

# 槐花 물 추출물의 항염증 효과

배기상 · 조범연 · 김민선 · 박경철 · 구본순 · 서상완<sup>1</sup> · 김성규<sup>1</sup> · 윤승원<sup>1</sup> · 정원석<sup>2</sup> · 함경완 · 송호준 ·  
윤명자<sup>3</sup> · 전호성<sup>4</sup> · 권강범<sup>5</sup> · 김재호<sup>6</sup> · 박성주\*

원광대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 충북 제천 전통의약 산업센터,  
2: 전남 한방 산업 진흥원, 3: 원광대학교 의과대학 전정와우 연구센터, 4: 원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과,  
5: 원광대학교 한의과대학 한방생리학교실, 6: 원광대학교 한의과대학 경혈학교실

## Anti-inflammatory Effects of *Sophora Japonica* Aqueous Extract

Gi Sang Bae, Beom Yeon Jo, Min Sun Kim, Kyoung Chel Park, Bon Soon Koo, Sang Wan Seo<sup>1</sup>,  
Sung Gyu Kim<sup>1</sup>, Seung-Won Yun<sup>1</sup>, Won Seok Jung<sup>2</sup>, Kyung Wan Ham, Ho Joon Song, Myung Ja Youn<sup>3</sup>,  
Ho Seong Jeon<sup>4</sup>, Kang Beom Kwon<sup>5</sup>, Jae Hyo Kim<sup>6</sup>, Sung Joo Park\*

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 1: ChungBuk Oriental Medicine Center,  
2: Division of Constitutional Medicine Research, Korea Institute of Oriental Medicine,  
3: Vestibulocochlear Research Center, College of Medicine, Wonkwang University,  
4: Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
5: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
6: Department of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of aqueous extract from *Sophora Japonica* (SJ) on the RAW 264.7 cells. To evaluate the anti-inflammatory effects of SJ, we examined the cytokine productions including nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1b, IL-6 and tumor necrosis factor-a (TNF-a) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells and also inhibitory mechanisms such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa b (NF-kB) using Western blot. SJ inhibited LPS-induced production of NO, TNF-a but not of IL-1b and IL-6 in RAW 264.7 cells. SJ inhibited the activation of MAPKs such as extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38 but not of NF-kB in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. In conclusion, SJ down-regulated LPS-induced NO and TNF-a productions via MAPKs, which could be a clinical basis for inflammatory diseases and autoimmune diseases.

Key words : *Sophora Japonica* (SJ), lipopolysaccharide (LPS), inflammation, cytokine

### 서론

槐花는 콩과(Leguminosae)에 속한 낙엽관목인 회화나무의 미개한 꽃봉우리를 말한다.槐花 (*Sophora Japonica* L.)는 냄새가 거의 없으며 맛은 쓰고 성질은 약간 차다.槐花의 효능은 涼血止血, 殺蟲療瘡, 清肝降火, 抗癌, 血熱로 인한 便秘, 崩漏 등을 멈추게 하고 肝熱로 인한 안구충혈, 장출혈, 자궁출혈, 코피, 혈변, 피를 토할 때 지혈약으로 사용한다. 또한 고혈압, 두통, 어지럼증, 동맥경화증, 중풍, 뇌일혈, 가슴이 답답한 증세에도 효과가 있다

\* 교신저자 : 박성주, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· E-mail : parksj08@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6450

· 접수 : 2009/11/09 · 수정 : 2009/11/18 · 채택 : 2009/12/03

<sup>1)</sup> 약리작용으로 지혈작용, 모세혈관 투과성 감소, 혈압강하, 콜레스테롤강하, 항경련, 항궤양, 항방사능작용, 동상치료, 완만한 사하작용이 보고되었다<sup>2,7)</sup>.槐花의 성분인 Rutin과 Lectin은 출혈에 많이 이용된다<sup>1)</sup>.槐花의 여러 작용이 알려져 있으나, 아직 대식세포에서 항염증 작용에 대해서는 정확히 알려지지 않았다.이에 우리는槐花의 항염증 작용 기전을 조사하였다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다<sup>8)</sup>.

Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로

써, NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다<sup>9)</sup>. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포에 lipopolysaccharide(LPS)로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다<sup>10-14)</sup>. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다.

바이러스나 외부 병원체 감염 시 활성화된 대식 세포에서는 interleukin (IL)-1b, IL-6 그리고 tumor necrosis factor-a (TNF-a)와 같은 pro-inflammatory cytokine과 prostaglandin E2 (PGE2) 등을 생산하게 된다<sup>15,16)</sup>. 염증 매개 물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 염증성 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, PGE2, TNF-a, IL-1β 및 IL-6와 같은 염증 매개물질을 억제하면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다<sup>17,18)</sup>.

Toll like receptor(TLR)들은 선천적 면역반응에서 병원성 미생물들을 인식하고 신호전달에 의해 NF-kB를 활성화 시킨다. 그중에서 TLR-4의 ligand인 LPS는 그람 음성 박테리아의 외부세포막의 구성성분으로 대식세포를 활성화시키며, 또한 endotoxic shock의 원인물질로써 알려져 있다. 구조적으로 보면 친수성의 다당류로 이루어진 당지질(glycolipid) 부분과 공수성(hydrophobic)의 lipid A로 이루어져 있다. LPS의 생물학적 활성은 이 lipid A 부분에 의해 결정지어진다. 대식세포를 LPS로 자극하면 TNF-α, IL-1, IL-6등과 같은 사이토카인 및 NO의 발현을 증가시킨다. LPS가 혈액에 있을 경우 즉각적으로 LBP(lipopoly-saccharide binding protein)와 결합하고 다시 CD14과 복합체를 형성하는데 이렇게 형성된 LPS/LBP/CD14 복합체가 세포표면에 작용하여 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화 및 NF-kB의 활성화를 일으킨다.<sup>12-14)</sup>

이에 槐花가 LPS로 유도한 대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 검증하고자 마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 cell에서 NO와 전염증성 사이토카인(IL-1b, IL-6, TNF-a)의 발현에 대한 실험을 하였고, MAPKs family인 extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) 및 p38에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 NF-kB의 활성 지표가 될 수 있는 inhibitory kappa B a (Ik-Ba)를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 약제

실험에 사용한 槐花(*Sophora Japonica* L.)는 옴니허브에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 槐花로서 확인을 받은 후 사용하였다. 槐花 추출물을 얻기 위하여 물 1 L에 100 g을 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다

### 2. 시약

Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning(Rochester,USA)사에서 구입하였다. 실험에

사용된 시약 중 chloroform, Tri-zol, sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS, Tris-HCl 등은 SIGMA(St. Louis,USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-Ik-Ba, anti-phospho-JNK는 Cell signaling사에서 구입하였다. anti-mouse IL-1b, IL-6, TNF-a antibodies, 재조합 IL-1b, IL-6, TNF-a는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

### 3. 실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트(성남, 경기도)에서 구입하여 사용하였다.

### 4. MTT 분석

RAW 264.7 cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서  $2 \times 10^5$ 의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 槐花를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

### 5. NO 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent:0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 100 μl의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μl씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37℃에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토미터 (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

### 6. Cytokine (TNF-a, IL-1b, IL-6) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 cell을 자극하기 전 槐花 추출물을 1시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 뒤 이들 염증매개물질을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다.

### 7. Total RNA 추출

Total RNA는 Tri-zol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 槐花를 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양

한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위의 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100  $\mu$ l의 chloroform 용액을 가하고 두 세번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15  $\mu$ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다.

8. Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Tri-zol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을 넣고 70°C 에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase을 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1x PCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 58°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초를 30cycle 반복하였다.

사용한 primer는 다음과 같다.

