

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 蜈蚣의 항염증 효과

조일주^{1,3}, 최미옥¹, 박민철², 송호준³, 박성주^{*3}

1 : 광주여자대학교 미용과학과

2 : 원광대학교 부속한방병원 안이비인후피부과

3 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실

Anti-Inflammatory Effect of Aqueous Extract of Scolopendrae Corpus in RAW 264.7 Cells.

Il-Joo Jo^{1,3}, Mee-Ok Choi¹, Min-Cheol Park², Ho-Joon Song³, Sung-Joo Park^{*3}

1 : Dept. of Beauty Science, Kwangju women's University

2 : Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology,
College of Oriental Medicine, Wonkwang University

3 : Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT

Objective : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of aqueous extract from Scolopendrae Corpus (SC) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response.

Methods : To evaluate the anti-inflammatory effects of SC, we examined the inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6) on RAW 264.7 cells. We also examined molecular mechanisms such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and inhibitory kappa B α ($\text{I}\kappa\text{-B}\alpha$) using western blot. Furthermore, we also investigated the effect of SC on LPS-induced endotoxin shock.

Results : Extract from SC itself had not any cytotoxic effect in RAW 264.7 cells. Aqueous extract from SC inhibited LPS-induced NO production and iNOS expression. SC pre-treatment also inhibited IL-1 β , IL-6 production in RAW 264.7 cells. To investigate inhibitory effects of SC on inflammatory mediators, activation of MAPKs was examined. SC inhibited the phosphorylation of p38 kinases (p38), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and also the degradation of $\text{I}\kappa\text{-B}\alpha$ in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. Furthermore, SC administration reduced LPS-induced endotoxin shock.

Conclusion : SC down-regulated LPS-induced production of inflammatory mediators through inhibition of activation of p38, JNK and degradation of $\text{I}\kappa\text{-B}\alpha$. Taken together, our results suggest that SC may be a beneficial drug against inflammatory diseases such as sepsis.

Key words : Lipopolysaccharide (LPS), *Scolopendra subspinipes multilans*, Inflammation, Cytokine

서 론

蜈蚣(*Scolopendra subspinipes multilans*)은 절족동물 다족류중 왕지네과에 속하는 지네류의 전충을 말린 것을 말하며, 천령, 낭저, 무가천 및 백죽 등 많은 이명을 가지고 있는

동물성 한약이다¹⁾. 약재로서의 蜈蚣은 *Scolopendrae Corpus* (SC) 라는 라틴 약재명으로 표기된다. 오공은 그 형상이 마치 사람의 척추처럼 마디마디 이어져 있고, 그 움직임이 신속하여 예로부터 민간요법의 하나로 관절질환으로 인한 통증에 가루를 내어 먹거나 술에 타먹음으로써 널리 이용하였다²⁾. 蜈蚣에

*교신저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 063-850-6450 · E-mail : parksj08@wku.ac.kr.
· 접수 : 2011년 8월 15일 · 수정 : 2011년 9월 4일 · 채택 : 2011년 9월 17일

대한 연구로는 진통 및 진경작용, 신경안정 및 소염작용, 항고혈압 작용, 면역반응 증가, 항산화 효과 등 혈전증에 유용하다는 보고와 蜈蚣 물 추출물의 항균 활성효과 등이 보고되어 있다³⁻⁵⁾.

박테리아는 숙주의 선천면역계를 흥분시키며, 감염되면 사이토카인과 케모카인과 같은 염증성 분자들을 분비하게 한다⁶⁻⁷⁾. 그람 음성균의 외막성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 국소 염증, 항체 생산, 폐혈증과 같은 다양한 반응을 일으킨다⁸⁾. 대식세포는 LPS 감염초기에 반응하고 숙주의 방어와 항상성 유지에 중추적인 역할을 한다. 그러나 고농도의 LPS 자극은 대식세포에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β 및 IL-6, nitric oxide (NO)와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시켜 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있다⁹⁻¹¹⁾. 일반적으로 NO는 대식세포가 활성화되면 inducible NO synthase (iNOS)로부터 생산되며 몇몇 바이러거나 기생충을 억제하는 항균 효과를 가지고 있지만¹²⁾ 과도한 NO의 형성은 염증을 유발하게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하는 것으로 알려져 있다¹³⁾.

TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 전염증성 cytokine의 발현은 extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), p38 kinases (p38), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases (MARKs)와 nuclear factor kappa B (NF- κ B)에 의해 조절된다¹⁴⁾. NF- κ B는 면역과 염증 반응에 관련된 유전자의 발현에 중요한 역할을 한다¹⁵⁾. NF- κ B가 활성화되면 NF- κ B와 결합해 있던 inhibitory kappa B α (I κ -B α)가 분해되면서 NF- κ B가 세포 원형질에서 핵으로 들어가게 되며 이후 TNF- α , IL-12, IL-6와 같은 cytokine 발현의 전사인자로서 작용한다¹⁶⁻¹⁷⁾.

이에 본 연구는 蜈蚣이 in vitro와 in vivo에서 LPS로 유도된 염증반응을 억제할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 NO 및 iNOS, 전 염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 발현정도와 MAPKs의 인산화 억제효과, 그리고 I κ -B α 의 분해 억제효과를 조사하고, in vivo에서 LPS로 유도된 endotoxin shock 실험도 병행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 蜈蚣은 음니허브(영천, 한국)에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 정선하여 사용하였다. 蜈蚣 추출물을 얻기 위하여 물 1 l에 蜈蚣 100 g을 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다.

2) 시약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI Medium 1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 시약 중 Chloroform, TRI-zol, Sodium dodesyl

sulfate(SDS), Acrylamide, Tris-HCL, Lipopolysaccharides (LPS) 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK, anti-iNOS는 Cell Signaling (MA, USA)사에서 구입하였고, Anti-I κ -B α 는 Santa Cruz사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 세포주

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받았다. 세포배양을 위해 10% Fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

4) 실험동물

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

2. 방법

1) MTT 분석

RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)용액을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 /ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 SC를 처리하였다. 24시간동안 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.

2) NO 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethylendiamide)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 SC를 처리하였다. LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 μ l의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 스펙트로포토메터 (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

3) Cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 세포에 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위하여 24시간 후 확

인하였으며, LPS를 자극하기 전 SC 추출물을 1시간동안 전처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다. ELISA는 BD pharmingen (U.S.A)에서 Mouse ELISA kit for TNF- α , IL-1 β , IL-6를 구입하여 시행하였다.

4) RNA 추출

Total RNA는 TRI-zol (invitrogen, USA) 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 SC를 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 TRI-zol 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 두 세 번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

5) 정량적 증합 효소 반응

mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 증합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, Real time PCR master mix 4 μ l (Roche), pimer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응 시켰다. PCR 조건은 92 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초, 그 후에 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 40 cycle로 하였다. 정량 증합 효소 반응에 쓰인 forward (f)와 reverse (r) primer 및 TaqMan probe는 Roche (Basel, Switzerland)에서 합성하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

TNF- α : 5' -TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3' (forward)
 5' -ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3' (reverse)
 5' -CCC GAC TAC GTG CTC CTC ACC CA-3' (probe)
 IL-1 β : 5' -TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3' (forward)
 5' -GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3' (reverse)
 universal probe, M15131.IV (probe)
 IL-6 : 5' -TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3' (forward)
 5' -GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3' (reverse)
 universal probe, M20572.IV (probe)

6) Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5 x 10⁶ cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 SC (1 mg/ml)를 전처리 하고 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 0, 15, 30, 60 분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 cell을 harvest하여 원심분리 (5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + protase inhibitor 10 μ 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 샘플을 10 % SDS-PAGE에 전기영동 한 후 맵트레인에 옮기고 나서 5 % skim milk로 2 시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 I κ -B α , iNOS를 ECL

detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

7) Endotoxin shock

SC를 C57BL/6 마우스에 0.1 g/kg, 1 g/kg의 농도로 복강투여 한 후, 1 시간 후에 LPS를 50 mg/kg (lethal dose) 주사하고 5일 동안 12시간마다 생존율을 확인하였다.

