

## 土茯苓의 Raw 264.7 세포에 대한 항염효과

오성원, 김병우  
상지대학교 부속한방병원 내과학교실

### Anti-inflammatory Effects of *Smilacis Glabrae Rhizoma* in Raw 264.7 Cells

Sung-won Oh, Byoung-woo Kim  
Dept. of Internal Medicine, Oriental Hospital of Sang-ji University

#### ABSTRACT

**Objective :** Inflammatory cytokines have a close relationship to insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). The inhibitory effect of *Smilacis Glabrae Rhizoma* (SGR) were examined on production of nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and NF- $\kappa$ B activation in Raw 264.7 cells.

**Methods :** Raw 264.7 cells were pretreated with SGR(20, 50, 100  $\mu$ g/ml), and then cultured with lipopolysaccharides (LPS). Cell viability was measured by MTT assay; inhibition of NO, PGE<sub>2</sub>, and TNF- $\alpha$  production were measured by Griess reagent and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Induction of COX-2 and iNOS were determined by western blotting analysis. Inhibition of NF- $\kappa$ B was measured by immunofluorescence assay (IFA).

**Results :** SGR inactivated NF- $\kappa$ B, and inhibited the production of NO, iNOS, and PGE<sub>2</sub>. Inhibition of COX-2 and TNF- $\alpha$  could not be confirmed.

**Conclusions :** From the above result, SGR was found to have an anti-inflammatory effect of inhibition of NO, iNOS, and PGE<sub>2</sub> production via inhibition of NF- $\kappa$ B.

**Key words :** Anti-inflammatory, *Smilacis Glabrae Rhizoma*, nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub>, iNOS, cyclooxygenase-2

### 1. 緒 論

土茯苓(*Smilacis Glabrae Rhizoma*, 이하 SGR이라 함)은 백합과(Liliaceae)에 속한 다년생 攀援狀 灌木의 근경을 건조한 것을 지칭한다<sup>1</sup>.

《本草綱目》<sup>2</sup>에 이르기를 土茯苓의 性은 平, 無毒하고, 味는 甘淡하며, 『健脾胃, 强筋骨, 去風濕, 利關節, 止泄瀉』 효능이 있어 『治拘攣, 骨痛, 惡

瘡癰腫, 解汞粉銀朱毒』이라 하였다. 임상에서는 土茯苓의 이뇨, 해독, 소염효능을 이용하여<sup>3</sup> 위암, 식도암, 만성 피부질환, 매독성 피부질환 등의 치료에 사용되고 있다<sup>4</sup>. 土茯苓의 약리효과에 관한 연구를 통해서 항돌연변이원성작용<sup>5</sup>, 항암작용, phospholipase A2(PLA<sub>2</sub>) 저해작용<sup>6</sup> 등이 확인되었으며, 염증 매개 물질인 iNOS, COX-2의 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 韓醫學에서 燥熱이 原因이 되어 發하는 당뇨병에도 土茯苓의 항염효과가 기대 되어 본 실험 연구에 임하게 되었다.

당뇨병은 Langerhans's island의  $\beta$ 세포로부터 인

· 교신저자: 오성원 강원도 원주시 우산동 283번지  
상지대학교 부속한방병원 내과의국  
TEL: 033-741-9381  
E-mail: fouth1@hanmail.net

술린 분비가 급격하게 감소하여 발생하는 제1형 당뇨병과 glucose에 대한 insulin 반응이 저하 되어 발생하는 제2형 당뇨병으로 분류된다. 제2형 당뇨병은 유전적 요인과 비만이 가장 큰 원인인데 반하여 제1형 당뇨병은 급·만성 췌장염, 췌도염 같은 염증질환이 가장 큰 원인이 된다.

또한 제1형 당뇨병과 염증 매개 물질인 inflammatory cytokine과 nitric oxide(NO) 등은 밀접한 관계가 있는데<sup>8,9</sup>, 土茯苓에 관한 최근 논문 중 뚝 등<sup>7</sup>은 土茯苓이 낮은 dosage에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다.