TNF- $\alpha$	Forward	ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC
TNF- $\alpha$	Reverse	TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT
IL-1b	Forward	AGT ATC ACT CAT TGT GGC TG
IL-1b	Reverse	TCA CAG AGG ATG GGC TCT TC
IL-6	Forward	CAT CCA GTT GCC TTC TTG GGA
IL-6	Reverse	CAT TGG GAA ATT GGG GTA GGA AG
$\beta$ -actin	Forward	TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G
$\beta$ -actin	Reverse	TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C

PCR반응이 끝난 후 1X 샘플링 buffer를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10  $\mu$ l씩을 넣고 전기영동한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

9. Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5 x 10<sup>6</sup> cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media( RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 槐花 (500 mg/ml)를 전처리 하고 1시간 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별로(0, 15, 30, 60 min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리 (5,000 rpm, 5 min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer (lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10  $\mu$ l + protase inhibitor 10  $\mu$ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 5% skim milk로 2 시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 Ik-Ba을 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

10. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 槐花의 RAW 264.7 cell에 대한 독성

槐花의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell에 槐花를 농도 의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 槐花는 RAW 264.7 cell에 독성을 나타내지 않았다.

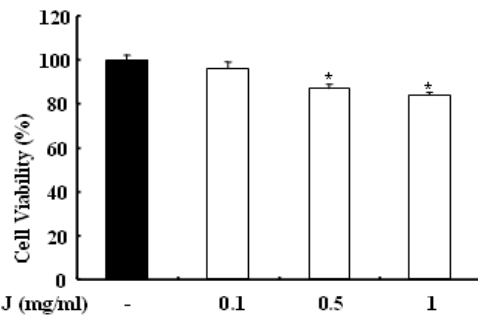


Fig. 1. Effect of SJ on cytotoxicity in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with SJ at indicated dose. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment. \*P < 0.05 : significant as compared to control.

2. 槐花 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

槐花는 COX-2를 경유해 항염증 효과와 같은 다양한 활성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>2,7)</sup>. 물 추출물에서의 항염효과에 대해서 조사하기 위하여 먼저 槐花가 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 槐花를 다양한 농도로 전처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정된 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 槐花 추출물을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다(Fig. 2).

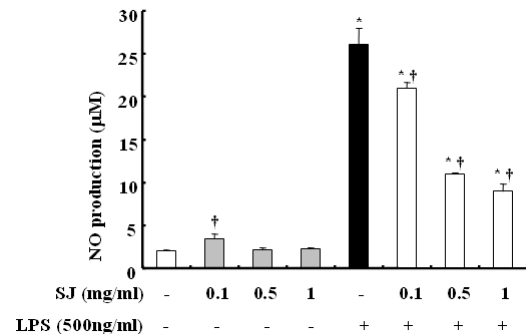


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by SJ. The cells were treated with SJ water extract at indicated concentration for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. NO release was measured by the method of Griess.\*P < 0.05 : significant as compared to control, † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone.

3. 槐花 추출물이 IL-1b, IL-6, TNF-a 발현에 대한 영향

槐花가 RAW 264.7 cell에서 전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여, 염증성 세포활성물질의 생성을 조사하였다. 槐花를 전처리한 후 LPS로 자극하여 ELISA 방법으로 IL-1b, IL-6, TNF-a를 측정된 결과 槐花 추출물이 IL-1b, IL-6의 생성은 억제하지 못하였으나, TNF-a를 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