3. 통계처리

모든 실험결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D.로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 Two-way ANOVA에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 蜈蚣 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

蜈蚣의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 蜈蚣 추출물을 여러 농도로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 蜈蚣은 0.1 - 1 mg/ml에서는 saline을 처리한 대조군에 비해서 통계적으로 유의성이 없는 생존율을 보여주었다 (P > 0.05). 이는 이 연구의 세포 실험에 있어서 오공 자체의 세포 독성이 영향을 미치지 않음을 보여주기에, 0.1 - 1 mg/ml를 이 연구의 유효 농도로 설정하였다(Fig. 1).

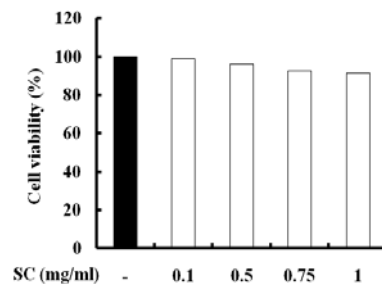


Fig. 1. Effect of SC extract on cytotoxicity in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with SC extract as indicated concentration. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment. *, P < 0.05 vs. control.

2. 蜈蚣 추출물이 NO 및 iNOS 생성에 미치는 영향

蜈蚣 추출물의 항염증 작용을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 蜈蚣 추출물을 다양한 농도로 전 처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정 한 결과 LPS 자극은 대식세포에서 NO 생성을 증가시켰으며, 蜈蚣 추출물을 전 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 NO생성이 유의하게 억제되었다(Fig. 2-A). 또한 蜈蚣 추출물이 iNOS의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 LPS 자극은 iNOS 발현을 증가시켰으며, 蜈蚣 추출물을 전 처리한 실험군에서 iNOS 발현이 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2-B).

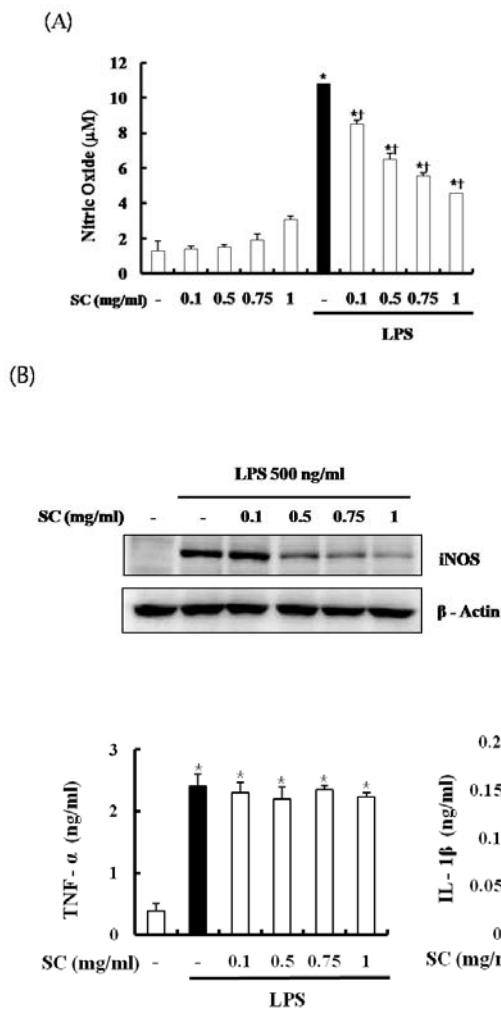


Fig. 2. The inhibitory effects of SC extract on LPS-induced NO production.

The cells were pre-treated with SC extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. (A) NO production was measured by Griess assay. (B) The level of iNOS was measured by Western blot. Data are means of three independent experiment. *, $P < 0.05$ vs. control; †, $P < 0.05$ vs. LPS treatment alone.

3. 蜈蚣 추출물이 TNF-α, IL-1β, IL-6 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 전염증성 사이토카인의 발현에 대한蜈蚣 추출물의 효과를 조사하기 위하여,蜈蚣 추출물을 다양한 농도로 전처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후 세포 상층액에서 TNF-α, IL-1β, IL-6를 측정된 결과 LPS 자극은 대식세포에서 TNF-α, IL-1β, IL-6의 발현을 증가시켰다.蜈蚣 추출물이 TNF-α의 발현은 억제하지 못하였으나 IL-1β, IL-6의 발현은 농도 의존적으로 유의하게 억제하였다(Fig. 3).

