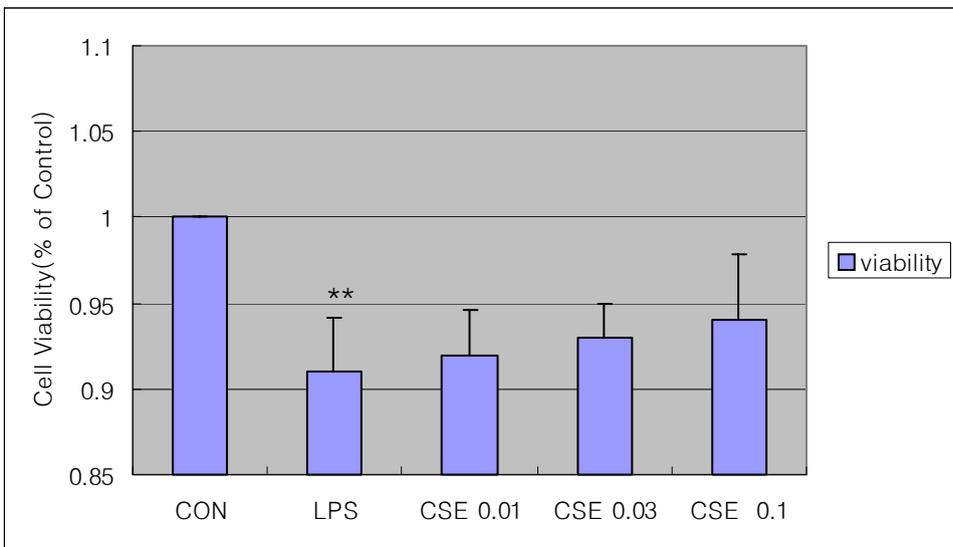


Fig. 2. Effects of Coicis Semen Extract(CSE) on the cell viability in LPS stimulated Raw 264.7 cells  
 The cell viability was measured after indicated time. Data represent the mean $\pm$ SD with three separate experiments.

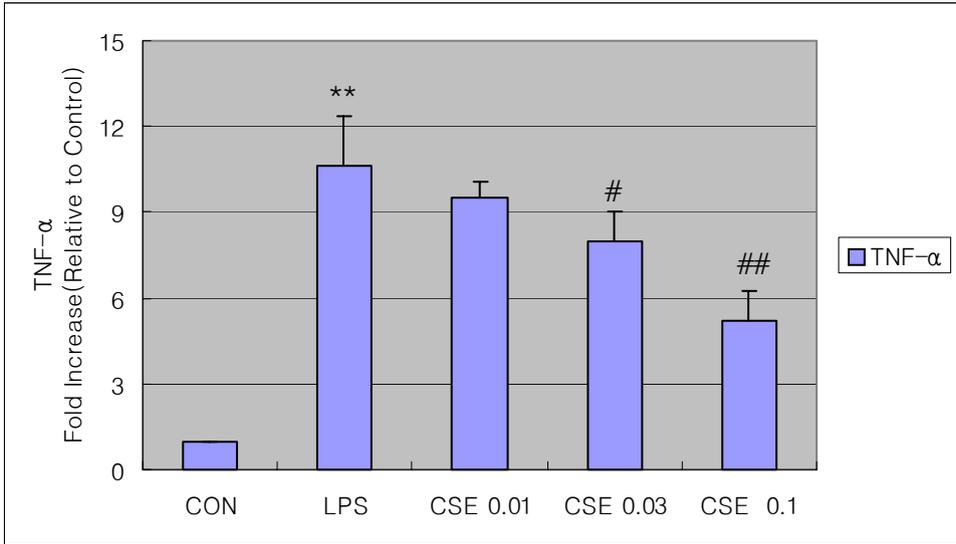


Fig. 3. The effect of Coicis Semen Extract(CSE) on LPS-inducible TNF- $\alpha$  production  
 Production of TNF- $\alpha$  was measured in the medium of Raw 2647 cells cultured with LPS(1 $\mu$ g/ml) in the presence or absence of CSE for 18hr.  
 The amount of TNF- $\alpha$  was measured by immunoassays as described in Section 2.  
 Data represent the mean $\pm$ SD with three separate experiments(\*: significant as compared to control, \*\*P<0.01, # significant as compared to LPS alone, ##P<0.01).