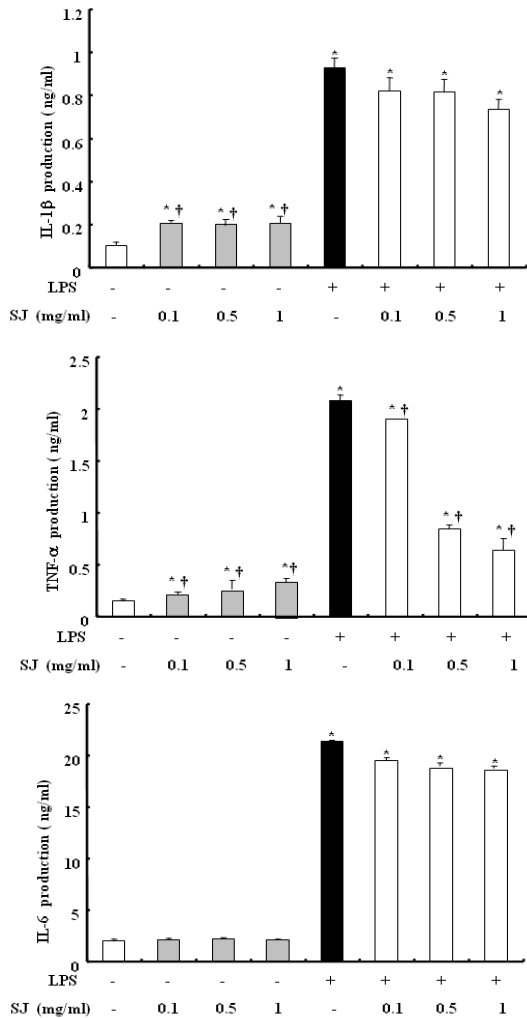


Fig. 3. Effect of SJ on the productions of IL-1b, IL-6, TNF-a in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated SJ at indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods.\*P < 0.05 : significant as compared to control, † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone.

4. 槐花 추출물이 mRNA 수준의 IL-1b, IL-6, TNF-a 발현에 대한 영향

槐花가 RAW 264.7 cell에서 전염증성세포활성물질을 단백질 수준에서 억제하였고(Fig. 3), mRNA수준에서도 전염증성 인자들을 억제함을 알아보기 위해 槐花를 전처리한 후 LPS로 자극하여 IL-1b, IL-6, TNF-a의 mRNA를 측정된 결과, TNF-a mRNA 발현은 현저히 억제하였으나, IL-1b와 IL-6 mRNA 발현은 억제하지 못했다(Fig. 4).

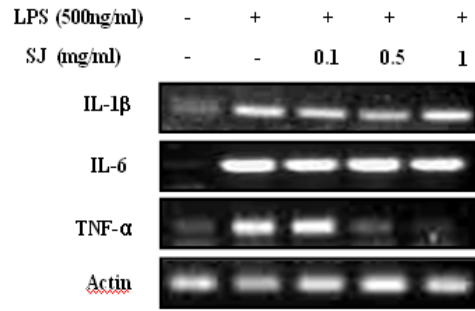


Fig. 4. Effect of SJ on the mRNA levels of IL-1b, IL-6, TNF-a. The cells were pre-treated SJ water extract at indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods.

5. 槐花 추출물에 의한 MAPKs의 발현억제 효과

MAPKs는 세포활성물질의 생성 조절 및 다양한 생물학적 기능을 조절한다. LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서는 p38, ERK, JNK의 활성이 증가 하지만, 槐花를 전처리 했을 경우 ERK, JNK, p38의 활성이 억제되었다(Fig. 5). LPS는 NF-kB를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비한다. 또한 NF-kB의 활성화는 Ik-Ba의 분해에 의존하게 된다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 槐花가 LPS에 의한 Ik-Ba의 분해를 억제하지 못했다. 즉 槐花가 NF-kB의 활성을 억제하지 못하고 있다.

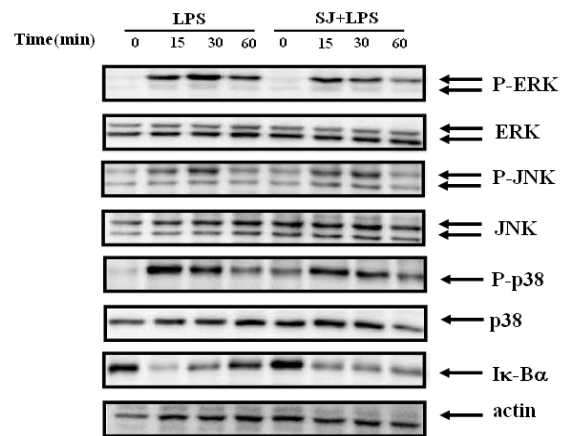


Fig. 5. Effects of SJ on the expression of Ik-Ba degradation and MAP kinase activity in LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with SJ aqueous extract at indicated concentrations for 1 h, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for indicated time. Detail methods were described Materials and Methods.

