

모과(木瓜) 물추출물의 항염증 효능에 관한 실험적 연구

가천대학교 한의과대학 한방부인과교실

류한우, 김윤상, 임은미

ABSTRACT

The Antiinflammatory Effects of *Chaenomelis Fructus Herba* Water Extract on Mouse RAW 264.7 Cell

Hahn-Woo Ryu, Yoon-Sang Kim, Eun-Mee Lim

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Ga-Chon University

Objectives: The purpose of this study was to investigate the effects of *Chaenomelis Fructus Herba* Water Extract(CF) on the production of inflammatory mediators in RAW 264.7 cell mouse macrophages stimulated with LPS.

Methods: We have not examined effect of CF on the cell viability of RAW 264.7 cell until we investigated effects of CF on LPS-induced productions of NO, Ca and various cytokines in RAW 264.7 cell. And when p-value is below 0.05, it is judged to have the significant difference statistically(P<0.05).

Results:

1. CF increased the cell viability in the RAW 264.7 cell at the density of 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
2. CF inhibited significantly increasing the production of NO in LPS-induced RAW 264.7 cell at the density of 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
3. CF inhibited significantly increasing the production of Intracellular Ca in LPS-induced RAW 264.7 cell at the density of 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
4. CF inhibited significantly the IL-2, IL-10, IL-12p70, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, LIF and VEGF of the RAW 264.7 cell induced by LPS at the density of 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
5. CF inhibited significantly the IL-4 at the density of 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the IL-5, IL-15 and MIG at the density of 25, 50 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and IFN- γ at the density of 25, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively in the RAW 264.7 cell increased by LPS.

Conclusions: CF inhibited significantly increasing IL-2, IL-10, IL-12p70, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, LIF, VEGF, NO and Ca in LPS-induced RAW 264.7 cell at the density of more than 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ without causing the toxicity. These results signify that CF has antiinflammatory effect on controlling the over inflammatory reaction by the RAW 264.7 cell.

Key Words: *Chaenomelis Fructus Herba*, RAW 264.7 cell, NO, cytokine, antiinflammation

“이 연구는 2012년도 가천대학교 지원에 의한 결과임” GCU-2012-R122

I. 서 론

여성의 골반통을 유발하는 생식기 질환은 골반염, 난소낭종, 세균성 질염, 외음부 질염, 자궁근종, 자궁내막염 및 자궁경부암 등이 있는데 6개월 이상 반복적으로 지속되는 만성골반통은 생식기 질환 이외에도 비뇨기 질환, 근골격계 질환 및 정신과적 질환 등에 의해서도 발생하거나 악화될 수 있기 때문에 치료에 많은 어려움이 있다¹⁻³⁾.

한의학에서는 골반통에 관하여 帶下, 腹痛, 陰痒, 陰瘡, 陰痛 및 癥瘕 등을 참고하고, 세부적 병인은 氣滯, 瘀血, 濕痰 및 外傷 등으로 보고 있다^{1,4)}.

골반통을 일으키는 염증반응은 삼출, cytotoxin 분비, 세포증식 및 항체생성 등의 면역반응 후 macrophage나 neutrophil 과 같은 백혈구의 반응을 도모함으로써 일종의 생체 방어기전으로 볼 수 있다^{5,6)}.

木瓜는 장미과(Rosaceae)에 속한木瓜나무(*Chaenomeles sinensis* Koehne)의 성숙한 과실을 건조한 것으로 性溫味酸하고, 舒筋活絡과 和胃化濕의 효능이 있어 濕痺拘攣, 腰膝關節酸重疼痛, 吐瀉轉筋, 脚氣水腫 등을 치료하며⁷⁾, 다양한 항염증 작용에 대한 선행연구가 진행된 바 있다⁸⁻¹⁰⁾.

이에 저자는木瓜의 舒筋活絡하고 염증을 억제하는 작용이 골반통의 치료에 도움이 될 것이라는 가설을 기반으로 면역역과 관계된 다양한 인자들을 연구하게 되었고,木瓜 물추출물(CF)을 시료로 하여 RAW 264.7 cell을 이용한 cell viability를 살펴본 후 LPS로 유발된 RAW 264.7 cell 내 Ca, NO 그리고 IL-2, IL-4, IL-5,

IL-10, IL-12p70, IL-15, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, LIF, VEGF, MIG 및 IFN- γ 등의 다양한 cytokine들의 변화를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

실험에 사용된木瓜(*Chaenomeles Fructus Herba*)는 (주) 음니허브(대구, 한국)에서 구입하였고, 모든 약재는 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거한 후 사용하였다.