Fig. 3. Effect of SC extract on the production of TNF-α, IL-1β, IL-6 on RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with SC extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. Data are means of three independent experiment. *, $P < 0.05$ vs. control; †, $P < 0.05$ vs. LPS treatment alone.

4. 蜈蚣 추출물이 TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향

蜈蚣 추출물이 RAW 264.7 세포에서 전염증성 인자들을 단백질 수준에서 억제하였음을 착안하여(Fig. 3), mRNA 수준에서도 전염증성 인자들을 억제하는지 알아보기 위해蜈蚣

蚣 추출물을 다양한 농도로 전 처리한 후 LPS로 자극하였다. 24시간 후 TNF-α, IL-1β, IL-6의 mRNA를 측정된 결과 LPS 자극은 mRNA 발현을 증가시켰다.蜈蚣 추출물을 전 처리한 실험군에서는 TNF-α의 발현은 억제하지 못하였으나 IL-1β, IL-6 mRNA 발현이 유의하게 억제되었다(Fig. 4).

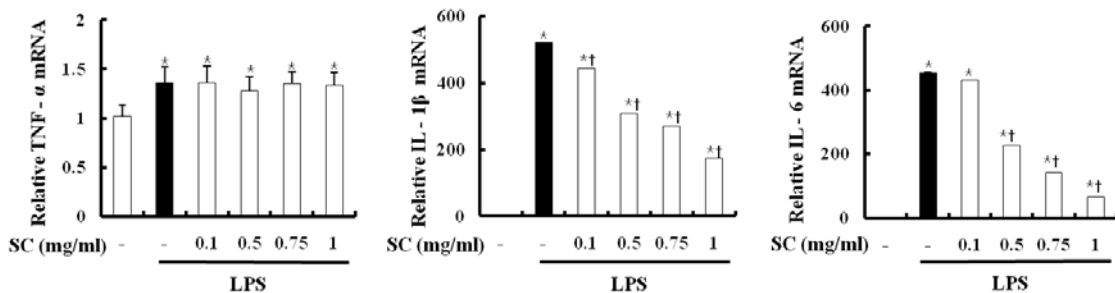


Fig. 4. Effect of SC extract on the mRNA expression of TNF-α, IL-1β, IL-6 on RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with SC extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA transcription level was measured by real time RT-PCR. Data are means of three independent experiment. *, $P < 0.05$ vs. control; †, $P < 0.05$ vs. LPS treatment alone.

5. 蜈蚣 추출물이 MAPKs 활성화에 미치는 영향

蜈蚣 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 cytokine의 생성을 억제하는 기전을 알아보기 위하여 MAPK family인 ERK, p38, JNK의 활성화 정도를 알아보았다. MAPKs의 활성화는 각각의 인산화를 통해 이루어진다.蜈蚣 추출물이 전 염증성인자들을 유의하게 억제하는 농도인 1 mg/ml의 농도로 전 처리한 후 LPS를 시간대별로 자극하였다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 인산화 정도를 측정할 결과 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서는 ERK, JNK, p38이 인산화 되었고,蜈蚣을 처리했을 경우에 ERK는 억제하지 못했지만 p38, JNK의 인산화가 억제되었다(Fig. 5).蜈蚣이 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해蜈蚣을 전처리하고 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 I κ -Ba의 분해 정도를 조사하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이蜈蚣이 LPS에 의한 I κ -Ba의 분해를 억제할 수 있었다.

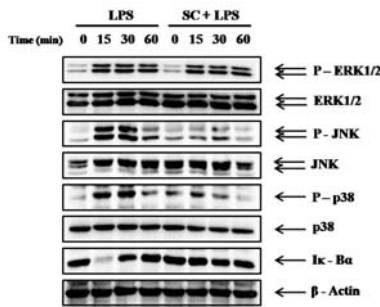


Fig. 5. Effect of SC extract on the expression of I κ -Ba degradation and MAP kinase activity on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cell were pre-treated with SC (1 mg/ml) for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods. Representative western blots of at least three separate experiments are shown.

