

부蓮草 추출물의 항염증 효과

조희창^{1)*} · 정호준¹⁾ · 김상찬²⁾ · 지선영¹⁾
대구한의대학교 안이비인후피부과교실¹⁾, 한의과대학²⁾

Anti-inflammatory effects of the water extract of Ecliptae Herba

Hee-Chang Jo · Ho-Jun Jung · Sang-Chan Kim · Seon-Young Jee

Objective : The present study was examined to evaluate the effects of Ecliptae Herba on the production of inflammatory mediators in vivo and in vitro.

Methods : In cell viability, all three doses of Ecliptae Herba extract (25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) had no significant cytotoxicity during the experimental period. The increases of NO production and iNOS expression were detected in LPS-activated cells compared to control, but these increases were dose-dependently attenuated by pre-treatment with Ecliptae Herba extract.

- Results :**
1. LPS plays a pivotal roles in inducing to the massive production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 in macrophages.
 2. Ecliptae Herba extract reduced the elevated production of cytokines by LPS.
 3. Ecliptae Herba extract reduced PGE₂ levels in a dose-dependent manner as a consequence of inhibition of COX-2 activity.
 4. Ecliptae Herba extract significantly reduced the nuclear translocation of NF- κ B induced by LPS.
 5. In histopathological study, Ecliptae Herba effectively inhibited the increases of hind paw edema, skin thicknesses and inflammatory cell infiltrations induced by carrageenan treatment.

Conclusions : These results provide evidences that therapeutic effect of Ecliptae Herba on the acute inflammation is partly due to the reduction of some of inflammatory factors by inhibiting iNOS and COX-2 through the suppression of NF- κ B.

Key words : *Ecliptae Herba*, Anti-inflammaory effects, NO, PGE₂, iNOS, COX-2, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6

교신저자 : 지선영, 대구 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속 대
구한방병원 안이비인후피부과교실 (Tel : 053-770-2130,
E-mail : jeesy@dhu.ac.kr)

• 접수 2010/07/08 • 수정 2010/07/26 • 채택 2010/08/03

I. 서 론

旱蓮草는 국화과 (Compositae)에 속한 일년생 초본인 한련초 (*Eclipta prostrata* L)의 전초를 건조한 것으로, 氣味는 凉甘酸하며, 주로 肝腎經에 入하며, 凉血 止血 補腎 益陰의 효능으로, 吐血 咯血, 鼻出血, 尿血, 血便, 血痢, 刀傷出血, 鬚髮早白, 디프테리아, 淋濁, 帶下, 陰部濕痒을 치료한다^{1,2)}.

한련초에 대한 연구로는 장³⁾의 모발염색성연구, 문 등⁴⁾의 한련초로부터 정제한 다당체 (EAP)가 alloxan유발 당뇨병에 대하여 혈당감소가 있음을 보고한 연구, 윤 등⁵⁾의 고혈압의 주요소인 Angiotensin Converting Enzyme에 대한 저해활성연구, 천 등⁶⁾의 *Colletotrichum crassipes*에 대한 항균활성연구, 정 등⁷⁾의 한련초약침의 족삼리 (ST36)자침에 의한 항암효과에 대한 연구, 이 등⁸⁾의 GABA_A receptor에 의한 Cl-channel활성화 연구 등이 보고되고 있으나, 한련초의 염증조절에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 한련초 추출물의 항염증작용을 평가하고자 실시하였다.

대식세포는 염증 반응시 다양한 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있으며^{9,10)}, 대식세포가 이물질에 대응할 때 분비되는 interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 nitric oxide (NO)는 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁻³⁾.

Lipopolysaccharide (LPS)는 인지질, 다당류 및 소량의 단백질로 구성되며, 염증반응을 유발하는 유력한 인자로, 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증반응을 연구하는 경우 빈용하는 실험모델¹⁴⁾로 확립되어 있다.

Carrageenan으로 유도한 급성 발부종 모델은, carrageenan이 염증세포의 침윤을 동반한 급성부종을 초래하므로, 현재 여러 가지 항염증 물질의

급성 염증에 대한 효력평가에 널리 이용되고 있다¹⁵⁻⁷⁾. 흰쥐의 뒷발에 carrageenan을 주입하면 발체적이 증가하며, 조직학적으로 투여부위에 국소적인 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 부종이 관찰되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²¹⁾.

이에 저자는 한련초 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 cytokine에 미치는 영향 및 이러한 염증매개물질의 발현에 핵심적 역할을 하는 NF- κ B의 변화를 살펴보고 또한 한련초 추출물이 in vivo에서 염증성병변을 억제할 수 있는지를 평가하고자 본 연구를 실시하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 旱蓮草 추출물의 제조

한련초 (EH)는 대원약업사 (대구, 한국)에서 구입하여 관능평가를 한 후, 200 g을 MeOH 1 L에 넣고 72시간 추출한 후 추출물을 거여드로 1차 여과하고 3000 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고, 이 농축액을 Ultra-Low temperature freezer (Nihon freezer, Japan)에 12시간 동안 넣어 동결시켰다. 동결된 추출물을 동결 건조기 (Labconco, USA)로 동결건조하여 한련초 추출물 5.68 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 한련초 추출물의 수율은 2.84 %였으며 in vitro처치시에는 DMSO에 녹여 사용하였으며, in vivo실험에서는 PEG에 녹여 사용하였다.