2) Cell lines

실험에 사용된 세포는 mouse macrophage RAW 264.7 cell line으로 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

본 실험을 위해서 FBS(Sigma, USA), ethyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), penicillin(Sigma, USA), streptomycin(Sigma, USA), DMEM(Sigma, USA), methyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), DMSO(Sigma, USA), 1×PBS(Sigma, USA), EDTA(Sigma, USA), trypsin-EDTA(Sigma, USA), MTT assay kit(Sigma, USA), fluo-4 calcium assay kit(Molecular Probes, USA), NO assay kit(Sigma, USA) 및 Bio-Plex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다.

(2) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 filter paper(Advantec No.2, Japan), centrifuge(Hanil,

Korea), CO₂ incubator(Nuair, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), 75 cm³ flask(Falcon, USA), air compressor(Tamiya, Japan), homogenizer(O-mni, USA), research microscope(Olympus, Japan), fume hood(Hanil, Korea), clean bench(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner(Branson, USA), deep freezer(Ilshin Lab Co, Korea), microplate reader(Bio-Rad, USA), thermo aluminum bath(Fine PCR, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(In-Tron biotech., Korea), ice-maker(Vision Scientific Co, Korea), Bio-Plex 200(Bio-Rad, USA) 및 spectrofluorometer(Dynex, UK) 등이다.

2. 방 법

1) CF 제조

木瓜 50 g과 증류수 1,000 ml를 환류추출기에 함께 넣은 후 끓는점부터 2시간 가열해서 얻은 추출액을 filter paper로 감압하여 여과하였고, 이를 rotary vacuum evaporator를 이용하여 얻은 농축액을 동결건조기로 건조한 뒤 시료(CF)로 사용하였으며, 동결건조 추출물은 19.72 g, 수율은 39.44%였다.

2) 세포 배양

RAW 264.7 cell은 37°C, 5% CO₂ 조건의 CO₂ 배양기에서 10% FBS(100 µg/ml)가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였는데, 75 cm³ flask에서 3일 간격으로 표면을 PBS 용액으로 씻었고, 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액으로 실온에서 1분 처리한 뒤 37°C에서 5분 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다.

탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 후 새로운 배양용기(50 ml culture flask)에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3) 세포생존을 검사

CF가 RAW 264.7 cell에 미치는 독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였는데, 96 well plate에 1×10⁵ cells/well의 cell을 100 µl씩 넣은 후 CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 뒤 배지를 버린 다음 표면을 PBS 용액으로 씻었고, 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 다양한 농도의 CF를 각 well에 처리한 후 24시간 배양하였다.

배양이 끝난 후 1×PBS에 녹인 1 mg/ml MTT를 100 µl씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 뒤 같은 조건에서 2시간 배양하였고, 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µl을 처리하였으며, 37°C에서 2시간 방치한 뒤 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였는데, Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability}(\%) = \text{AT} / \text{AC} \times 100$$

4) NO 생성량 측정

L-arginine에서 생성되는 NO는 불안정하기 때문에 안정된 NO₂, M¹NO₂ 및 M(NO₃)_n 등으로 빠르게 변하고, Griess reagent(0.5%의 sulfanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthyl ethylenediamine)는 NO₂와 반응하여 NO의 농도와 일치하는 아조염을 형성하기 때문에 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 아조염, NO₂ 및 NO 등의 농도와 생성량을 추정하게 된다.

CF가 RAW 264.7 cell의 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 다양한 농도의 CF와 함께 배지에 담아 각 well에 처리한 후 CO_2 배양기에서 24시간 배양하고, 세포배양 상층액 100 μl 을 채취하여 Griess reagent 100 μl 을 혼합한 뒤 15분 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였는데, NO 생성량은 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Production of NO}(\%) = \text{AT} / \text{AC} \times 100$$

5) Ca 생성량 측정

CF가 RAW 264.7 cell의 Ca 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 fluo-4 Ca assay를 하였는데, 96 well plate에 2×10^5 cells/ml의 cell을 100 μl 씩 넣은 후 CO_2 배양기에서 24시간 배양한 뒤 배지를 버리고 표면을 PBS 용액으로 씻었으며, LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 다양한 농도의 CF와 함께 배지에 담아 각 well에 처리한 후 CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다.

배양이 끝난 후 각 well의 배지를 제거하고 100 ml의 fluo-4 dye solution을 각 well에 처리한 뒤 CO_2 배양기와 상온에서 각각 30분 배양한 다음 spectrofluorometer(485 nm excitation filter; 535 nm emission filter)를 이용하여 각 well의 fluorescence intensity를 측정, 비교하였다.