이에 저자는 土茯苓의 항염 효과를 알아보기 위하여 murine macrophage인 Raw 264.7 세포를 대상으로 土茯苓 농도에 따른 NO, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  생성량을 측정해보고, nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)의 핵내 이동을 확인해 본 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 藥材 와 試料製造

#### 1) 藥材

실험에 사용한 한약재는 국내산으로 시중에서 구입하여 尙志大學校 韓醫科大學 本草學教室에 검정한 후 사용하였다.

#### 2) 試料製造

土茯苓 50 g을 1000 ml의 증류수에 희석하여 수증기증류장치에서 3시간씩 증류한 후 동결건조하여 5.78 g의 토복령 분말(수율 11.56%)을 얻었다.

### 2. 試藥 및 材料

Lipopolysaccharides(LPS), Methyl Thiazol-2-YL-2, 5-diphenyl Tetrazolium bromide(MTT), 1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid & 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine-HCl(Griess), N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine acetate salt(L-NMMA)는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified

Eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone(Logan, USA)에서 구입하였다.

NO 생성 저해능 측정과 MTT assay에 사용된 ELISA reader는 Victor(NY, USA)에서 구입하였고, TNF- $\alpha$  생성 저해능 측정을 위한 ELISA kit은 eBioscience(San Diego, USA)에서 구입하였으며, PGE<sub>2</sub> 생성 저해능 측정을 위한 ELISA kit은 R&D system(MIN, USA)에서 구입하였다.

### 3. 細胞培養

본 연구에서 사용할 Murine macrophage Raw 264.7 cell line은 한림대학교 TIC에서 분양받았다. Raw 264.7 세포를 DMEM에 10% FBS, 100  $\mu$ g/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin을 혼합한 배지에서 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 4. 實驗方法

#### 1) NO 생성 저해능 측정

Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태를 측정하였다.

96 well plate에 well당 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 Raw 264.7 세포가 들어있는 부유액 100  $\mu$ l를 접종하고 24시간 배양한 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 최종농도가 각각 20, 50, 100  $\mu$ g/ml로 되도록 시료를 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS 100 ng/ml를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양 상층액 50  $\mu$ l를 Griess 50  $\mu$ l와 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

양성대조군으로는 NO 생성 억제제인 L-NMMA를 사용하였다. L-NMMA를 土茯苓과 같은 방법으로 처리하여 NO 생성 저해능을 비교하였다.

#### 2) 세포독성 측정

Raw 264.7 세포를 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ $\mu$ l의 농도로 희석하여 100  $\mu$ l 씩 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고, 무혈청 배지를 넣은 well에 각각 90  $\mu$ l씩 넣었다. 최종

농도가 각각 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 가 되도록 희석한 시료를 10  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 처리한다. 24시간 배양 후 Phosphate Buffered Saline(PBS)를 이용하여 5 mg/ml의 농도로 녹여져 있는 MTT시약을 20  $\mu\text{l}$ 씩 넣어주고 4시간 배양하였다. MTT 시약과 시료가 포함된 배지를 모두 제거하고 각 well에 100  $\mu\text{l}$  acid isopropanol(0.04N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) PGE<sub>2</sub> 생성 저해능 측정

PGE<sub>2</sub> 정량 측정에는 R&D system(KGE004, USA)를 사용하였으며, 측정방법은 제조회사의 설명서를 준용하였다. 실험방법은 다음과 같다.

Raw 264.7 세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지를 이용하여 시료의 최종농도가 각각 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 처리하여 준 후 LPS 100 ng/ml가 되도록 처리하여 주었다. 24시간 후 배지를 회수하여 12000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 회수하여 시험일까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 실험 당일에는 상온에서 측정배지를 녹인 후 calibrator diluent를 사용하여 5배 희석하였다. PGE<sub>2</sub> standard solution을 2500, 1250, 625, 312.5, 156, 39 pg/ml의 농도가 되도록 calibrator diluent를 이용하여 희석하였다. 희석되어진 시료와 standard solution을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고, PGE<sub>2</sub> conjugate와 PGE<sub>2</sub> antibody 용액을 각각 50  $\mu\text{l}$ 씩 넣어준 후 shaker위에서 2시간 반응시켰다. 이후 PGE<sub>2</sub> washing buffer를 이용하여 4-5회 세척하여 주었다. Substrate solution(Color reagent A:B=1:1)을 각 well에 200  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 준 후 빛이 들어 오지 않는 곳에서 30분 동안 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위하여 2N HCl 용액을 각 well 당 50  $\mu\text{l}$ 씩 넣어준 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 PGE<sub>2</sub> 생성 억제제인 indomethacin을 사용하였다. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Indomethacin이 함유된 50  $\mu\text{l}$ 를 시료와 같은 방법으로 처리하여 PGE<sub>2</sub> 생성 저해능을 비교하였다.