2. 시약

LPS (*Escherichia coli* 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis,

MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Cayman (Ann Arbor, Mi, USA), Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. PGE2 assay kit와 COX-2 activity assay kit는 각각 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)와 Cayman chemical사 (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입한 assay kit를 사용하여 분석하였다.

3. 세포 배양

한국세포주연구재단 (Seoul, Korea)에서 구입한 Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cell을 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well로 분주한 다음 한련초 추출물 (EH)을 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 25, 50, 100 μ g/ml의 농도로 EH를 전처리 한 후에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml)를 50 μ l넣고 4시간 배양한 후 배지를 조심스럽게 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic

ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [viability (% control) = 100 \times (absorbance of treated sample)/ (absorbance of control)].

5. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂-의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉, 세포배양 상등액 50 μ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ l를 96 well plates에 혼합하고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다.

6. Immunoblot analysis

처리후 수거된 cell을 lysis buffer (20 mM Tris Cl (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 phenylmethylsulfonylfluoride, 1 mg/ml leupeptin을 함유)를 사용하여 cell을 lysis시켰다. 이를 10,000 \times g로 10분간 원심 분리하여 殘渣를 제거하고 cell lysates를 얻었다. iNOS의 발현은 antimouse iNOS antibodies를 사용하여 면역화학 적 방법으로 분석하였으며, anti p-I κ B α antibody를 사용하여 p-I κ B α protein을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit을 사용하였다. iNOS와 I- κ B α protein의 band는 ECL western blotting

detection reagents (Amersham)를 사용하여 발색하였다. 발색 후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 densitometric analysis를 실시하였다.

7. Nuclear fraction의 준비

핵분획은 Cho등의²²⁾ 방법에 따라 제조하였다. 즉, 처치된 세포를 PBS로 세척한 후 수거하여 2 ml EP tube에 담고, 4°C에서 3,000×g로 3분간 원심 분리하여 PBS를 제거하였다. 세포에 buffer를 [10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유] 100 µl 넣어 vortex하고 10분간 얼음 위에서 배양 후 4°C에서 7,600×g로 6분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 침전물에 buffer를 [20 mM Hepes (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유] 50 µl 넣은 후 현탁시키고, 얼음 위에서 1시간 배양하였다. 배양 후 4°C에서 15,000×g로 10분간 원심분리하여 핵분획인 상층액을 얻었다.

8. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6 well plate에 cells (5×10⁵/ ml)을 분주하고 EH를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치 후 각 cytokine마다 특정 시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 바로 측정하거나, 측정전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

9. COX-2의 활성측정

COX-2 activity는 Cayman chemical사 (MI, USA)의 assay kit를 사용하여 분석하였다. 먼저, 1 mM EDTA를 함유하는 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8)를 사용하여 3초간 sonification한 다음, 4°C, 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액으로부터 cell lysate를 얻고 BCA법 (Endogen, USA)으로 단백질을 정량하여 100 µg/40 µL의 농도로 준비하였다. 준비된 cell lysate에 COX-1의 activity를 배제하기 위하여 COX-1의 specific inhibitor인 SC-560을 처리하고 상온에서 5분간 incubation한 후, colorimetric substrate (TMPD)와 arachidonic acid를 첨가하여 25°C에서 5분간 incubation하였다. COX-2 activity는 595 nm에서 흡광도를 측정하여 nmol/min/ml (U/ml)으로 나타내었다.

10. 실험동물 및 처리

실험동물은 4주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 Samtaco Bio Korea (오산, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험은 기염제인 carrageenan (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA; 100 µl/rat)만을 피하주사한 군을 carrageenan군으로 하였으며, carrageenan으로 염증을 유발하고 dexamethasone (1 mg/kg, P.O)을 투여한 dexamethasone군, 0.1 g/kg의 한련초를 전투여하고 carrageenan을 주사한 0.1 g/kg EH군, 0.3 g/kg의 한련초를 전투여하고 carrageenan을 주사한 0.3 g/kg EH군으로 나누었으며, 각 군당 n수는 6마리로 하였다. dexamethasone과 EH는 4일 동안 매일 1회 투여하였으며, 마지막 약물투여 1시간 후 carrageenan을 100 µl/rat로 rat의 오른쪽 발바닥에 주입하였다.

11. Paw edema의 유도 및 측정

4일째 약물을 투여하고 1시간 후 carrageenan을 투여하여 paw edema를 유발시켰다. Paw edema의 측정은 carrageenan을 주입한 후 시간별로 (0, 1, 2, 3, 4시간) 부종측정기 (Plethysmometer, LE 7500; LETICA Scientific Instruments, Spain)를 이용하여 부종 정도를 측정하였다.

12. 조직처리

EH가 paw edema에 미치는 영향을 살펴보기 위해, carrageenan으로 염증이 유발된 rat의 오른 쪽 하지의 발목아래를 절단하여 조직을 채취하여, 발등 및 발바닥의 피부 실질조직을 분리하여 10% 중성포르말린에 6시간 이상 고정시킨 다음 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μ m의 longitudinal 절편을 제작하여 Hematoxylin-eosin 염색을 실시하고, 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 관찰하였다.

13. 조직학적 평가

Kim et al²³⁾의 방법을 변형시켜, 발등 및 발바닥 피부의 두께를 mm 단위로 40배 현미경 시야에서 자동영상분석장치 (DMI-300 Image Processing; DMI, Korea)를 이용하여 측정하였으며, 1 mm²의 발등 및 발바닥 피부에 침윤된 염증세포의 수 역시 자동영상분석장치를 이용하여, 200배 현미경 시야에서 측정하였다.