6. 蜈蚣 추출물에 의한 LPS로 유도된 endotoxin shock의 억제효과

LPS는 그람 음성균의 세포외막성분으로 endotoxin shock을 일으킨다고 알려져 있다.蜈蚣을 복강투여한 후 1시간 뒤, LPS를 주사하였다.蜈蚣을 복강투여하지 않고 LPS만 주사한 군은 48시간에서 72시간 사이에서 endotoxin shock으로 인해 마우스가 사망하였다. 하지만蜈蚣을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 endotoxin으로 인한 shock을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6).

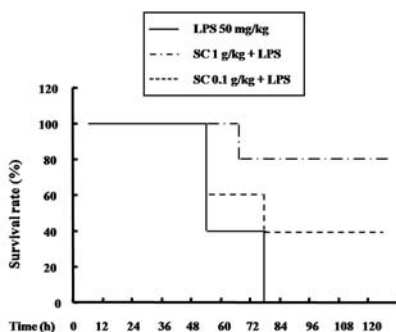


Fig. 6. Effect of SC on LPS-induced endotoxin shock. Mice were administrated intraperitoneally with SC (0.1 g/kg, 1 g/kg) and then after 1 h, mice were injected with lethal dose LPS (50 mg/kg). The survival rate was monitored for 5 days. Detail methods were described in Materials and Methods. Data are means of three independent experiment (n=5 per each experiment, totally 15 mice).

고찰

염증성 질환에는 증상을 호전시키고, 과도한 염증반응에 의한 조직 손상을 최소화 하기위하여 항염제 사용을 필요로 한다. 현재 사용되어지는 강력한 항염제 중 하나인 스테로이드제는 신속한 염증 억제를 기대할 수 있으나, 감염, 골다공증, 혈압상승, 쿠싱 증후군 등의 심각한 부작용으로 인해 장기적인 사용은 바람직하지 않다. 이처럼 최근 사용되어지고 있는 의약품 중에서는 여러 가지 부작용이나 독성 및 내성이 심각해 문제가 제기 될 수 있어 천연물로부터 의약품 개발에 관한 연구가 활발히 추진되고 있는 실정이다.

蜈蚣은 왕지네과에 속하는 지네류의 전충을 말린 것을 말하며, 천룡, 낭저, 무가천 및 백죽 등 많은 이명을 가지고 있는 동물성 한약이다¹⁸.蜈蚣은 약침으로 많이 사용되어지고 있는데蜈蚣약침이란 頭足尾를 제거한 왕지네를 추출 가공하여 질병과 관련한 부위 및 경혈에 주입함으로써 刺鍼의효과와 왕지네가 지니고 있는 생화학적 약리작용을 질병의 치료에 이용하는 新鍼療法이다. 지금까지의 연구결과 포착신경병증과 염증성질환에 효과가 좋은 것으로 나타났다¹⁹.蜈蚣의 진정효과는 중추신경의 흥분상태를 완화함으로써 나타나는 것으로 알려져 있으며,蜈蚣의 頭足を 제거하면 진통과 소염 작용에서 제거하지 않으면 신경작용에서 효능 증대를 나타낸다고 하였다²⁰.

본 연구에서는蜈蚣이 RAW 264.7 세포에서 그람음성 세균 세포외막 성분인 LPS로 유도된 iNOS 발현에 의한 NO의 생성과 다양한 염증성 세포활성물질의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. NO는 염증성 매개체로서 대식세포의 종양, 박테리아 파괴능력과 같은 면역반응에 중요한 역할을 한다²¹. 또한 장기 기능에 미치는 LPS의 유독한 작용의 원인 중의 하나가 NO이기도 하다²². 그렇기 때문에 NO에 의한 염증 반응의 억제는 면역질환에 있어서 중요하다. LPS로 인하여 증가된 iNOS 발현과 NO의 생산량은,蜈蚣 물 추출물을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 iNOS의 발현과 NO의 생성을 유의성 있게 억제하였다. 이는蜈蚣 물 추출물이 LPS의 의해서 활성화된 RAW 264.7 세포에서 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제한 것으로 사료된다.