### 4) iNOS, COX-2 단백질 발현 저해능 측정

Raw 264.7 세포  $1 \times 10^6$  cells/ml가 들어있는 부유액을 6 well plate에 well당 1 ml씩 접종하고 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 최종농도가 각각 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 되도록 시료를 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS 100 ng/ml를 24시간 처리하였다.

세포를 scraper를 이용하여 회수한 후 12000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후에 상층액을 제거하고, PBS를 이용하여 세척하였다. 세포 lysis buffer를 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어주고 잘 섞어 준 후에 ice에서 30분 동안 세포를 용해시켰다. 세포 용해 후 12000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하고 상층액을 추출하여 Bicinchoninic Acid법(BCA법)을 이용한 단백질 정량을 수행하였다. 단백질 정량 후 well당 35  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel(SDS-PAGE)에서 100V로 1시간동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 PVDF membrane에 단백질을 transfer 한 후에 iNOS, COX-2 1차 antibody를 반응 시키고 2차 antibody를 반응시킨 후 western blot를 시행하여 단백질의 발현정도를 확인하였다. 단백질 보정을 위하여  $\beta$ -actin도 함께 수행하였다.

### 5) TNF- $\alpha$ 생성 저해능 측정

TNF- $\alpha$ 의 측정에는 eBioscience(Cat. 88-7324-22, USA)사의 제품을 사용하였고, 측정방법은 제조회사의 설명서를 준용하였다. 실험방법은 다음과 같다.

Raw 263.7 세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지를 이용하여 시료의 최종농도가 각각 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 처리하여 준 후 LPS 100 ng/ml가 되도록 처리하였다. 24시간 배양 후 배지를 회수하여 12000 rpm, 5 min에서 원심분리하여 상층액을 회수하고 시험일까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 시험일에는 상온에서 측정 배지를 녹인 후 1x assay diluent를 사용하여 50배 희석하였다. 실험 전날 bin plate에 1x coating buffer로 capture antibody를 1/250 희석한 후 100  $\mu\text{l}/\text{well}$ 에 넣어주고  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 이후 washing buffer를 이용하여 5

회 세척한 후 1~2분 정도 washing solution를 넣고 shaking하였으며 이 과정을 5번 반복하였다. 다음 시료를 녹인 1x assay diluent 용액을 200  $\mu$ l/well 넣어주고 실온에서 1시간 반응시킨 후 washing buffer를 사용하여 5회 세척하였다. TNF- $\alpha$  standard solution 100  $\mu$ l/ml를 각 well에 넣고 TNF- $\alpha$  측정할 세포 배양액을 1x assay diluent 용액으로 50~100배 희석하여 100  $\mu$ l/ml 넣어주고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, washing buffer를 사용하여 5회 세척 과정을 반복하였다. Detection antibody를 1x assay diluent 용액으로 1/250 희석하여 100  $\mu$ l/ml 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 세척한 후 Avidin-HRP를 1x assay diluent 용액으로 1/250 희석하여 100  $\mu$ l/ml 넣어주고 실온에서 30분간 반응시킨 후 washing buffer로 세척하였다. 마지막으로 TMB solution을 100  $\mu$ l/ml 넣어주고 실온에서 15분간 반응시킨 후 stop solution을 50  $\mu$ l/ml 넣어주고 405 nm에서 측정하였다.