6) Multiplex cytokine assay

CF가 RAW 264.7 cell의 cytokine 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Anderson 등¹¹⁻¹⁴⁾의 방법을 응용하였는데, 96 well plate에 1×10^5 cells/ml의 cell을 100 μl 씩 넣은 후 CO_2 배양기에서 24시간 배양한 뒤 배지를 버린 다음 표면을 PBS 용액으로 씻었다.

LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 다양한 농도의 CF와 함께 배지에 담아 각 well에 처리한 후 CO_2 배양기에서 24시간 배양하고, 배양이 끝나면 상층액을 채취한 뒤 Bio-Plex suspension array system의 multiplex cytokine assay를 실시하여 cytokine을 측정하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균치 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었고, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test와 ANOVA test로 분석하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. CF가 RAW 264.7 cell의 세포생존율에 미치는 영향

CF를 RAW 264.7 cell에 처리한 후 세포생존율을 측정된 결과 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. CF가 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에 미치는 영향

1) NO 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 NO를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 2).

2) Ca 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 Ca를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게

감소시켰다(Fig. 3).

3) IL-2 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-2를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 4).

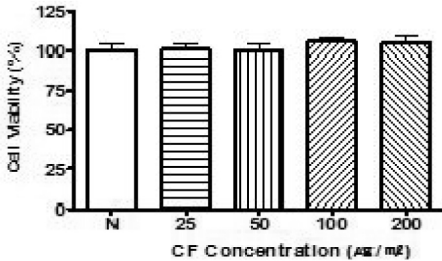


Fig. 1. Effect of CF on Cell Viability of RAW 264.7 cell.

CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

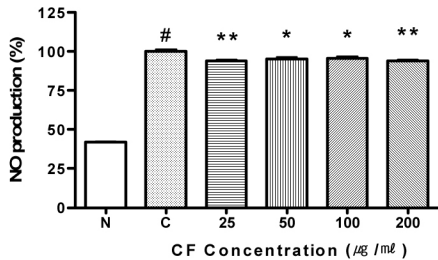


Fig. 2. Effect of CF on NO Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

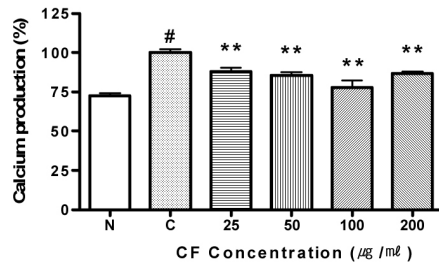


Fig. 3. Effect of CF on Ca Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

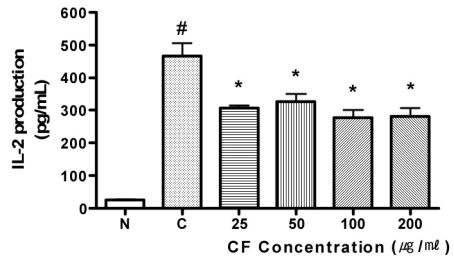


Fig. 4. Effect of CF on IL-2 Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

4) IL-10 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-10을 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 5).

5) IL-12p70 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-12p70를 25, 50,

100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 6).

6) TNF- α 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 TNF- α 를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 7).

7) GM-CSF 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 GM-CSF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 8).

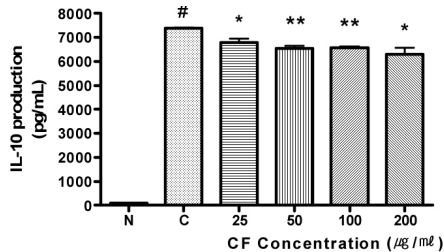


Fig. 5. Effect of CF on IL-10 Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomeles Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

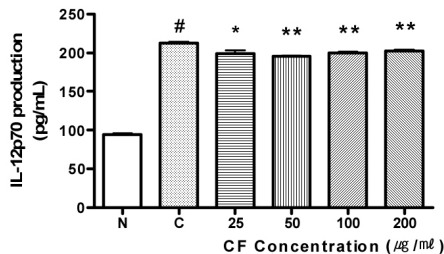


Fig. 6. Effect of CF on IL-12p70 Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.

** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomeles Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

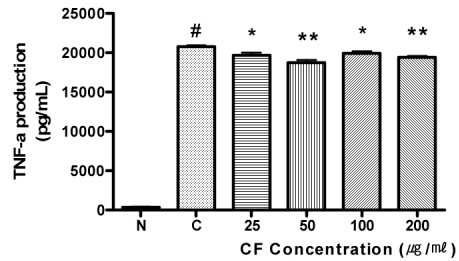


Fig. 7. Effect of CF on TNF- α Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomeles Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

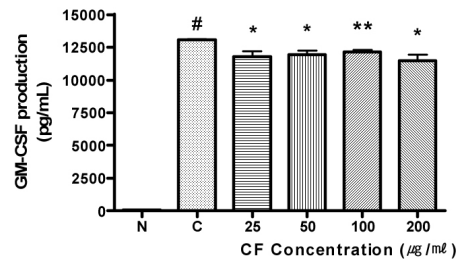


Fig. 8. Effect of CF on GM-CSF Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomeles Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

8) M-CSF 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 M-CSF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 9).

9) LIF 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 LIF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 10).

10) VEGF 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 VEGF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 11).

11) IL-4 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-4를 25와 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 12).

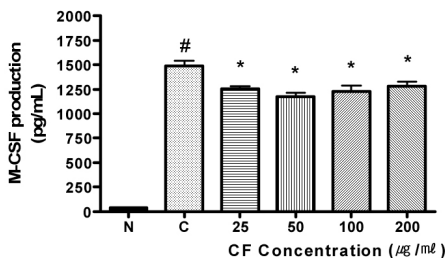


Fig. 9. Effect of CF on M-CSF Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS($1 \mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

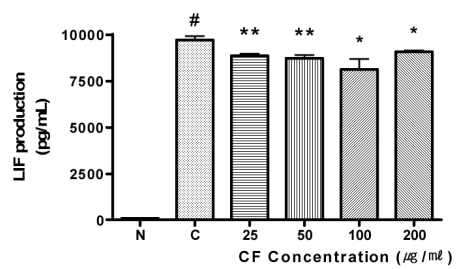


Fig. 10. Effect of CF on LIF Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS($1 \mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

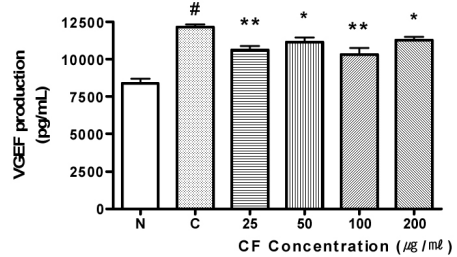


Fig. 11. Effect of CF on VEGF Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents $P < 0.05$ compared to the Normal.
 * : represents $P < 0.05$ compared to the Control.
 ** : represents $P < 0.01$ compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS($1 \mu\text{g/ml}$) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean \pm SD of more than three independent experiments.

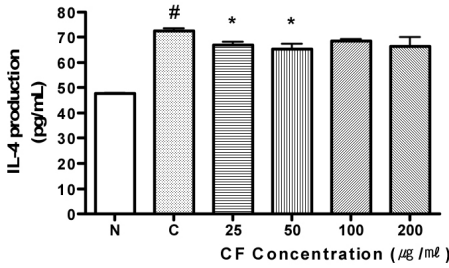


Fig. 12. Effect of CF on IL-4 Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents P<0.05 compared to the Normal.
 * : represents P<0.05 compared to the Control.
 ** : represents P<0.01 compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 µg/ml) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.
 Results were represented as mean ± SD of more than three independent experiments.

12) IL-5 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-5를 25, 50 및 200 µg/ml 등의 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 13).

13) IL-15 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-15를 25, 50 및 200 µg/ml 등의 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 14).

14) MIG 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 MIG를 25, 50 및 200 µg/ml 등의 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 15).

15) IFN-γ 생성에 대한 영향

CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IFN-γ를 25와 100 µg/ml의 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 16).

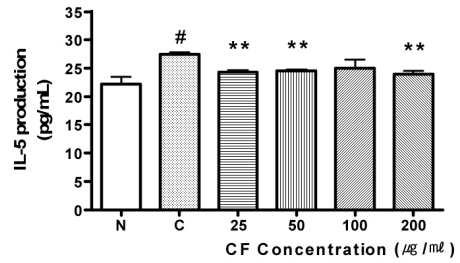


Fig. 13. Effect of CF on IL-5 Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents P<0.05 compared to the Normal.
 ** : represents P<0.01 compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 µg/ml) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.
 Results were represented as mean ± SD of more than three independent experiments.