14. 통계적 검증

실험 결과는 mean \pm S.D.로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

III. 결 과

1. EH가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO에 미치는 영향

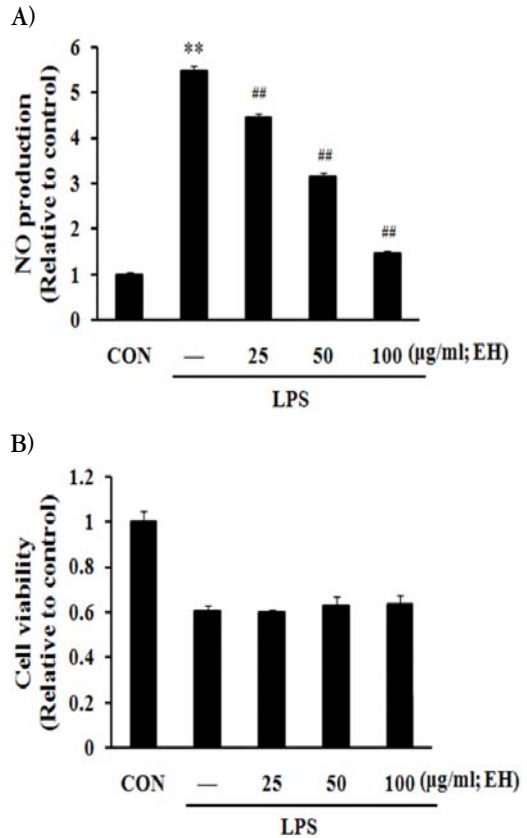


Fig. 1. Effects of EH on the production of NO by LPS.

Raw 264.7 cells were treated with 25, 50 and 100 μ g/ml of EH dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 μ g/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored (A), cell viability was measured by MTT assay (B) as described in the materials and methods section. 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. EH가 LPS로 유도된 Raw cell의 cytokine에 미치는 영향

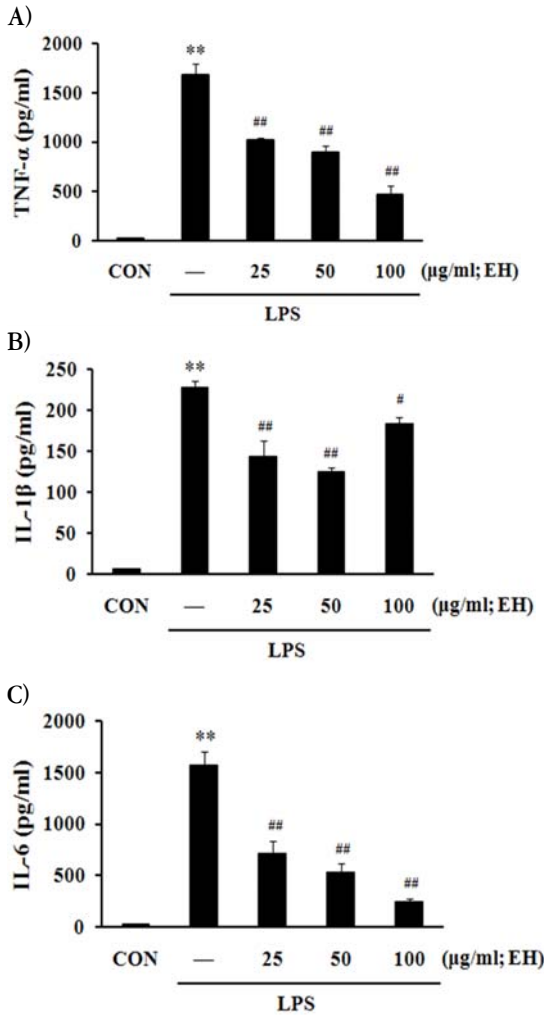


Fig. 2. The effect of EH on LPS-stimulated cytokine production.

Production of cytokines was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of EH for 6 h in TNF-α (A), IL-1β (B) and IL-6 (C). The amount of cytokine was measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Newman - Keuls test.

(*, significant as compared to control, **P < 0.01; #, significant as compared to LPS alone, #P < 0.05, ##P < 0.01)

3. EH가 LPS로 유도된 Raw cell의 PGE2에 미치는 영향

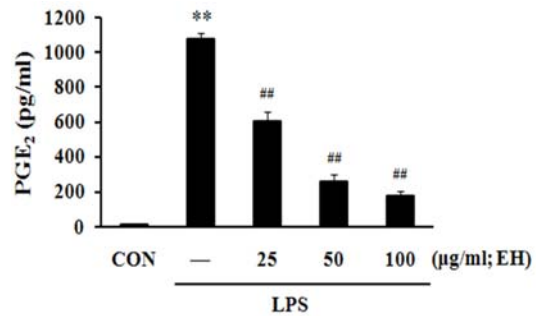
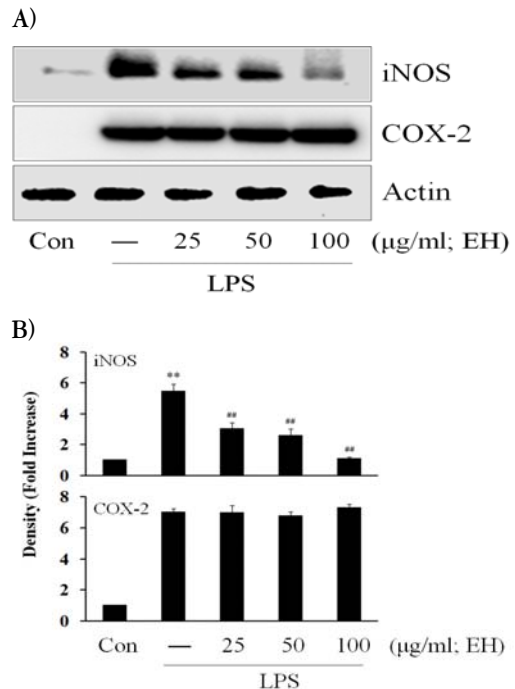