#### 6) NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동 저해능 측정

6 well plate에 100% EtOH를 이용하여 멸균처리 된 coverglass를 넣고 coverglass위에 Raw 264.7 세포를  $1.5 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 300  $\mu$ l 접종한 후 24시간 배양하였다. 시료를 처리하고 LPS 100  $\mu$ g/ml를 처리하였다. 1시간 후 이용하여 2~3번 세척한 후 100% MEOH을 이용하여 4°C에서 15분 동안 고정하였다. 이후 0.1% triton X-100(in PBS)를 이용하여 15분간 permeabilization하였다. 다시 PBS로 3번 세척하고, 5% BSA(in PBS)로 45분간 blocking 하였다. 1차 antibody(NF- $\kappa$ B, RB-1638-P1)을 1:100으로 1% BSA가 포함되어 있는 PBS에 희석한 후 2시간 동안 반응 시켜주었다. PBS를 이용하여 3번 세척한 후 Cy3가 conjugate되어 있는 2차 antibody(Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L), 111-165-003)을 1:1000으로 1% BSA가 포함되어 있는 PBS에 희석한 후 1시간 동안 37°C, 어두운 곳에서 반응시켜주었다. PBS를 이용하여 3번 세척한 후 1분동안 DAPI(10  $\mu$ g/ml in PBS) staining을 하였다. PBS를 이용하여 3번 세

척한 후 coverglass에 Mounting medium을 떨구고 coverglass를 slideglass에 고정시킨 후 관찰하였다.

### 5. 統計處理

실험 성적은 mean 또는 mean  $\pm$  SD로 나타내었다. 통계적 유의성은 one-way ANOVA에 의하여 검정하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 유의성을 인정하였고, 유의성이 나타날 경우 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

## III. 成績

### 1. NO 생성 저해능

Raw 264.7 세포를 이용하여 土茯苓을 각각 20, 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도로 처리했을 때 염증 유발 내독소인 LPS에 의해 유도된 NO 생성량을 Griess 시약을 이용하여 측정하였으며, 양성대조군으로서 NO 생성 저해제로 알려진 L-NMMA를 사용하여 비교하였다.

土茯苓이 각각 20, 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 12.2%, 38.2%, 59.6%의 NO 생성을 저해하는 것으로 조사되었으며, 土茯苓의  $IC_{50}$ 은 73.1  $\mu$ g/ml로 우수한 NO 생성 저해능을 확인할 수 있었다(Table 1).

Table 1. The Inhibitory Effect of SGR and L-NMMA on NO Production of Raw 264.7 Cells

	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Inhibitory Effect of NO Production (%)	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)
L-NMMA	0.5	-	
	1	10.8	
	5	39.8	6.96
	10	58.3	
	20	73.5	
SGR	20	12.2 $\pm$ 16.2*	
	50	38.2 $\pm$ 11.0*	73.1
	100	59.6 $\pm$ 5.9*	

The results are expressed as mean or mean  $\pm$  SD. Statistically significant value compared with other group by ANOVA test and Duncan's method(\*  $P < 0.05$ )

2. 세포독성

土茯苓이 각각 20, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 Raw 264.7 세포의 cell viability를 MTT assay를 통하여 측정하였다. 실험결과 土茯苓의 각각 20, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 cell viability가 각각 103.6%, 101.7%, 99.0%로 나타나 土茯苓은 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다(Table 2).

Table 2. The Effect of SGR on the Viability of Raw 264.7 Cells

SGR ( $\mu\text{g/ml}$ )	20	50	100
Cell Viability (% of control)	103.6 $\pm$ 2.6	101.7 $\pm$ 0.9	99.0 $\pm$ 0.0

The results are presented as mean  $\pm$  S.D.

3. PGE<sub>2</sub> 생성 저해능

염증성 cytokine 중의 하나인 PGE<sub>2</sub>에 대한 土茯苓의 생성 저해능을 R&D system의 KGE004 kit을 사용하여 측정하였으며, 양성 대조군으로서 PGE<sub>2</sub> 생성 억제제인 indomethacin을 사용하였다.

土茯苓의 농도가 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 24.2%, 42.1%의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제능을 확인하였다. 20  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 PGE<sub>2</sub> standard를 사용하여 계산한 추세선보다 낮은 값을 보여 측정값을 버렸다(Table 3.). 이를 통하여 土茯苓은 PGE<sub>2</sub> 생성 저해능을 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

Table 3. The Inhibitory Effect of SGR and Indomethacin on PGE<sub>2</sub> Production of Raw 264.7 Cells

	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibitory Effect of PGE <sub>2</sub> Production (%)
Indomethacin	1	95.02 $\pm$ 2.67
SGR	20	-
	50	24.2 $\pm$ 1.4*
	100	42.1 $\pm$ 5.3*

The results are expressed as mean  $\pm$  SD.