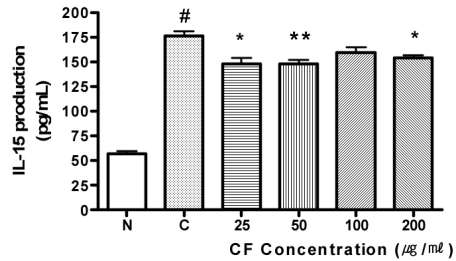


Fig. 14. Effect of CF on IL-15 Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents P<0.05 compared to the Normal.
 * : represents P<0.05 compared to the Control.
 ** : represents P<0.01 compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 µg/ml) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.
 Results were represented as mean ± SD of more than three independent experiments.

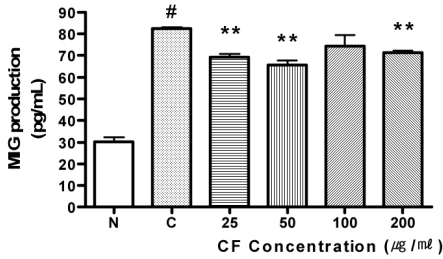


Fig. 15. Effect of CF on MIG Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents P<0.05 compared to the Normal.
 ** : represents P<0.01 compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 µg/ml) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean ± SD of more than three independent experiments.

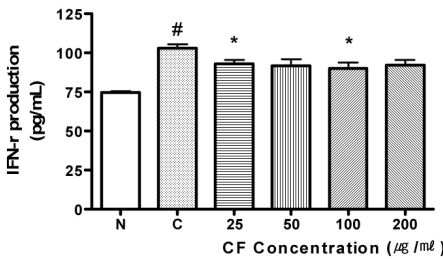


Fig. 16. Effect of CF on IFN-γ Production in LPS-treated RAW 264.7 cell.

: represents P<0.05 compared to the Normal.
 * : represents P<0.05 compared to the Control.
 CF : *Chaenomelis Fructus Herba* water extract.
 N(Normal) : Treated with media only.
 C(Control) : Treated with LPS(1 µg/ml) only.
 Cells were incubated with CF for 24 hrs with LPS.

Results were represented as mean ± SD of more than three independent experiments.

IV. 고찰

여성의 골반통은 발병율이 매우 높는데 반하여 치료에 대한 만족도가 높지 않아 대체요법에 대한 관심과 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 발병시기에 따라 급성, 주기성 및 만성 등으로 구분

하고, 통증의 형태나 부위에 따라 분류하기도 하며, 여성 생식기의 원인으로는 감염, 종양, 부속기의 염전, 유착 및 임신 관련 질환 등으로 다양하다¹⁻⁴⁾.

이 중 외음부, 질, 자궁, 난관, 난소 및 골반 등 다양한 부위의 감염과 악성 종양에서 유발되는 염증성 반응은 NO, prostaglandin, 활성산소 및 여러 cytokine 등의 수많은 면역매개체의 과량 생산에 의해 골반통을 일으키게 된다^{1-6,15-18)}.

현대의학에서는 통증을 억제하는 진통제와 스테로이드의 투여를 통한 증상의 완화와 더불어 감염 질환에서는 원인을 제거하는 항바이러스제, 항생제 및 항진균제를 투약하고, 악성 종양에서는 수술요법, 방사선요법 및 화학요법 등을 시행하는데 이들은 반복적 혹은 장기적 투약 시 수반되는 다양한 부작용과 정상적인 면역기능의 저하가 나타날 수 있다¹⁾.

한의학에서는 “正虛者扶正, 邪實者祛邪”라 하여 인체의 안정성을 증강시키기 위해 항병력을 조절하고 면역효능을 높이는 扶正法과 면역효능 감소의 원인을 제거하는 祛邪法을 모두 활용하는데, 이에 관한 실험적, 임상적 연구가 많이 보고되어 있다^{16,19-29)}.

본 저자는 염증성 반응으로 인한 골반통에 효과적인 한약들 중에서 舒筋活絡하고 祛風濕하여 鎮痛작용이 있는 木瓜를 선택하였는데, 木瓜는 性溫味酸하고, 대개 관절염, 각기, 과상풍, 신경통, 말초신경염 및 產後腰脚腿膝疼痛 등의 치료에 사용되고 있으며, 항염작용과 면역반응에 대한 다양한 연구가 이루어져 있다^{7-10,30)}.

하지만 투여 용량별 효과와 다양한 면역매개체에 대한 연구가 부족하다고 사

료되어 이에 본 연구에서는木瓜의 물추출물인 CF를 대상으로 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유발된 NO, Ca, 그리고 다양한 cytokine의 생성변화에 대한 영향을 측정하였다.

CF의 세포독성여부를 판단하기 위해 세포생존율을 측정한 결과 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 정상군에 비해 증가하여 CF가 세포독성이 없다는 것을 알 수 있었다.