Fig. 3. Inhibition of LPS-activated PGE2 production by EH.

RAW264.7 cells were cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of EH for 24 h to determine the level of PGE2. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE2. The data represent the mean ± SD of three separate experiments. (*: significant compared with the control, **P < 0.01, #: significant compared with the LPS alone, ##P < 0.01) PGE2, prostaglandin E2.

4. EH가 LPS로 유도된 Raw cell의 염증매개 단백질에 미치는 영향



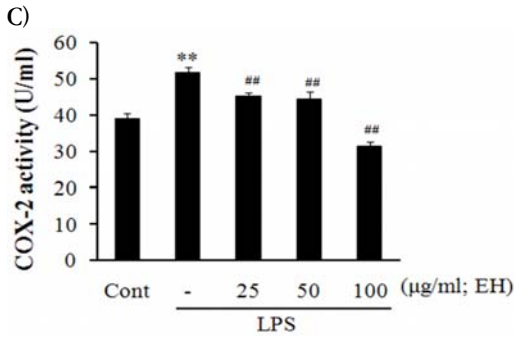


Fig. 4. Effect of EH on the induction of iNOS and COX-2 by LPS.

The levels of iNOS and COX-2 protein were monitored 24h after treatment of cells with LPS (1 µg/ml) with or without EH pretreatment (i.e. 1h before LPS). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblot analysis using specific antibodies. The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B). COX-2 enzyme activity was determined by measuring the oxidation of TMPD caused by peroxidase activity of COX as described in methods (C). The data represent the mean ± SD of three separate experiments.

(*: significant compared with the control, **P<0.01, #: significant compared with the LPS alone, ##P<0.01)

5. EH가 LPS로 유도된 Raw cell의 NF-κB 발현에 미치는 영향

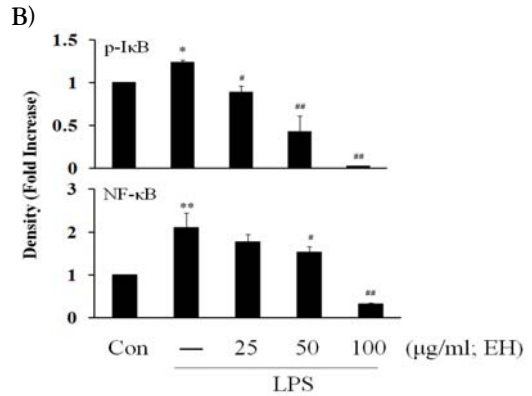
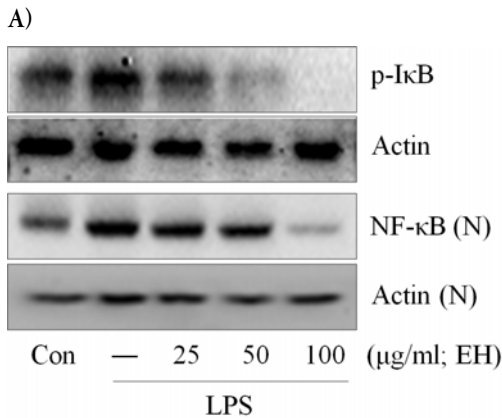


Fig. 5. Effects of EH on the expression of p-IκBα and NF-κB by LPS.

The level of p-IκBα and NF-κB protein were monitored 15min and 60 min after treatment of cells with LPS (1 µg/ml) with or without EH pretreatment, respectively (i.e. 1h before LPS). The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B).

(*: significant as compared to control, **P<0.01; #: significant as compared to LPS alone, ##P<0.01) N; nuclear fraction.

6. EH가 carrageenan으로 유도된 Rat의 발부종에 미치는 영향

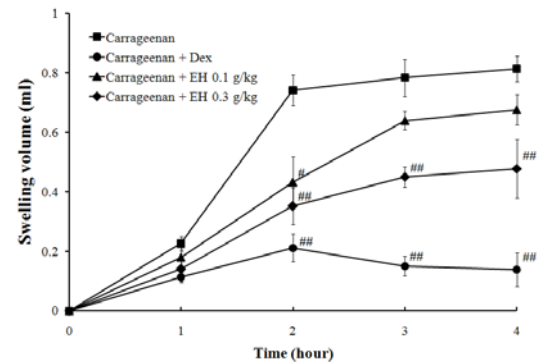


Fig. 6. Inhibition of carrageenan-induced paw edema by EH.

EH was administered to rats at an oral dose of 0.1, 0.3 g/kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw.