Statistically significant value compared with other group by ANOVA test and Duncan's method(\* P<0.05)

4. iNOS, COX-2 단백질 발현 저해능

NO 및 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증인자의 생성과 관련된 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 土茯苓이 저해하는지를 알아보기 위하여 western blotting analysis한 결과 土茯苓을 처리한 실험군에서 iNOS 단백질의 발현이 감소하여 土茯苓이 iNOS 단백질의 발현을 저해하는 것을 확인할 수 있었으나 저해능과 토복령농도와의 관계는 확인할 수 없었다(Fig. 1). iNOS 단백질 발현 결과와는 달리 COX-2 단백질의 발현은 감소되지 않아 土茯苓의 COX-2 발현 저해능을 확인할 수 없었다(Fig. 2).

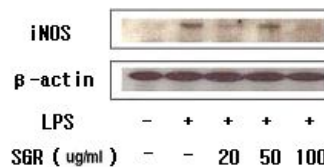


Fig. 1. The Effect of SGR on the Induction of iNOS by LPS.

The level of iNOS protein was monitored 18 hr after treatment of cells with LPS (100 ng/ml) with or without SGR pretreatment (i.e. 1h before LPS).

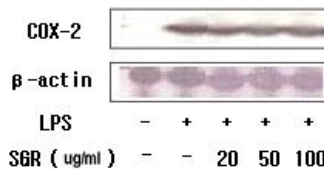


Fig. 2. The Effect of SGR on the Induction of COX-2 by LPS.

The level of COX-2 protein was monitored 18 hr after treatment of cells with LPS (100 ng/ml) with or without SGR pretreatment (i.e. 1h before LPS).

5. TNF- $\alpha$  생성 저해능

염증의 중요한 매개인자인 TNF- $\alpha$ 에 관한 土茯苓의 생성 억제능을 eBioscience의 Cat. 88-7324-22 kit을 사용하여 실험한 결과, 土茯苓이 각각 20, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TNF- $\alpha$  생성 저해능이 각각 0.1%, 2.7%, 0.4%으로 나타나 TNF- $\alpha$ 의 생성 저해능은 확인할 수 없었다(Table 4).

Table 4. The Inhibitory Effect of SGR on LPS-inducible TNF- $\alpha$  Production

	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibitory Effect of TNF- $\alpha$ Production (%)
SGR	20 $\mu\text{g/ml}$	0.1 $\pm$ 3.3*
	50 $\mu\text{g/ml}$	2.7 $\pm$ 0.8*
	100 $\mu\text{g/ml}$	0.4 $\pm$ 1.1*

Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

Statistically significant value compared with other group by ANOVA test and Duncan's method(\* P<0.05)

#### 6. NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동 저해능

NF- $\kappa$ B는 p50, p65등의 subunit을 가지고 있는데 이중 염증반응과 관련 있는 것은 p65이므로 p65의 핵내 이동을 immunofluorescence assay를 통하여 관찰한 결과 LPS로 유발된 NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동을 토茯苓이 어느 정도 차단시켜주는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