NO는 NO 합성효소 NOS 중 iNOS가 세포내 Ca^{2+} 의 농도에 비의존성이고 macrophage, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포 및 심근세포 등 여러 세포에서 LPS, INF- γ , IL-1 및 TNF- α 등의 자극에 의해 활성화되고 L-arginine으로부터 생성되어 세포신호전달물질로 신경계통, 심장혈관계통 및 세포독성 등 다양한 생물학적 활성을 나타내는데³¹⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 NO를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

Ca는 Toll-like receptor 신호전달체계의 활성화로 macrophage 내 Ca 생성이 증가되어 다양한 염증매개인자 등의 생성증가로 이어지는데³²⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 Ca를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

Cytokine은 인체의 세포에서 생성되는 수용성 단백질로 면역세포들의 성장, 분해, 증식 및 활성 등에 영향을 주어 면역과 염증반응을 조절하는데, Th1 cell에서 생성되는 INF- γ , IL-2 및 TNF- α 등은 macrophage, cytotoxic T cell 및 NK cell 등을 활성화하는데 반하여, Th2 cell에서 생성되는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및

IL-13 등은 B cell을 활성화시키고, 또한 상호간의 억제작용도 하게 된다^{33,34)}.

IL-2는 활성화된 CD4+ T lymphocyte에 의해 합성되어 lymphotoxin, INF- γ 및 LAK cell 등의 합성과 NK cell의 성장을 자극하는데^{35,36)}, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-2를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

IL-10은 monocyte, mast cell, macrophage, Th cell 및 B cell 등에 의해 분비되어 INF- γ , IL-2, IL-3, TNF- α 및 GM-CSF 등의 생성을 억제하는 반면에 B cell, mast cell 및 일부 T cell의 생성과 활성화에 관여하는데³⁷⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-10을 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

IL-12는 dendritic cell, macrophage 및 B cell 등에서 분비되어 T cell과 B cell을 활성화시켜 INF- γ 과 NK cell의 활성을 증가시키고, 그 중 IL-12p70은 면역반응에 있어서 더욱 중요한데³⁸⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-12p70을 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

TNF- α 는 macrophage와 fibroblast에 의해 분비되어 endothelial cell, neutrophil 및 B cell 등을 자극함으로써 chemokines, prostaglandins, proteases 및 growth factors 등의 분비를 촉진하는데³⁶⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 TNF- α 를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

GM-CSF는 mast cell, macrophage 및

T cell 등에서 분비되어 granulocyte의 성장과 감염부위에서 macrophage가 군집화 되도록 자극하는데^{39,40)}, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 GM-CSF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

M-CSF는 조골세포나 간엽줄기세포에서 생성되어 파골세포와 대형단핵세포의 생성에 관여하여 monocyte-macrophage 계열의 세포의 재조합에 중요한데⁴¹⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 M-CSF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

LIF는 IL-6에 속하고, 신경세포, 거대세포, 대식세포, 지방세포, 간세포, 골아세포, 근육아세포, 신장상피세포 및 유방상피세포 등에서 생성되어 CSF-1, IL-1 및 호르몬과 상호작용을 하여 autocrine 과 paracrine factors로서 착상과 초기임신유지에 중요한 역할을 하는데⁴²⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 LIF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

VEGF는 혈관의 형성과 증식에 관여하는 인자로서 악성종양의 급속한 성장과 전이에 영향을 주어 악성도와의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있는데⁴³⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 VEGF를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

IL-4는 T cell과 B cell을 자극하여 염증을 악화시키고, 악성종양에는 양면적인 작용을 하는 것으로 알려져 있는데

⁴⁴⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-4를 25와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 감소시켰다.

IL-5는 macrophage와 T lymphocyte의 활성화로 인해 분비되어 B lymphocyte와 eosinophil의 분화 및 성장에 관여하여 천식, 알러지, 자가면역질환 및 자궁경부암 등과 관련이 있는데^{45,46)}, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-5를 25, 50 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도에서 유의하게 감소시켰다.

IL-15은 활성화된 monocyte, 섬유세포, 근육세포 및 신장세포 등에서 생성되어 chemotaxis와 NK cell의 세포독성을 유도하고, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , T cell 및 B cell 등의 분비에 관여하는데⁴⁷⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-15를 25, 50 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도에서 유의하게 감소시켰다.

MIG는 혈관내피세포, 섬유아세포, macrophage, 간, 신장 및 심장 등에서 발현되어 면역계통 세포의 활성화와 다른 조직으로의 이동과 부착에 관련되어 있는데⁴⁸⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 MIG를 25, 50 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도에서 유의하게 감소시켰다.