고찰

槐花의 기원 식물인 회화나무는 갈잎큰키나무로 귀신을 쫓는다고 믿어져서 주로 궁궐에 심어진 나무이다. 중국에서도 조정의 뜰에 세워진 세 그루의 회화나무를 세 명의 정승이 마주보고 자리를 잡는다는 내용이 있다. 그 이유는 누런색으로 조화롭게 번창시키는 치우치지 않은 덕을 지녔으며 무늬가 아름다워 세 명의 정승이 그 곳에 서게 되었다고 전한다. 이명으로는 槐米, 槐花米라고도 한다<sup>1)</sup>.

그 생김새는 황록색이나 황갈색의 꽃받침과 옅은 황색 또는 옅은 갈색을 나타내는 채 피지 않은 꽃잎으로 이루어져 있다. 꽃받침은 얇게 갈라지고, 주머니모양의 화관은 5편으로 피고 각 편은 크기 및 모양이 각각 다르다. 수술은 10개이고 그 기부는 합착되어 있으나 끝은 갈라지고 화관에 따라서 구부러져 있다. 암술은 1개이며 짧고 작다<sup>1)</sup>.

약리실험에서 꽃의 루틴성분이 모세혈관의 투과성을 낮추고 염증을 없애며, 槐花 물 추출액은 혈압을 낮추고 피속 콜레스테롤을 낮추는 것으로 밝혀졌다. 장출혈, 치루, 자궁출혈, 토혈, 코피, 혈리 등의 모세혈관 장애로 인한 여러 가지 출혈과 간열로 눈이 붉어지는데, 부스럼에 쓴다. 염증치료 및 수렴작용이 우수하여 고혈압의 예방과 치료약으로도 쓴다<sup>17-21)</sup>. 회화나무 꽃에는 꿀이 많아 벌들이 많이 모여들고 회화나무꽃은 꿀 중에서 제일 약효가 높다고 한다. 회화나무꽃은 특히 항암효과가 높은 것으로 알려져 있다<sup>22-25)</sup>.

NO는 염증성 매개체로서 대식세포의 증양, 박테리아 파괴 능력과 같은 면역반응에 중요한 역할을 한다<sup>26)</sup>. 또한 장기 기능에 미치는 LPS의 유독한 작용의 원인은 NO이다<sup>27)</sup>. NO의 지나친 생산은 폐혈증과 류머티즘과 같은 면역질환을 야기할 수 있다<sup>28)</sup>. NO를 억제한다면 면역질환을 억제할 수 있다. 槐花 물추출물은 NO를 유의적으로 억제하여 염증에 관여함을 보여준다(Fig. 2).

그람음성 세균 세포외막 성분인 LPS는 macrophage에서 면역기능을 조절하는 여러 분자 즉 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-10 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 pro-inflammatory 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다<sup>29,30)</sup>. 또 LPS-TLR4 신호 기전은 특정 질병에 관련이 있다고 보고하고 있다. 특히 폐혈증에서, LPS-TLR4의 신호전달체계는 중요한 역할을 한다. 예를 들어, 폐혈증에서 중요한 역할을 하는 TNF-a, IL-1b, IL-6은 폐혈증에서 고농도로 발현되고, TNF-a를 동물에 주입 시 순환계가 손상되고, 심각한 장기 손상이 일어나 치명적인 독성을 유발한다. 특히 TNF-a는 endotoxin shock에 있어서 주요 사이토카인으로 TNF-a 너아웃 마우스는 폐혈증으로부터 민감성이 떨어진다는 보고가 있다<sup>31,32)</sup>. 槐花를 처리한 군에서는 TNF-a 완벽하게 억제하였다. 이러한 감소는 槐花가 LPS에 관련된 폐혈증 및 TNF와 관련된 염증 반응에 사용할 수 있다는 것을 보여준다. 추후에는 쇼크 억제 실험과 그에 따른 싸이토카인의 변화를 측정하는 것이 더 이루어져야 할 것 같다.