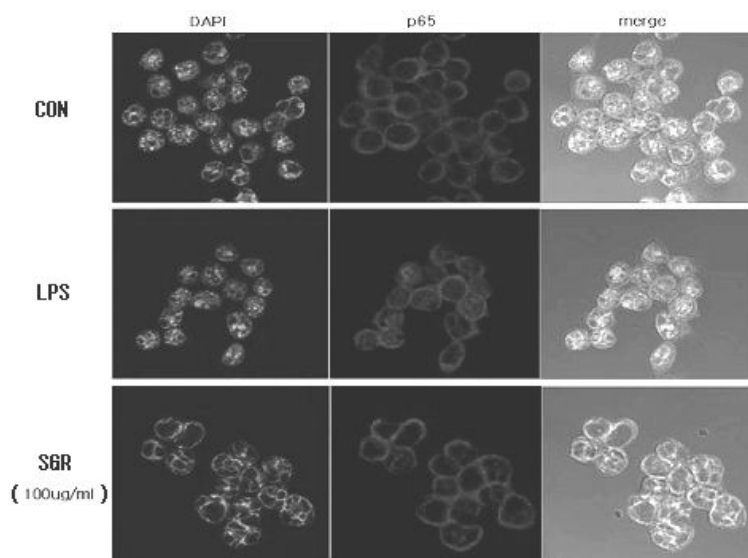


Fig. 3. The Effect of SGR on LPS-induced NF- $\kappa$ B

Inhibition of NF- $\kappa$ B determined by immunofluorescence

#### IV. 考 察

당뇨병은 한의학에서는 消穀善肌하면서 渴而多飲하는 病症인 消渴의 범주에 속한다. 原因은 대부분이 熱邪로서 過食이나 膏粱珍味の 攝取가 지나치므로 濕熱이 内生하거나, 憂思 등으로 脾胃에 積熱이 發하거나, 易怒가 지나치게 過極하거나 嗜酒 등으로 肝火가 鬱結되었거나, 腎水의 損傷으로 陰虛하여 燥熱등이 發해, 陽火亢盛 相火熾盛 水火不

交 臟腑不和 등으로 유발되는 것이다<sup>10</sup>.

iNOS, COX-2와 같은 cytokine과 NO는 제1형 당뇨병과 밀접한 관계가 있다. 제1형 당뇨병 발병률이 높은 집단의 역학 조사에 따르면, 많은 식이 nitrites 섭취가 diabetogenic nitrosoamine 합성을 활성화시키고 NO 생성을 촉진시켜 인슐린 분비 세포를 손상시킨다고 보고하였다<sup>11,12</sup>. NO 뿐만 아니라 IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증을 매개하는 cytokine도 자가면역성 췌도염(autoimmune insulinitis)의 초기 단계에서 대식세포와 T림파구로

부터 분비되어 인슐린 분비 세포 손상을 매개한다<sup>7,8</sup>. 이들 cytokine은 사립체의 aconitase 활성 저하와 함께 nicotinic adenine dinucleotide를 고갈시켜 ATP 생성을 감소시킴으로써 인슐린 분비를 억제하고<sup>13</sup>, 인슐린 유전자 발현과 인슐린 생합성을 억제시켜 제1형 당뇨병의 특징적인 insulinopenia를 유발시킨다<sup>14</sup>. 이와 같이 제1형 당뇨병의 중요한 매개인자인 cytokine에 대한 土茯苓의 효과를 알아보기 위하여 LPS를 처리한 Raw 264.7 세포를 사용하여 土茯苓의 항염효능을 조사해 보았다.

NO는 일반적으로 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>15,16</sup>. 당뇨병과 NO의 관계를 살펴보면, NO는 매우 불안정 하여 쉽게 nitrite와 nitrate로 전환되는데 이들이 산소와 만나면 peroxynitrite를 형성하여 인슐린 분비 세포를 손상시킨다<sup>17</sup>. 본 실험에서 土茯苓의 NO 생성 저해능을 조사해 본 결과 土茯苓 100 $\mu$ g/ml에서 59.6%의 우수한 NO 생성 저해능을 확인할 수 있었다.

土茯苓이 NO의 생성을 감소시킨 것이 土茯苓의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 확인하기 위하여 土茯苓의 농도에 따른 cell viability를 MTT assay 방법을 사용하여 실험한 결과 土茯苓은 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성이 없음을 알 수 있었다. 즉 土茯苓에 의한 우수한 NO 생성 저해능은 土茯苓의 세포독성 때문에 발생한 것이 아니란 것을 확인할 수 있었다.

PGE<sub>2</sub>는 염증 반응에 있어서 중추적인 역할을 한다. 외부자극에 의해 COX-2가 발현되면 PGE<sub>2</sub>가 활성화되는데, PGE<sub>2</sub>는 혈관을 확장시켜 각종 면역물질 및 cytokine을 염증부위에 빨리 도달하게 할 뿐만 아니라<sup>18</sup>, 혈전용해 기능이 있어 염증반응 중 파괴된 세포내 물질들에 의하여 혈전이 생기는 것을 막는다<sup>19</sup>. 이외에도 기관지 확장 기능, 위산억