IFN- γ 는 Th1에서 생성되어 IL-10의 생성을 억제하고, 면역기능을 증진한다고 알려져 있는데⁴⁹⁾, CF는 LPS에 의해서 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IFN- γ 를 25와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과, 木瓜 물추출물 CF는 RAW 264.7 cell에 유의한 세포독성을 유발하지 않은 반면에 LPS의 자극으로 유

의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 NO와 Ca를 모든 농도에서 억제함으로써 세포 내의 항염반응의 증진과 면역반응의 안정을 도모하는 효과가 있었다^{50,51}.

또한, CF는 LPS의 자극으로 유의하게 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-10, IL-12p70, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, LIF 및 VEGF 등의 다양한 cytokine들을 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의하게 감소시켰다.

이상의 연구에서 木瓜는 면역과 관련된 세포와 조직의 변화를 도모하여 염증성 반응으로 야기된 골반통의 다양한 원인에 응용될 수 있으리라 생각되고, 향후 특정 원인균, 자궁내막증, 자궁근종, 악성종양 및 자궁선근증 등의 실험모델에서 보다 정밀한 추후 연구가 필요하다고 사료되는 바이다.

V. 결 론

木瓜의 물추출물인 시료(CF)를 대상으로 마우스 대식세포(RAW 264.7 cell)의 세포생존율과 LPS로 유발된 NO, Ca 그리고 다양한 cytokine들의 생성증가에 대한 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CF는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 RAW 264.7 cell에 유의한 독성을 유발하지 않았으며, 오히려 세포생존율을 증가시켰다.
2. CF는 LPS에 의해서 유발된 RAW 264.7 cell의 NO 생성 증가를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.
3. CF는 LPS에 의해서 유발된 RAW

264.7 cell의 Ca 생성 증가를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

4. CF는 LPS에 의해서 유발된 RAW 264.7 cell의 IL-2, IL-10, IL-12p70, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, LIF 및 VEGF 생성증가를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.
5. CF는 LPS에 의해서 생성이 증가된 RAW 264.7 cell의 IL-4는 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서, IL-5, IL-15 및 MIG는 25, 50 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서, IFN- γ 는 25, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의한 감소를 나타내었다.

이상의 결과, CF는 RAW 264.7 cell에 유의한 세포독성을 유발하지 않으면서도 LPS로 유발된 RAW 264.7 cell의 IL-2, IL-10, IL-12p70, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, LIF, VEGF, NO 및 Ca의 생성 증가를 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의하게 감소하는 등 과잉염증반응을 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

투 고 일 : 2012년 07월 16일

심 사 일 : 2012년 08월 08일

게재확정일 : 2012년 08월 16일

참고문헌

1. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학. 서울:정담. 2004:167-204, 260-87.
2. Porpora MG et al. Celiac disease as a cause of chronic pelvic pain, dysmenorrhea, and deep dyspareunia.

- Obstet Gynecol. 2002;99(5 Pt 2): 937-9.
3. Moore J, Kennedy S. Causes of chronic pelvic pain. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2000;14(3): 389-402.
 4. 김동일, 이동규, 이태균. 만성골반통을 유발하는 골반출혈증후군의 임상에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2002; 15(2):115-24.
 5. 조형준, 이진용, 김덕근. 상백피가 항알러지 및 항염증반응에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2005;19(2):175-95.
 6. 유태무 등. 천연물의 항염증작용에 관한 연구. 응용약물학회지. 1998;6:269-75.
 7. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會 編著. 本草學. 서울:영림사. 1991:272-73.
 8. 이수정 등. 木瓜의 抗炎 및 免疫反應에 대한 實驗的 研究. 대한한방부인과학회지. 2008;21(4):36-48.
 9. 이태진 등. 木瓜, 虎杖根 및 乳香 추출물이 Raw 264.7cell에서 LPS로 유도된 nitricoxide 생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(3):603-8.
 10. 이태진 등. 木瓜, 虎杖根 및 乳香 추출물이 Raw 264.7cell에서 LPS로 유도된 MMP-9의 활성화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(1):37-42.
 11. Anderson GP, Lamar JD, Charles PT. Development of a Luminex based competitive immunoassay for 2,4,6-trinitrotoluene. Environ Sci Technol. 2007;41(8):2888-93.
 12. Djoba Siawaya JF et al. An evaluation of commercial fluorescent bead-based luminex cytokine assays. PLoS One. 2008;3(7):2535.
 13. Dupont NC et al. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. J Reprod Immunol. 2005;66(2):175-91.
 14. Khan SS et al. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. Cytometry B Clin Cytom. 2004;61(1):35-9.
 15. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울:정담. 1997:2188-208.
 16. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1995:71-104.
 17. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia:WBSaunders company. 1997:11, 25-26, 250-64, 397.
 18. 김창중, 서병세. 최신 일반병리학(4th). 서울:신일상사. 2004:145-68.
 19. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. J Autoimmun. 2007;28(1):1-6.
 20. 채우석. 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察. 대한한의학회지. 1990;11(2):54-91.
 21. 임은미, 이시형. 한의학에서 살펴본 면역의 개념-원전을 통한 면역개념의 존재와 확인(면역과 한방의 재정리). 대한한의정보학회지. 2006;12(1): 129-45.
 22. 홍원식. 精校黃帝內經. 서울:東洋醫學研究院. 1981:13, 69, 318.
 23. 손수곤, 김중수, 박원환. 腎俞穴의 鍼