LPS는 MAPKs와 NF-kB를 활성화시켜서 NO 및 superoxide anion 등의 free radicals 등이 생성된다<sup>33-36)</sup>. ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 활성화는 ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 인산화에 의해서 나타난다. IKK의 활성화는 NF-kB Rel A와 Iκ-Ba의 인산화와 유비퀴틴네이션과 프로테오솜 분해를 촉진하며, NF-kB 조합체는 핵으로 전사되어, NF-kB의 서브 유닛인 RelA와 kB 의존적인 유전자를 활성화 한다. 그리하여 NF-kB 활성화는 Iκ-Ba의 감소를 통해 알아낼 수 있다<sup>37)</sup>. 槐花가 ERK 1/2, JNK 1/2, p38 인산화는 억제하였으나, Iκ-Ba의 분해를 억제 하지 못하였다.

이러한 실험 결과들은 槐花가 대식세포에서 ERK 1/2, JNK

1/2, p38의 인산화를 저해하여서 TNF-a와 NO의 생산을 억제하였다고 생각된다. 槐花의 이와 같은 작용은 천식, 류마티스 관절염 같은 자가 면역 질환과 소화 질환 염증, 예를 들어 췌장염, 지방간, 대장염 등과 염증에 효과적일 것이라고 생각되어진다. 위와 같은 槐花의 효능을 이용하여, 추가적인 마우스나 랫트에서 in vivo 실험이 이루어져야 할 것이다.

## 결론

RAW264.7cell을 LPS로 자극하였을 때 槐花 물 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

槐花 추출물은 세포독성이 거의 나타나지 않았으며 농도의존적으로 NO 생산을 억제하였고, TNF-a의 생성을 단백질 수준과 mRNA 수준에서 억제하였다. 槐花 추출물은 ERK 1/2, JNK, p38의 인산화를 억제하였으나, Iκ-Ba의 분해를 억제하지 못했다.

이와 같은 결과로 보아 槐花 물 추출물은 MAPKs의 인산화를 억제하여서, NO와 TNF-a의 생산을 억제하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년 정부 (교육인적자원부)의 재원으로 한국한술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-311-E00115).

## 참고문헌

1. 신민교. 임상본초학, 서울, 영림사, p 489, 2002.
2. Kite, G.C., Veitch, N.C., Boalch, M.E., Lewis, G.P., Leon, C.J., Simmonds, M.S. Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of *Fructus Sophorae* and *Flos Sophorae*. *Phytochemistry* 70(6):785-794, 2009.
3. Kim, J.M., Yun Choi, H.S. Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica*. *Arch Pharm Res.* 31(7):886-890, 2008.
4. Tang, Y.P., Zhu, H.X., Duan, J.A. Two new isoflavone triglycosides from the small branches of *Sophora japonica*. *J Asian Nat Prod Res.* 10(1-2):65-70, 2008.
5. Tang, Y., Yang, R., Duan, J.A., Shang, E., Su, S., Zhu, M., Qian, D. Isoflavone tetraglycosides from *Sophora japonica* Leaves. *J Nat Prod.* 71(3):448-450, 2008.
6. Jung, C.H., Zhou, S., Ding, G.X., Kim, J.H., Hong, M.H., Shin, Y.C., Kim, G.J., Ko, S.G. Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(10):2556-2559, 2006.
7. Kim, B.H., Chung, E.Y., Min, B.K., Lee, S.H., Kim, M.K., Min, K.R., Kim, Y. Anti-inflammatory action of legume isoflavonoid sophoricin through inhibition on cyclooxygenase-2 activity. *Planta Med.* 69(5):474-476, 2003.

8. Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., et al. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J.* 18: 670-681, 2004.
9. Lee, T.K., Kim, D.I., Han, J.Y., Kim, C.H. Inhibitory effects of *Scutellaria barbata* D. Don. and *Euonymus alatus* Sieb. on aromatase activity of human leiomyoma cells. *Immunopharm Immunotoxicol.* 26: 315-327, 2004.
10. Kwqamata, 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.
11. 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.
12. 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- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 35: 21-28, 2000.
13. 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.
14. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol.* 76: 119-123, 2001.
15. Horwood, N.J., Page, T.H., McDaid, J.P., Palmer, C.D., Campbell, J., Mahon, T., Brennan, F.M., Webster, D., Foxwell, B.M. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol.* 176(6):635-641, 2006.
16. Hirohashi, N., Morrison, D.C. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun.* 64(3):1011, 1996.
17. Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I. and Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic Med. Chem.* 11: 1995-2000, 2003.
18. Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70(2):93-103, 2004.
19. Tang, Y.P., Li, Y.F., Hu, J., Lou, F.C. Isolation and identification of antioxidants from *Sophora japonica*. *J Asian Nat Prod Res.* 4(2):123-128, 2002.
20. Tang, Y., Lou, F., Wang, J., Zhuang, S. Four new isoflavone triglycosides from *Sophora japonica*. *J Nat Prod.* 64(8):1107-1110, 2001.
21. Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P., Mason, T.J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrason Sonochem.* 8(3):299-301, 2001.
22. Kang, S.C., Lee, C.M., Choi, H., Lee, J.H., Oh, J.S., Kwak, J.H., Zee, O.P. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother Res.* 20(11):1017-1019, 2006.
23. Mazal, P.R., Schaufler, R., Altenhuber Müller, R., Haitel, A., Watschinger, B., Kratzik, C., Krupitza, G., Regele, H., Meisl, F.T., Zechner, O., Kerjaschki, D., Susani, M. Derivation of nephrogenic adenomas from renal tubular cells in kidney-transplant recipients. *N Engl J Med.* 347(9):653-659, 2002.
24. Abe, M., Suzuki, O., Tasaki, K., Tominaga, K., Wakasa, H. Analysis of lectin binding properties on human Burkitt's lymphoma cell lines that show high spontaneous metastasis to distant organs in SCID mice: the binding sites for soybean agglutinin lectin masked by sialylation are closely associated with metastatic lymphoma cells. *Pathol Int.* 46(12):977-983, 1996.
25. Matsumura, K., Nakasu, S., Nioka, H., Handa, J. Lectin histochemistry of normal and neoplastic peripheral nerve sheath. 1. Lectin binding pattern of normal peripheral nerve in man. *Acta Neuropathol.* 86(6):554-558, 1993.
26. la Sala, A., Gadina, M., Kelsall, B.L. G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J. Immunol.* 175: 2994-2999, 2005.
27. Wu, G.H., Zhang, Y.W., Wu, Z.H. Modulation of postoperative immune and inflammatory response by immune-enhancing enteral diet in gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 7: 357-362, 2001.
28. Bryan, N.S. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems based review. *Free Radic Biol Med.* 41: 691-701, 2006.
29. Bhattacharyya, A., Pathak, S., Datta, S., Chattopadhyay, S., Basu, J., Kundu, M. Mitogen-activated protein kinases and NF- $\kappa$ B regulate *H. pylori*-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J.* 366: 376-382, 2002.
30. Binetruy, B., Smeal, T., Kariu, M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation

- domain. *Nature*. 351: 122-127, 1991.
31. Tracey, K.J., Cerami, A., Tumor necrosis factor : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Reviews of Medicine* 45, 491-503, 1994.
  32. Tracey, K.J., Beutler B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolper, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey, J.J., Zentella, A., Albert, J.D., Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 232, 977-980, 1986.
  33. Garrington, T.P., Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 211-218, 1999.
  34. Seo, J.H., Lim, J.W., Kim, H., Kim, K.H. Helicobacter pylori in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases. AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *lab Invest.* 84: 49-62, 2004.
  35. 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 suchinone effects on I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation. C/EBP and AP-1 activation. *British J.Pharmacol.* 139: 11-20, 2003.
  36. Meng, F., Lowell, C.A. Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med.* 185(9):1661, 1997.
  37. Aggarwal, B.B. Signaling pathways of the TNF superfamily : a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* 3: 745-756, 2003.