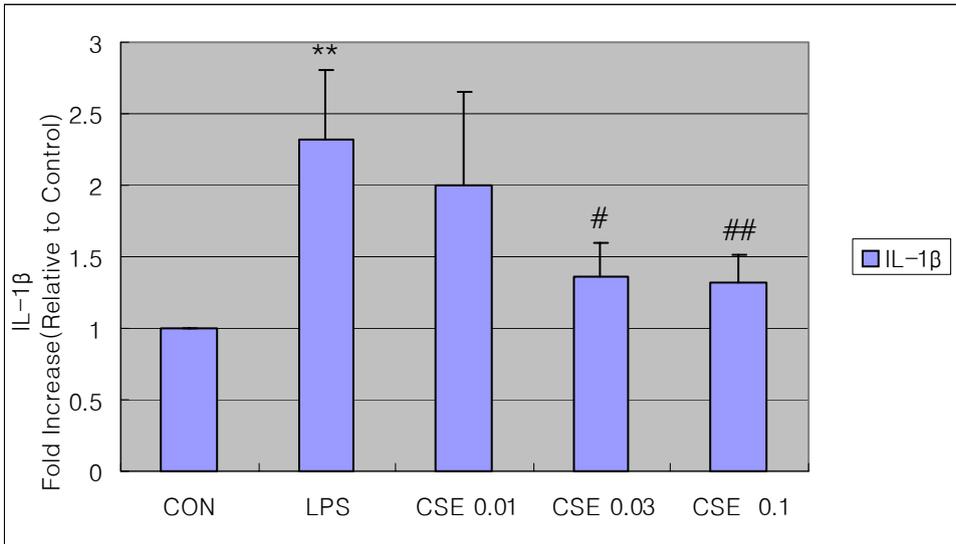


Fig. 4. The effect of Coicis Semen Extract(CSE) on LPS-inducible IL-1 $\beta$  production  
 Production of IL-1 $\beta$  was measured in the medium of Raw 2647 cells cultured with LPS(1 $\mu$ g/ml) in the presence or absence of CSE for 12hr.  
 The amount of IL-1 $\beta$  was measured by immunoassays as described in Section 2.  
 Data represent the mean $\pm$ SD with three separate experiments(\*: significant as compared to control, \*\*P<0.01, # significant as compared to LPS alone, ##P<0.01).

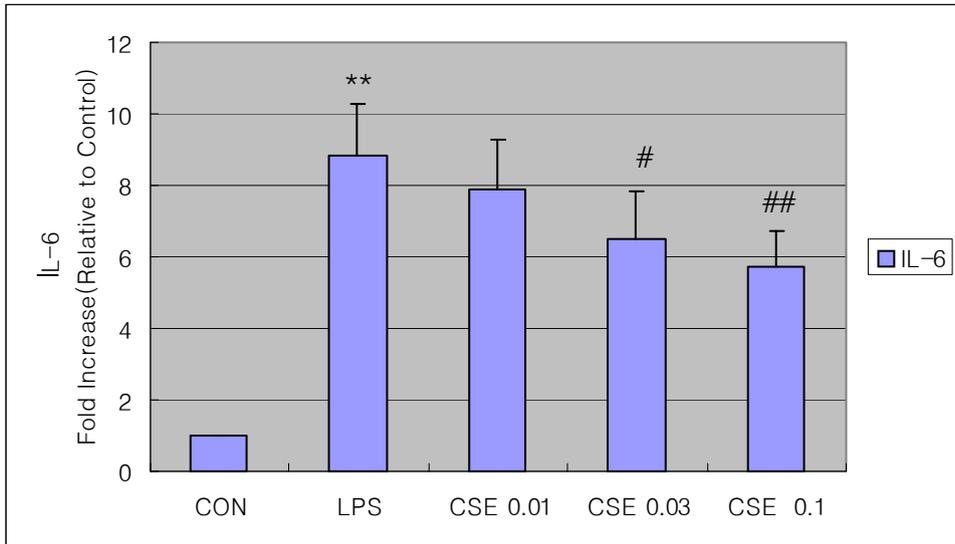


Fig. 5. The effect of Coicis Semen Extract(CSE) on LPS-inducible IL-6 production  
 Production of IL-6 was measured in the medium of Raw 2647 cells cultured with LPS(1 $\mu$ g/ml) in the presence or absence of CSE for 6hr.  
 The amount of IL-6 was measured by immunoassays as described in Section 2.  
 Data represent the mean $\pm$ SD with three separate experiments(\*: significant as compared to control, \*\*P<0.01).