제 기능 등을 가지고 있다<sup>20</sup>. 土茯苓의 PGE<sub>2</sub> 생성 저해능은 土茯苓 100 $\mu$ g/ml에서 42.1%로 PGE<sub>2</sub>의 생성 저해능을 확인할 수 있었다.

iNOS는 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 장시간 다량의 NO를 생산하는 것으로 알려져 있다<sup>21,22</sup>. 한편 COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandin synthesis로 변환시켜주어 PGE<sub>2</sub>의 생성을 증가시킨다. 土茯苓의 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 저해능을 western blotting analysis를 통하여 조사해 보았더니, 土茯苓은 iNOS 단백질의 발현을 억제하는 효능이 있었다. 반면 COX-2 단백질의 경우, 土茯苓이 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해하는 효능이 있어 COX-2 단백질의 발현 또한 저해할 것이라 추측과 달리 土茯苓은 COX-2 단백질 발현을 억제하는 효능을 확인할 수 없었다. 이는 土茯苓이 발현된 COX-2 단백질에 의해 생성되는 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제시켜주는 효능에 의한 결과일 수도 있지만, 실험방법상에 의한 차이일 수도 있다고 생각된다. PGE<sub>2</sub> 생성 측정은 주로 ELISA 방법을 이용하여 측정하고 COX-2 단백질 발현 저해능 측정은 western blotting analysis를 사용하기 때문에 측정방법의 민감도에 차이가 있어 이와 같은 결과가 나타난 것 일 수도 있다고 사려 된다.

TNF- $\alpha$ 는 LPS나 bacterial toxin 등과 같은 외부 자극에 대식세포가 일단 활성화 되면 생산되어 NF- $\kappa$ B를 핵내로 이동시키는 역할을 한다. 활성화 과정에서 대식세포는 초기에는 IFN- $\gamma$ , CD40 등 외부에서 유래되는 cytokine에 의해서만 활성화되어 TNF- $\alpha$  등의 cytokine을 생산한다. 하지만, 대식세포 스스로도 TNF-receptor를 보유하고 있기 때문에 대식세포가 1차적으로 활성화되어 소량의 TNF- $\alpha$ 가 생산되고, 생산된 TNF- $\alpha$ 는 대식세포의 표면에 있는 TNF-receptor와 재반응하는 과정을 되풀이함으로써 대량의 TNF- $\alpha$ 를 분비하기 때문에, TNF- $\alpha$ 의 함량은 대식세포의 활성화를 판단하

는 중요한 지표가 된다<sup>23</sup>. 본 실험에서 TNF- $\alpha$ 에 관한 土茯苓의 생성 억제능을 eBioscience의 Cat. 88-7324-22 kit을 사용하여 조사해본 결과 土茯苓은 TNF- $\alpha$ 의 생성 저해능을 확인할 수 없었다.

NF- $\kappa$ B는 자극이 없는 상태에서는 세포질에서 억제 단백질인 I- $\kappa$ B와 비활성화 상태로 존재한다<sup>24</sup>. LPS, IL-1 등에 의해서 자극을 받거나 TNF- $\alpha$ 가 TNF-receptor에 결합하면 I- $\kappa$ B가 인산화되고 ubiquitination되어 분해됨으로써 NF- $\kappa$ B와의 결합은 해리된다. 따라서 활성화된 NF- $\kappa$ B는 핵으로 전위되어 iNOS 및 COX-2와 같은 다양한 유전자의 promoter에 결합하여 이들 유전자의 전사를 촉진한다<sup>25,26</sup>. 土茯苓의 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동 저해능을 immuofluescence assay를 통하여 조사해 본 결과, 土茯苓은 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동을 어느 정도 차단시켜주는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 土茯苓은 TNF- $\alpha$  이외의 자극, 즉 LPS 등에 영향을 주어 NF- $\kappa$ B를 핵내로 이동을 차단하므로써 iNOS 단백질을 발현하지 못하게 한 결과 NO 생성을 억제한다고 추론할 수 있으므로 土茯苓이 제1형 당뇨병에 응용될 수 있을 것으로 사료된다. 다만, 본 실험에서 土茯苓이 PGE<sub>2</sub>의 생성을 저해하지만 COX-2 단백질 발현은 저해하지 못한 것은 실험 방법상의 차이 아니면 western blotting analysis의 민감도에 의한 오차일 수도 있어, 향후 이에 대한 보다 더 정밀한 연구가 필요하다고 생각된다.