The swelling of the paw was measured 1~4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean±S.D. of six animals.

P<0.01, significant compared with carrageenan alone.

7. EH가 carrageenan으로 유도된 Rat의 paw의 조직 변화에 미치는 영향

Carrageenan의 국소적용은 염증세포 침윤을 동반한 급성부종을 초래하므로, 현재 여러 가지 항염 물질의 급성 염증에 대한 효력평가에 가장 널리 이용되고 있는 동물 모델 중 하나로¹⁵⁻⁷⁾, 조직학적으로 투여부위에 국소적인 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 부종이 관찰되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

Carrageenan으로 유도된 발부종의 조직학적 평가를 위하여 4시간째의 발부종 측정을 끝내고 실험동물을 희생하여 부종발의 발등 부분과 발바닥 부분에서 피부두께 및 침윤 염증세포를 측정하였다.

본 실험의 결과, 발등피부의 두께는 carrageenan 군이 1.88 ± 0.13 mm였으며, dexamethasone 처치군에서는 0.80 ± 0.07 로 유의하게 감소하였으며, EH 0.1 g/kg를 처치한 실험군에서는 1.86 ± 0.12 로 유의한 변화를 나타내지 않았으나, EH 0.3 g/kg를 처치한 실험군에서는 1.12 ± 0.18 로 유의한 감소를 유도하였다.

발바닥 부위의 피부두께에 있어서도 carrageenan 군은 2.23 ± 0.30 mm으로 유의성 있게 증가하였으며, dexamethasone군에서는 0.79 ± 0.10 으로 유의성있게 감소하였다. EH 0.1 g/kg 처치군은 2.10 ± 0.06 으로 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의성은 없었으며, EH 0.3 g/kg를 투여한 군에서는 1.36 ± 0.17 (mm)으로 유의성 있게 감소하였다.

부종 발의 발등 조직에서 침윤 염증세포의 수는 carrageenan군에서 57.20 ± 8.59 cells/mm²로 유의성있게 증가하였다. 그러나, 이러한 염증세포의 증가는 dexamethasone 및 EH 0.1, 0.3 g/kg의 처치에 의해 11.40 ± 3.36 , 42.40 ± 5.77 , 32.40 ± 5.81 (cells/mm²)을 나타내어 유의하게 감소되었다.

Table. 1. Changes on the Histomorphometrical Analysis of Hind Paw Skins in the Present Study.

Groups	Dorsum pedis skin	
	Thickness (epidermis to dermis; mm)	Infiltrated inflammatory cells (cells/mm ² of cutaneous regions)
Carrageenan	1.88 ± 0.13	57.20 ± 8.59
Dexamethasone	$0.80 \pm 0.07^{**}$	$11.40 \pm 3.36^{**}$
EH 0.1	1.86 ± 0.12	$42.40 \pm 5.77^{**}$
EH 0.3	$1.12 \pm 0.18^{**}$	$32.40 \pm 5.81^{**}$
Groups	Ventrum pedis skin	
	Thickness (mm)	Infiltrated inflammatory cells (cells/mm ² of cutaneous regions)
Carrageenan	2.23 ± 0.30	1061.00 ± 166.18
Dexamethasone	$0.79 \pm 0.10^{**}$	$63.40 \pm 17.50^{**}$
EH 0.1	2.10 ± 0.06	$750.00 \pm 62.11^{**}$
EH 0.3	$1.36 \pm 0.17^{**}$	$208.20 \pm 15.20^{**}$

Values are expressed as mean ± SD of 5 histological fields

**p<0.01 compared to carrageenan control.

부종 발의 발바닥 조직에서의 침윤염증세포는 carrageenan군에서 $1061.00 \pm 166.18 \text{ cells/mm}^2$ 로 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 염증세포의 침윤은 발 등 조직에서와 마찬가지로 dexamethasone 및 EH 0.1, 0.3 g/kg의 처치에 의해 63.40 ± 17.50 , 750.00 ± 62.11 , 208.20 ± 15.20 (cells/mm^2)로 유의하게 염증세포의 침윤을 억제하였다(Table 1).

IV. 고 찰

본 연구는 旱蓮草의 항염증효과를 평가하기 위하여 in vitro로 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 염증매개물질 억제효과, in vivo로 carrageenan으로 유도된 rat의 paw edema에서 부종 및 염증세포침윤억제 효과등을 평가하였다.

한련초의 효능은 涼血 止血 補腎 益陰하며, 吐血 咯血, 鼻出血, 尿血, 血便, 血痢, 刀傷出血, 鬚髮早白, 디프테리아, 淋濁, 帶下, 陰部濕痒을 치료한다^{1,2)}.

한련초의 성분으로 전초에는 saponin 1.32%, nicotine 약 0.08%, tannin, vitamin A, ecliption, 다종의 thiophene 화합물을 함유하고 있으며, 잎에는 wedelolactone, demethylwedelolactone-7-glucoside 가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다¹⁾.

한련초에 대한 연구로는 항당뇨⁴⁾, 강압작용⁵⁾, 항균활성⁶⁾, 항암작용⁷⁾ 등의 연구가 보고되고 있으나, 염증조절에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

한련초는 여러 문헌에서 發熱, 解毒, 治腸炎의 효능을 확인할 수 있다¹⁴⁻⁶⁾.

Lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 염증매개인자의 연구는 염증반응을 연구하는 경우 빈용하는 실험모델¹³⁾로 확립되어 있으며, 대식세포는 염증 반응시 다양한 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할

을 하는 세포로 알려져 있다^{9,10)}.

또한, carrageenan으로 유도한 급성 발부종 모델은, 흰쥐의 뒷발에 carrageenan을 주입하면, 염증세포의 침윤을 동반한 급성부종을 초래하므로, 항염증 물질의 급성 염증에 대한 효력평가에 널리 이용되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

본 연구에서는 먼저, 한련초추출물 (EH)의 항염증효과를 평가하기 위하여 NO 생성억제정도를 관찰하였다. 이전의 연구들처럼²⁴⁻³²⁾ LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의하게 증가하였으며, 이러한 NO의 증가는 EH 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에 의하여 유의한 억제를 나타내었다. 또한, 동일 농도, 동일 시간에서 EH+LPS는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 한련초가 NO의 생성억제에 직접 관여됨을 의미한다.

Cytokine은 다양한 세포에 의해서 유리되는 작은 단백질 (~25 kDa)으로, 대체적으로 활성화 자극에 의해 유리되고, 특별한 수용체에 결합됨으로서 반응을 유도한다. 병원체에 반응하여 대식세포에서 분비되는 cytokine은 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 그리고 chemokine인 IL-8 등이 있다²⁷⁾.

TNF- α 는 혈관내피를 활성화시키고, 혈관투과성을 증가시키며, 발열을 유발하여, 국소 및 전체적 염증과 연관되며, 만성염증성 반응과도 관련되어 있다²⁸⁾. IL-1 β 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화하는²⁸⁾ cytokine으로, IL-1은 혈관내피를 활성화시키고, 림프구를 활성화시키며, 국소조직을 파괴하며, 발열을 유발하고 IL-6의 생산을 활성화시킨다²⁷⁾. IL-6는 림프구를 활성화시키며, B-cell이 plasma세포로 분화되도록 촉진하고 항체의 분비를 자극하는 cytokine으로 B-cell 분화단계의 후기에 주로 항체의 생성을 유도하고, 발열을 유도한다²⁹⁾. 또한 IL-6는 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

본 연구에서 LPS는 TNF- α 및 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, 이러한 증가는 EH 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 감소하였다. 이와 유사하게 IL-1 β 도 LPS에 의해 유의하게 증가하였으며, EH는 25, 50와 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의성있게 IL-1 β 의 생성량을 감소시켰다. 그러나 EH 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 25와 50 $\mu\text{g/ml}$ (P<0.01)에서 보다 미약한 억제 (P<0.05)를 나타내었다. Van 등³³⁾의 연구결과에서도 IL-6가 Polygala senega L.과 Viburnum trilobum 50, 100, 500 μg 의 농도에서 의존적으로 억제되지 못한 결과를 보고한 적이 있으며, Yoon 등³²⁾의 연구에서도 IL-3, IL-17이 농도의존적으로 억제되지 못한 결과를 제시한 적이 있으나, 이러한 이유에 대하여서는 좀 더 연구의 필요성이 있을 것으로 생각된다.

PG는 염증과 면역반응 및 smooth muscle tone, 혈관투과성, 세포증식 등에 작용하는 inter-, intracellular messenger이다. PG는 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 COX-2 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2, PGI2는 혈관 투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다^{34,35)}. PGE2는 세포막에 존재하는 인지질로부터 유래된 대사산물이며, phospholipase A2, COX 및 hydroperoxidase가 관여하여 생성된다^{17,36)}. 본 실험에서 LPS는 유의성있게 PGE2의 생성을 증가시켰으며, EH는 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 LPS로 유도된 PGE2를 유의성 있게 감소시켰다.

EH가 LPS에 의해 증가된 NO 및 PGE2를 억제함을 확인하고 이들의 상위에 있는 염증매개단백질의 발현을 평가하였다. 일반적으로 NO는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)를 경유하여 생성되고, PGE2는 COX-2를 경유하

여 생성되므로 이들의 발현에 대한 EH의 효능을 평가하였다.

LPS 처치시에는 iNOS의 발현이 유의하게 증가되었으나, EH 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 처치한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 모두 유의하게 감소하였다. 그러나, COX-2는 LPS 처치시에는 발현이 다량 증가되었으나, EH는 전 농도에서 COX-2의 발현을 억제하지 못하였다. EH가 COX-2의 발현을 억제하지 못한 까닭에, COX-2의 activity를 평가한 결과, COX-2 activity는 LPS에 의하여서는 유의하게 증가되었으며, EH는 전 농도에서 유의하게 COX-2의 activity를 감소시켰다. 이러한 결과는 EH가 NO를 억제함에는 iNOS의 억제에서 기인하고, PGE2를 억제하는 데에는 COX-2 단백질의 발현을 억제함에서 기인하는 것이 아니라, COX-2 activity를 억제함에서 기인함을 나타내고 있다.

EH가 LPS로 발현이 증가되는 염증매개단백질을 조절함에 따라, 염증매개단백질의 조절에 핵심적 역할을 하는 NF- κ B에 미치는 EH의 영향을 평가하였다.