의성(P<0.05 또는 P<0.01) 있게 감소시켰다(Fig. 4).

### 5. CSE가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-6에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 CSE의 IL-6 생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-6 생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine 인 IL-6의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, CSE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된 IL-6를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성 (P<0.05 또는 P<0.01) 있게 감소시켰다(Fig. 5).

### 6. CSE가 LPS로 유도된 Raw cell의 PGE2에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 CSE의

PGE<sub>2</sub> 생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 PGE<sub>2</sub> 생성 정도를 측정하였다. LPS는 염증반응 매개물질인 PGE<sub>2</sub>의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, CSE 0.03, 0.10 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub>를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성 (P<0.01) 있게 감소시켰다(Fig. 6).

## IV. 考 察

薏苡仁(Coicis Semen)은 벼과(Poaceae)에 속한 일년생 초본인 울무(Coix lachryma-jobi var. mayuen)의 성숙한 종인을 건조한 것으로 amino acid, coixol, coixenolid, triterpenoids 등을 함유한

다. 薏苡仁은 性涼하며, 味甘淡하고, 入脾胃肺하며, 健脾滲濕 除痺止瀉 清熱排膿의 효능을 가지고 있으며, 水腫脚氣 小便不利, 濕痺拘攣, 脾虛泄瀉, 肺癰, 腸癰 등에 치료효과가 있다<sup>1)</sup>.

薏苡仁과 관련된 최근의 연구 경향으로 이 등<sup>2,3)</sup>의 고지혈증 흰쥐에 대한 薏苡仁의 효과, 윤 등<sup>4)</sup>의 高脂肪食餌로 誘發된 肥滿白鼠모델에서 薏苡仁 藥鍼 등이 血清脂質 및 肝機能에 미치는 影響, 홍 등<sup>5)</sup>의 薏苡仁이 생쥐의 기아 Stress에 미치는 影響, 김 등<sup>6)</sup>의 薏苡仁이 3T3-L1 Adipocytes에서 인슐린성 작용과 인슐린 민감성에 미치는 영향에 관한 실험적 연구들이 있었으나, 薏苡仁의 면역반응 및 염증반응에 미치는 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에, 본 연구에서는 薏苡仁 추출물(CSE)의 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극으로 분비되는 NO, 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  와 PGE<sub>2</sub> 등의 염증 매개물질의 억제를 통한 항염증 효과를 평가함으로써, CSE가 면역체계에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

수많은 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이 변화는 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체 내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 한다. 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, NO, PG, 염증을 유발시키는 여러 cytokine 등이 있다<sup>24)</sup>.

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 염증반응의 주요 화학전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(histamine, serotonin 등)와 kinin류(bradykinin 등), 지연형 반응에 주

로 작용하는 cytokine류와 PG와 IL류 등의 4군으로 분류된다<sup>25)</sup>.

대식세포는 자연 면역 뿐만 아니라 획득 면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있다. LPS에 의한 대식세포의 활성화는 염증 매개물질인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등 다양한 cytokine을 유도하며 염증매개물질의 생성은 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 생성 과정으로 이어지게 된다<sup>9,11,26)</sup>.

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>15,27-30)</sup>. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제도의 가능성 등에 관한 실험이 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 CSE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 CSE를 0.1-1.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다.

LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성 있게 증가하였으며, CSE 0.01 mg/ml를 처치한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성이 없었으나, CSE 0.03, 0.1 mg/ml를 처치한 실험군에서는 LPS군에 비해 유의성 있게 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 1).

CSE가 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, CSE의 세포독성으로 인한 cell 수의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, CSE의 농도별에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 CSE의 0.01, 0.03 및

0.10 mg/ml의 농도에서는 유의한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>31</sup>. 또한 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$  등은 전염증성 cytokine으로 염증반응을 조절하며 서로 간에 상호작용을 하는 것으로 알려져 있는데 염증반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다<sup>32-33</sup>.

특히 염증반응에 관여하는 세포 중에서 대식세포는 각종 cytokine을 분비하여 대식세포의 유주, T 세포의 활성화와 증식억제, 혈관신생작용 등을 나타내어 염증반응을 조절한다고 인식되고 있다<sup>31</sup>.