LPS는 RAW 264.7 세포에서 MAPKs와 NF- κ B 등을 활성화시켜서 각종 염증성 사이토카인을 분비하도록 자극한다²³⁻²⁵. 염증성 사이토카인으로 TNF- α 와 IL-1b, IL-6가 유명하다. 전염증성 사이토카인으로 알려진 TNF- α 와 IL-1b, IL-6의 생성은 또 다른 다양한 염증매개체들의 유도, 면역반응의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는蜈蚣 물 추출물을 처리한 실험군에서 LPS만을 처리한 대조군에 비해 IL-1 β , IL-6의 분비를 단백질 단계 및 mRNA 수준에서 유의성 있게 억제하는 효과를 보였다. 이는蜈蚣이 LPS에 관련된 염증 반응에서 사이토카인을 조절하는

데 사용할 수 있다는 것을 보여준다.

염증반응이 시작되면 염증반응의 전사인자인 NF- κ B가 활성화되는데, NF- κ B의 활성화는 먼저 IL-1 β , IL-6, IL-8과 TNF- α 를 포함하는 일부 주요 염증 촉진 단백질의 유전자 발현을 조절한다. 또 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하여 염증반응 전반에 걸쳐 중요한 역할을 한다²⁶⁾. LPS는 MAPKs와 NF- κ B를 활성화시켜서 NO 및 superoxide anion 등의 free radicals 등이 생성 된다²⁷⁻³⁰⁾. ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 활성화는 ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 인산화에 의해서 나타난다. IKK의 활성화는 NF- κ B Rel A와 I κ -B α 의 인산화와 유비퀴틴화전과 프로테아소좀 분해를 촉진하며, NF- κ B 조립체는 핵으로 전사되어, NF- κ B의 서브유닛인 Rel A와 κ B 의존적인 유전자를 활성화한다³¹⁾. 그리하여 NF- κ B 활성화는 I κ -B α 의 감소를 통해 알아낼 수 있다. 蜈蚣 추출물은 이 연구에서 p38, JNK의 인산화와 I κ -B α 의 분해는 억제하였다. 이 결과를 통해 蜈蚣은 MAPK family인 p38과 JNK의 신호전달 억제와 I κ -B α 분해 억제를 통하여 염증성 cytokine의 생성을 억제하는 것을 알 수 있다.

장기나 조직으로 부터의 과도한 cytokine의 분비는 endotoxin shock를 유발하여 사망을 초래한다. 蜈蚣의 cytokine 분비억제는 shock 억제에 응용이 가능 할 것으로 추측하여 LPS로 유도한 endotoxin shock 모델에서 생존률을 측정하였다. 蜈蚣 물 추출물은 LPS로 유도한 endotoxin shock에서 생존율 및 생존시간을 크게 증가시켰다. 이는 오공 물 추출물의 cytokine 분비 억제 효과가 in vitro 뿐만 아니라 in vivo에서도 탁월하여, shock을 억제한 것으로 사료된다.

이러한 실험결과들을 통해 蜈蚣 물 추출물의 항염증 효과는 p38, JNK의 인산화를 저해하고 NF- κ B 활성화 억제하여 NO와 IL-1 β , IL-6의 생산을 억제함을 통해 일어남을 확인할 수 있었다. 蜈蚣 추출물의 뛰어난 항염증효과가 염증성질환의 예방과 치료에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 蜈蚣 물 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 蜈蚣 추출물의 농도별 처리는 세포독성을 거의 나타내지 않았다.
2. 蜈蚣 추출물은 농도 의존적으로 NO 생산과 iNOS 발현을 억제하였다.
3. 蜈蚣 추출물은 IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 cytokine의 생성을 단백질 수준과 mRNA 수준에서 억제하였다.
4. 蜈蚣 추출물은 p38, JNK의 인산화를 억제하였고, I κ -B α 의 분해를 방지하였다.
5. LPS로 유도한 endotoxin shock 모델에서 蜈蚣은 생존률과 생존 기간을 유의성 있게 증가 시켰다.