일반적인 경우에서 NF- κ B는 세포질에서 I κ B와 결합하여 비활성형으로 존재하지만, 활성화 자극에 의해서 I κ B가 인산화되면서 NF- κ B가 핵으로 이동하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다³¹⁾. 본 연구에서 p-I κ B α 는 LPS 처치에 의하여 CON에 비교하여 유의하게 증가하였으나, EH의 전처치에 의하여 유의하게 감소되었다. 핵분획에서의 NF- κ B는 LPS에 의해 p-I κ B α 가 증가한 것처럼 유의하게 증가하였으나, EH는 유의성있게 감소시켰다. 이러한 결과는 EH가 I κ B α 의 인산화를 억제하고, NF- κ B가 핵으로의 전위됨을 억제하고, 이로 말미암아 염증매개물질을 억제함을 의미한다.

EH가 in vitro에서 I κ B α 의 인산화를 억제하여 염증매개물질을 억제함을 확인하고, in vivo에서도

유의한 항염증효능을 나타내는 지를 평가하기 위하여 carrageenan으로 발부종을 유도한 동물모델에서 발 부종의 정도 및 염증세포 침윤, 피부의 두께 등을 측정하였다. 기염제인 carrageenan을 주입한 군에서는 이전의 연구들과 같이³⁷⁻⁴⁰⁾ 발부종이 유도되었으며, dexamethasone을 전처치한 군에서는 이전의 연구보고들과 같이^{37,40,41)} 유의한 발부종 억제제를 나타내었다. EH를 0.1 g/kg 투여한 군에서는 발부종 유도 후 2시간에 유의한 발부종억제를 나타내었으며, EH를 0.3 g/kg 투여한 군에서는 2, 3, 4시간에 유의한 억제제를 나타내었다.

조직학적 변화에 있어서도, carrageenan은 염증세포 침윤을 동반한 급성부종을 초래한다¹⁸⁻²⁰⁾. 본 연구의 결과, 부종 발의 발등 조직 및 발바닥 조직에서 침윤 염증세포의 수는 이전의 보고와 같이²¹⁻²⁴⁾ carrageenan군에서 유의성 있게 증가하였으며, dexamethasone 및 EH 0.1, 0.3 g/kg의 전처치에 의해 유의하게 감소되어, EH가 in vitro에서 뿐만 아니라, in vivo에서도 유의한 항염증작용을 나타내었다.

염증유도로 인한 발등피부 및 발바닥피부의 두께는 이전의 연구^{41,42)}에서와 같이 carrageenan군에서 피부의 두께가 증가하였고, dexamethasone처치군에서는 유의하게 감소하였다. EH를 0.1 g/kg 처치한 실험군에서는 발등피부 및 발바닥피부 두께의 감소를 유도하였으나, 정도가 미약하여 유의성은 없었다. 그러나, EH를 0.3 g/kg 처치한 실험군에서는 발등과 발바닥 피부 두께의 유의한 감소를 유도하였다.

한의학 개념으로 구강으로 투여되는 모든 水穀은 腐熟과 運化에 의해 효능을 나타내는 것처럼, 일반적으로 한약재의 조추출물은 소화관을 통과하면서 다양한 효소 및 장내 미생물의 영향을 받게 되고 또한 흡수에 있어서도 다양한 변수가 존재하므로, in vitro의 결과가 in vivo에 바로 적용되기 어렵다. 그러나 본 연구에서 사용된 EH는

in vitro뿐만 아니라, in vivo에서도 유의한 결과를 유도하였으므로, EH는 염증성질환의 예방과 치료에 적극적으로 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결 론

한련초추출물 (EH)의 항염증 효능을 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 설치류 대식세포주인 Raw 264.7 cells에서의 NO의 생성량, iNOS, COX-2, p-I κ B α , NF κ B의 발현 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2에 미치는 EH의 영향 및 carrageenan으로 유도된 rat의 paw edema에 미치는 영향을 살펴본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS에 의해 증가된 NO는 EH 25, 50, 100 μ g/ml의 전처치에 유의하게 억제되었으며, EH+LPS는 LPS 단독처치군에 비교하여 세포독성을 나타내지 않았다.
2. EH는 LPS로 증가된 TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2등의 염증매개물을 유의하게 억제하였다.
3. EH는 LPS에 의해 증가된 iNOS의 발현을 유의하게 감소시켰으며, LPS에 의해 증가된 COX-2 activity를 유의하게 억제하였다.
4. EH는 LPS에 의해 증가된 NF κ B의 억제단백질인 I κ B α 의 인산화를 억제하고, 또한 핵분획에서의 NF κ B의 발현량을 억제하였다.
5. EH는 carrageenan으로 유도된 rat의 paw edema에 대하여 부종정도를 유의하게 억제하였으며, 염증조직에서의 침윤염증세포 및 두께를 유의성있게 감소시켰다.