- 刺戟과 黃芪藥鍼이 실험용 생쥐의 免疫活性物質 IL-1 β 의 遺傳子發顯에 미치는 影響. 대한한의학회지. 2000; 21(4):16-25.
24. 정연희, 유동렬. 加味補兒湯의 免疫調節作用에 대한 實驗的 研究. 대한한방소아과학회지. 2000;14(2):61-83.
25. 송채석, 박은정, 정규만. 地榆湯加 枳實이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 대한한방소아과학회지. 1992;6(1):15-32.
26. 이승연, 김장현. 蓼朮健脾湯이 흰쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 대한한방소아과학회지. 1988;12(1):257-76.
27. 나도균, 박양춘. 加味地黃湯이 천식 모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2008;29(2):7-20.
28. 송중석 등. 加味補中益氣湯이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2006;19(4):1-16.
29. 이병렬, 안병철. 四君子湯 및 四物湯藥鍼이 免疫反應에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1997;18(1):357-74.
30. 임은미. 여성분초학. 서울:전국의학사. 2005:131-2.
31. Lehnardt S, Massillon L, Follett P. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(14):8514-9.
32. Martin L et al. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. J Pharmacol Exp Ther. 2006; 316(1):71-8.
33. Salgame P et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. Science. 1991;254(5029):279-82.
34. Mahanty S et al. Parallelregulation of IL-4 and IL-5 in human helminth infections. J Immunol. 1992;148(11): 3567-71.
35. Samua D, Michea P, Lennon-Duménil AM. Interleukin-4 Selectively Inhibits Interleukin-2 Secretion by Lipopolysaccharide-Activated Dendritic Cells. Scandinavian Journal of Immunology. 2004;59(2):183-9.
36. 김윤희. 사이토카인의 종류와 기능에 관한 연구. 전주기전여자대학논문집. 2000;20:271-85.
37. Goldsby RA et al. Immunology 5th ed. New York:WH Freeman and Company. 2005:281.
38. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 2003;3(2):133-46.
39. Geijsen N, Koenderman L, Coffey PJ. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. Cytokine Growth Factor Rev. 2001;12(1):19-25.
40. Doyle SE, Gasson JC. Characterization of the role of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha sub unit in the

- activation of JAK2 and STAT5. *Blood*. 1998;92(3):867-76.
41. Osdoby P et al. Osteoclast development the cell surface and the bone environment. *Ciba Found Symp*. 1988;136:108-24.
42. 고승희, 황정혜, 장세진. 황체기 결함이 있는 불임환자에게 클로미펜 투여 후 자궁내막에서의 Leukemia inhibitory factor (LIF)의 발현. *대한산부인과 학회지*. 2003;46(11):2221-6.
43. Guidi AJ et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(16):1237-45.
44. Olver S et al. The duplicitous effects of interleukin 4 on tumour immunity: how can the same cytokine improve or impair control of tumour growth? *Tissue Antigens*. 2007;69(4):293-8.
45. Sender RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:635-73.
46. van Driel WJ et al. Presence of an eosinophilic infiltrate in cervical squamous carcinoma results from a type 2 immune response. *Gynecol Oncol*. 1999;74(2):188-95.
47. Bamford RN et al. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(11):4940-4.
48. Farber JM. HuMIG: a new human member of the chemokine family of cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;192(1):223-30.
49. Sypek JP et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med*. 1993;177(6):1797-802.
50. Albina JE et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophage. *J Immunol*. 1993;150(11):5080-5.
51. Fehsel K et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol*. 1995;155(6):2858-65.