한편, 대식세포는 LPS에 의해 다양한 cytokine, chemokine의 발현을 증가시킨다. cytokine으로는 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF 등이, chemokine으로서 IL-8, MCP-1 등의 발현이 증가된다<sup>34</sup>. 이 중 TNF- $\alpha$ 는 pro-inflammatory cytokine으로서 monocytes, macrophages, mast cells 등으로부터 분비된다. 근래 TNF- $\alpha$ 는 많은 자가면역질환에 있어서 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>35-6</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>36</sup>. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>35</sup>.

LPS로 유도된 RAW 2647 세포에서 CSE의 TNF- $\alpha$  생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 TNF- $\alpha$  생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 증가시

켰고, CSE 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ 를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3).

IL-1은 septic shock<sup>37</sup>, burn<sup>38</sup>, 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury<sup>39</sup>의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide 등의 매개물질 합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다<sup>40</sup>. 또한, 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 활성화하며<sup>35</sup>, hypothalamus에 작용하여 발열을 유도한다<sup>35</sup>.

LPS로 유도된 RAW 2647 세포에서 CSE의 IL-1 $\beta$  생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-1 $\beta$  생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, CSE 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 실험군에서는 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$ 를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 4).

IL-6는 단핵세포와 대식세포에 의해 분비되는데 분화된 B 세포가 형질세포로 분화되도록 촉진시키고 antibody의 분비를 자극한다. IL-6는 또한 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>35-6</sup>.

LPS로 유도된 RAW 2647 세포에서 CSE의 IL-6 생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 IL-6 생성 정도를 측정하였다. LPS는 전염증성 cytokine인 IL-6의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, CSE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된

IL-6를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 5).

일반적으로 혈관확장, 발열, 염증 및 통증에 관여하는 것으로 알려진 PG의 생성은 세포막의 인지질의 구성성분인 arachidonic acid가 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)와 다른 acyl hydrolases의 작용에 의해 조직의 인지질로부터 유리되어 COX에 의해 PG로 변환된다<sup>41)</sup>. 또 PGE<sub>2</sub>는 COX-2 활성화 후에 생성되며 주로 비만세포나 대식세포에 의해 분비되며, 염증부위의 부종, 통증, 감각과민을 초래하는 histamine, bradykinin, NO 등과 더불어 혈관 투과성을 증가시키며<sup>42)</sup>, 통증자극에 대한 반응의 상승작용, 혈관확장, 발열, 염증세포의 활성을 유도한다<sup>41)</sup>.

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 CSE의 PGE<sub>2</sub> 생성 저해능을 관찰하기 위하여 CSE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하고 18시간 후 ELISA kit를 사용하여 PGE<sub>2</sub> 생성 정도를 측정하였다. LPS는 염증반응 매개물질인 PGE<sub>2</sub>의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, CSE 0.03, 0.10 mg/ml 처리군은 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub>를 LPS단독 처리군에 비해 각각 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 6).

이상의 결과는 CSE가 NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 저해함으로써 유의한 항염증 효과가 있음을 보여주며, 향후 기전적 연구를 통해 CSE를 활용한 염증반응 조절제 개발과 임상에서의 활용가치를 높일 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 結 論

薏苡仁 추출물(CSE)이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 nitric oxide의 생성과, 세포생존

율, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub>에 미치는 영향을 조사하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CSE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군에서 NO의 생성량을 유의성 있게 억제하였으며, 모든 농도의 CSE에서 세포독성을 유발하지 않았다.
2. CSE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군에서 TNF- $\alpha$ 를 유의성 있게 억제하였다.
3. CSE 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml 처리군에서 IL-1 $\beta$ 를 유의성 있게 억제하였다.
4. CSE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군에서 IL-6를 유의성 있게 억제하였다.
5. CSE 0.03, 0.1 mg/ml 처리군에서 PGE<sub>2</sub>를 유의성 있게 억제하였다.