이와 같은 결과로 보아 蜈蚣 물 추출물은 RAW 264.7 세포에 작용하여 NO 생성 및 iNOS의 발현, IL-1 β 와 IL-6의 생산을 억제하였으며, MAPKs 중 p38, JNK의 인산화와 I κ -B α 의 분해를 억제하였다. 결과적으로 蜈蚣 추출물은 LPS로 유발되는 RAW 264.7 세포의 염증을 차단하는 항염증 효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

참고문헌

1. Kim SN. Study on genetic analysis and extract cytotoxicity of Scolopendra subspinipes mutilans L. Koch. MS Thesis. Wonkwang University, 2005 ; 37.
2. Kim SC, Seo GY, Lee SW, Park SJ, Kim JH, Ahn SH, Hwang SY. Biological Activities of Scolopendrid Pharmacopuncture. Journal of Pharmacopuncture, 2010 ; 13:5-13.
3. Kim GS, Seo UK, Jeong JC. Effects of Scolopendreae corpus on immune response in mice of different ages. Korean J. Orient. Int. Med, 1998 ; 19 : 477-490.
4. Choi YK, Lee DU, Kim GW, Koo BS. Antioxidative Effects of Scolopendra subspinipes. The Journal of Oriental Neuropsychiatry, 2008 ; 19 : 129-142.
5. Ren WH, Zhang SQ, Song DX, Zhou KY. Antibacterial activity of water soluble fraction from Scolopendra subspinipes mutilans. Zhong Yao Cai, 2007 ; 30 : 10-4.
6. Medzhitov R, Janeway CA Jr. an ancient system of host defense. Curr. Opin. Immunol, 1998 ; 10 : 12-5.
7. Hoffmann JA, Kofatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 1999 ; 284 : 1313-8.
8. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol, 2003 ; 21 : 335-76.
9. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med, 1996 ; 211 : 32-24.
10. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Antiinflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. Kor J Herbol, 2009 ; 24 : 47-39.
11. Willeaume V, Krays V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharides in

- macrophages : similarities and differences. *J Inflamm*. 1996 ; 46 : 12-1.
12. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide : physiology pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991 ; 21 : 361-74.
 13. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1993 ; 178 : 749-754.
 14. Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages : *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol*. 1999 ; 163 : 6403-12.
 15. Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Balcwin AS. A nucleosomal function for I kappa B kinase-alpha in NF-kappaB-dependunt gene expression. *Nature*. 2003 ; 423 : 659-63.
 16. Athman R, Rhilpott D. Innate immunity via toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol*. 2004 ; 7 : 32-25.
 17. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004 ; 382 : 409-393.
 18. Kim SN. Study on genetic analysis and extract cytotoxicity of *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. MS Thesis. Wonkwang University. 2005 ; 37.
 19. Science Committee of Korean Pharmacopuncture Institute. *Pharmacopuncturology*. Seoul : Elsevier Korea, 2008 ; 167-99, 208-10.
 20. Kim JH, Kim SH, Song HJ. Experimental Study on Analgesic, Antinflammatory, Anticonvulsive and Toxic Action *Scolopendra*. *The Journal of Korean Oriental Medicine*. 1993 ; 14 : 381-93.
 21. la Sala A, Gadina M, Kelsall BL. 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*. 2005 ; 175 : 2994-9.
 22. Wu GH, Zhang YW, Wu ZH. Modulation of postoperative immune and inflammatory response by immune-enhancing enteral diet in gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2001 ; 7 : 357-62.
 23. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin-1 : Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest*. 1987 ; 56 : 234-48.
 24. Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T. Local production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med*. 1989 ; 170 : 1859-67.
 25. Van Snick J. Interleukin-6 : an overview. *Annu Rev Immunol*. 1990 ; 8 : 253-78.
 26. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 ; 19 : 1623-9.
 27. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 ; 11 : 218-211.
 28. Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. *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*. 2004 ; 84 : 62-49.
 29. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-a and COX-2 expression by suchinone effects on I-kappaB phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol*. 2003 ; 139 : 20-11.
 30. Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med*. 1997 ; 185 : 1661-70
 31. Aggarwal BB. Signaling pathways of the TNF superfamily : a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 2003 ; 3 : 745-56.