이러한 결과로 보아, EH의 항염증작용은 I κ B α 의 인산화를 억제하여 NF κ B가 핵으로 전위되는 기전을 억제하고, 그 결과로 염증매개물질을 억제함을 나타낸다. 또한 carrageenan으로 유도된 rat

의 paw edema에 대하여 부종의 정도 및 염증반응을 유의성있게 억제하였으므로, EH는 과도한 염증성 질환의 예방과 치료에 적극 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 정보섭, 신민교. 도해향약대사전. 서울, 영림사. 2003;1043-4.
2. 본초학교수. 본초학. 서울, 영림사. 1992: 599-600.
3. 장정애. 한련초 추출물의 모발염색성에 관한 연구. 한국두피모발미용학회지. 2006;2(1): 97-109.
4. 문영희, 우은란, 이동행. 한련초로부터 정제한 다당체의 혈당강하 효과. 생약학회지. 2003; 34(3):246-9.
5. 윤정식, 정병희, 김나영, 성낙술, 이현용, 이진하, 김종대. 식물자원으로부터 Angiotensin Converting Enzyme 저해활성 탐색. 한국약용작물학회지. 2003;11(3):246-51.
6. 천상욱, 김도익, 최용수. 수종의 국화와 식물의 지상부 추출물로부터 살충 및 항균활성 연구. 한국잡초학회지. 2003;23(2):81-91.
7. 정영돈, 이현, 이병렬, 임운경. 족삼리에 시술한 한련초 약침의 면역증진과 항암작용에 관한 연구. 대한침구학회지. 2003;20(3):141-53.
8. 이충열, 조선훈, 서종은, 한승호, 조영욱, 민병일, 김창주. 흰쥐 신경세포에서 억제성 및 흥분성 한약재가 유발한 이온전류의 특성. 대한한의학학회지. 1998;19(2):450-67.
9. 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.
10. 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, 1990;144:1425-31.
11. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1996;211:24-32.
12. Corbett JA, 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.
13. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 1994;6:399-406.
14. Dohi T, Fujihashi K, Rennert PD, Iwatani K, Kiyono H, McGhee JR. Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. J Exp Med, 1999;189:1169-80.
15. Han, Y, Xia, C et al., Preliminary studies on chemical constituents and pharmacological action of *Eclipta prostrata* L. Materia Medica, 1983;23:680-2.
16. Melo PA, Nascimento MC, Mors WB and Suarez-Kurtz G (1994) Inhibition of the mytotoxic and hemorrhagic activities of crotoalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents.

- Toxicol 32:595-603.
17. 국윤범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. 대한한의방제학회지, 2002;10(1):113-29.
 18. Lee JH, Choi YH, Choi BT. The anti-inflammatory effects of 2 Hz electroacupuncture with different intensities on acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Int J Mol Med*. 2005; 16:99-102.
 19. Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P, Selvan VT. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6:36.
 20. Rao CV, Verma AR, Gupta PK, Vijayakumar M. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Fumaria indica* whole plant extract in experimental animals. *Acta Pharm*. 2007;57(4):491-8.
 21. Holt S, Comelli F, Costa B, Fowler CJ. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 2005;146:467-76.
 22. Liu J, Zhang W, Zhou L, Wang X, Lian Q. Anti-inflammatory effect and mechanism of osthole in rats. *Zhong Yao Cai*. 2005; 28:1002-6.
 23. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D, Mulkern RV, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. *Anesthesiology*. 2006; 105:128-38.
 24. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol*. 2008;154(1):165-73.
 25. Cho MK, Suh SH, Kim SG. JunB/AP-1 and NF- κ B-mediated induction of nitric oxide synthase by bovine type I collagen in serum stimulated murine macrophages. *Nitric Oxide*. 2002;6:319-32.
 26. Kim HD, Cho HR, Moon SB, Shin HD, Yang KJ, Park BR, Jang HJ, Lim LS, Lee HS, Ku SK. Effect of exopolymers from *Aureobasidium pullulans* on formalin-induced chronic paw inflammation in mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2006;16: 1954-60.
 27. Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik. *Immunobiology*. 5th. New York:Garland Publishing. 2001: 70-1.
 28. 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.
 29. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989;142(1):144-7.

30. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 2001;159(2):387-97.
31. 손갑호, 김성훈. 시호(柴胡), 인진(茵陳)의 간암 세포에 대한 항암활성 및 항암제와의 상승(相乘)작용. *대한한의학회지.* 1995;16(2):414-32.
32. Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, Kim HM, Ko SG, Choi HY, Oh MS, Park W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(2):286-90.
33. Van Q, Nayak BN, Reimer M, Jones PJ, Fulcher RG, Rempel CB. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(3):487-93.
34. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. *약학회지.* 1998;42(6):558-66.
35. 서영준. 발암과정에 있어서 cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. *분자세포생물학뉴스.* 2001;13:8-17.
36. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-64.
37. Wang T, Fu F, Zhang L, Han B, Zhu M, Zhang X. Effects of escin on acute inflammation and the immune system in mice. *Pharmacol Rep.* 2009;61(4):697-704.
38. Tag H, Namsa ND, Das AK, Kalita P, Mandal SC. Evaluation of anti-inflammatory potential of *Chloranthus erectus* (Buch.-Ham.) Verd. leaf extract in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009;126(2):371-4.
39. Gurgel AP, da Silva JG, Grangeiro AR, Oliveira DC, Lima CM, da Silva AC, Oliveira RA, Souza IA. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2009;125(2):361-3.
40. Wu Y, Zhou C, Song L, Li X, Shi S, Mo J, Chen H, Bai H, Wu X, Zhao J, Zhang R, Hao X, Sun H, Zhao Y. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. *J Ethnopharmacol.* 2006;108(2):243-50.
41. Wise LE, Cannavacciuolo R, Cravatt BF, Martin BF, Lichtman AH. Evaluation of fatty acid amides in the carrageenan-induced paw edema model. *Neuropharmacology.* 2008;54(1):181-8.
42. Babu NP, Pandikumar P, Ignacimuthu S. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbek* Benth., an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation. *J Ethnopharmacol.* 2009; 125(2):356-60.