## 參 考 文 獻

1. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1995:306.
2. 이영중, 손영중, 임덕빈, 이은섭, 박중수. 高果糖 誘導 고지혈증 흰쥐에 대한 薏苡仁의 효과. 大韓本草學會誌. 2005;20(1):85-92.
3. 이영중, 손영중, 이은섭, 박중수, 김성기. 비만성 고지혈증 흰쥐에 대한 薏苡仁의 효과. 大韓本草學會誌. 2004;19(3):129-36.
4. 윤대환, 강자돈, 주준성, 채우석. 高脂肪食餌로 誘發된 肥滿白鼠모델에서 蒼朮, 薏苡仁, 麻黃, 蒼朮合薏苡仁 麻黃合綠茶 藥鍼이 血清脂質 및 肝機能에 미치는 影響. 大韓藥鍼學會誌. 2004;7(1):87-100.
5. 홍서영, 임형호, 이태희. 薏苡仁이 생쥐의 기아 Stress에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 2003;24(3):23-34.
6. 김종욱, 최용휴, 주영승, 박선민. 薏苡仁이

- 3T3-L1 Adipocytes에서 인슐린성 작용과 인슐린 민감성에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2002;23(1):83-91.
7. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 2000;10:8-15.
  8. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 1990;144:1425-31.
  9. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Bio Med. 1996;211:24-32.
  10. Corbett JA, and Mac Daniel ML. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. J Exp Med. 1995;181:559-68.
  11. Cetkovic-Cvrtije M and Eizirik DL. TNF and IFN  $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 1994;6:399-406.
  12. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한 화학회지. 1999;39:52-63.
  13. 국윤범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 2002;10(1):113-29.
  14. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. Trends Microbiol. 2004;12:186-92.
  15. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. Eur J Pharmacol. 2000;406(3):301-9.
  16. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼매탄을 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2005;20(2):7-16.
  17. 김미선, 조원준, 황순이, 이종록, 박숙자, 김상찬, 지선영. 龍膽草 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 pro-inflammatory mediator에 미치는 영향. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2008;21(2):28-38.
  18. 정용래, 이승덕, 변 혁, 박인식, 정찬영, 이창환, 김갑성. 鹿茸藥鍼이 LPS 誘發 關節炎의 潤滑關節膜內 過多炎症反應 調節에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2007;24(4):167-81.
  19. 박 원, 김경호, 이창환, 이동건, 이현진, 황지혜, 김갑성. 홍화차약침의 윤활관절막내에서의 MIF활성 억제를 통한 LPS 유발 관절염의 치료 효과. 大韓鍼灸學會誌. 2007;24(4):157-66.
  20. 박기범, 백승태, 이승덕, 김경호, 김갑성. 紫何車藥針의 亢炎症能이 LPS 유발 關節炎 治療에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2006;23(6):103-15.
  21. 이상문, 홍승욱. Mouse cell에서 托裏消毒飲의 항산화작용과 항염증효과. 한방안이비인후피부과학회지. 2007;20(3):43-50.
  22. Lim JH, Lee JR, Kim SC, Jee SY. Inhibitory effect of Yongdamsagantang water extract on IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells.

- Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 2007;7(3):321-9.
23. 서은성, 황충연, 김남권. 加味清上防風湯의 항염증 효과에 대한 실험적 연구. 한방안 이비인후피부과학회지. 2008;21(2):54-70.
  24. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1995:71-104.
  25. 박광근. 구강생화학. 서울:군자출판사. 1999:318-25.
  26. 염정호, 오경재, 유영천. 니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 Nitric Oxide의 역할. 대한산업의학회지. 2001;13(3):274-85.
  27. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 2000; 28:217-26.
  28. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. 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. 2000;35:21-8.
  29. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 2001;69:625-35.
  30. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in AW 264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 2001;76:119-23.
  31. 정혜영역. Toshio Hirano편저. 생명과학과 분자의학을 위한 분자생물학. 서울. 월드 사이언스. 2002:73-85.
  32. 신경민, 박영미, 김인태, 홍선표, 홍정표, 이경태. Amygdalin의 Murine Macrophage RAW 264.7 세포에서 *in vitro* 항염효과. 생 약학회지. 2003;34(3):223-7.
  33. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996;14:397-440.
  34. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal. 2001;13(2):85-94.
  35. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1- $\beta$ , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. 2003;37(6) :355-61.
  36. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by sauchinone effects on I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. British Journal of Pharmacology. 2003;139:11-20.
  37. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 1993;119:771-8.
  38. 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. 1993;23:311-9.
  39. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat.

Transplantation. 1997;63:143-8.

40. Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery*. 2004;135(5):544-54.
41. Cha YI, Solnica-Krezel L, DuBois RN. Fishing for prostanoids:deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev Biol*. 2006;289(2):263-72.
42. Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Yang HL. Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol*. 2005 ;5:1914-25.