## V. 結 論

土茯苓의 항염 효과를 확인하기 위하여, LPS로 유도된 macrophage Raw 264.7 cell을 대상으로 土茯苓 농도에 따른 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ 의 생성 저해능을 측정하고, NF- $\kappa$ B의 핵내 이동 저해 여부를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 土茯苓은 NO 생성을 저해하는 우수한 효능을 가지고 있다.
2. 土茯苓은 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해하는 효능을 가지고 있다.
3. 土茯苓은 iNOS 단백질의 발현을 저해하는 효능을 가지고 있다.
4. 土茯苓의 COX-2 단백질의 발현을 저해하는 효능을 확인할 수 없었다.
5. 土茯苓의 TNF- $\alpha$  생성을 저해하는 효능을 확인할 수 없었다.
6. 土茯苓은 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동을 차단시키는 효능이 있다.

이상의 실험 결과에서 土茯苓은 제1형 당뇨병의 매개 물질인 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS 생성을 저해하고, NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동을 차단하므로써 제1형 당뇨병 환자의 증상 회복과 예방에 유의한 효과가 있을 것으로 사료되며, 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 參 考 文 獻

1. 안덕균, 이상인, 노승현, 최호영, 김선희 등. 본초학. 서울: 영림사; 1998, p. 211.
2. 이시진. 본초강목. 서울: 일중사; 1992, p. 156.
3. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울: 정담; 1998, p. 4429.
4. 박종희, 김정묘, 도원임. 토복령의 생약학적 연구. 생약학회지. 2002;33(3):169-72.
5. Kim SW, Son KH, Chung KC. Mutagenic effect of steroidal saponins from Smilax china rhizomes. Yakhak Hoeji. 1989;33:285-9.
6. Baek SH, Kim SH, Son KH, Chung KC, Chang HW. Inactivation of human pleural fluid phospholipase A<sub>2</sub> by dioscin. Arch. Pharm. Res. 1994;17:218-22.
7. 오승규, 박종오, 남궁욱, 강탁림, 김동희. 토복령이 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 로 유발된 Inflammatory



- cytokines의 발현 및 생성에 미치는 영향. 대한 본초학회지. 2003;18(1):49-64.
8. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death-the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44:2115-33.
  9. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. 1998;55:1139-49.
  10. 두호경. 동의신계학. 서울: 동의의학연구원; 1991. p. 939.
  11. Kostraba JN, Gay EC, Rexers M, Hamman RF. Nitrite levels in community drinking waters and risk of IDDM. *Diabetes Care*. 1992;15:1505-8.
  12. Virtanen SM, Jaakkola L, Räsänen L, Ylönen K, Are A et al. The childhood diabetes in Finland study group: Nitrate and nitrite intake and the risk for type 1 diabetes in finnish children. *Diabetic Medicine* 1994;11:656-62.
  13. Sandler S, Eizirk DL, Svensson C, Strandell E, Welsh M et al. Biochemical and molecular actions of interleukin-1 on pancreatic beta-cells. *Autoimmunity*. 1991;10:241-253.
  14. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG et al. 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;35:21-28.
  15. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in Raw 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69:625-35.
  16. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO et al. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in Raw 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2001;76:119-23.
  17. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 1994;63:175-95.
  18. Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Rood Chem Toxicol*. 2002;40(8):1091-7.
  19. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS et al. Molecular mechanism underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*. 2001;480-481:243-68.
  20. 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 phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology*. 2003;139:11-20.
  21. Kaxamoto 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.
  22. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*. 2000;406:301-9.
  23. 조진희, 성락술, 이영중. 槲皮와 橡木皮 추출물이 대식세포 Raw 264.7 활성화에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2006;21(1):89-100.
  24. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity.

- Annu Rev Immunol 2000;18:621-63.
25. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. Cell. 1995;80:529-32.
26. Hellerbrand C, Jobin C, Licato LL, Sartor RB,

Brenner DA. Cytokines induce NF- $\kappa$ B in activated but not quiescent rat hepatic stellate cells. Am J Physiol 1998;275:G269-G278.