

사백산 물 추출물과 30% EtOH 추출물의 항염증 효과 비교연구

이동성*[†] · 최현규**^{*,†} · 김경수**^{*,†} · 김동철*** · 민홍기*** ·
리빈* · 김종수*** · 박준형*** · 오현철***[#] · 김윤철****^{*,#}

*원광대학교 한방체액조절연구센터, **원광대학교 약학대학 천연물신약표준화소재은행, ***원광대학교 약학대학
(Received May 25, 2012; Revised August 1, 2012; Accepted August 12, 2012)

The Comparison between Sabaek-san Water and 30% EtOH Extracts for Anti-inflammatory Effects

Dong-Sung Lee*[†], Hyun-Gyu Choi**^{*,†}, Kyoung-Su Kim**^{*,†}, Dong-Cheol Kim***, Hong-Ki Min***,
Bin Li*, Jong-Su Kim***, Jun-Hyeong Park***, Hyuncheol Oh***[#] and Youn-Chul Kim****^{*,#}

*Hanbang Body-Fluid Research Center, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

**Standardized Material Bank for New Botanical Drugs, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

***College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract — Sabaek-san has been used for the treatment of inflammatory diseases derived from the cold with high fever, cough, and lung dysfunction in Korea and China. There is no study for the comparison between different solvent extracts of Sabaek-san. We made two samples, one is Sabaek-san water extract (SBSW) and the other is Sabaek-san 30% EtOH extract (SBSE). Both extracts inhibited inducible nitric oxide synthase(iNOS) protein, reduced iNOS-derived nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells. Also, they reduced tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) production. These anti-inflammatory effects caused by induction of heme oxygenase (HO)-1. HO-1 enzyme plays an important role of cellular anti-oxidant and anti-inflammatory systems. The induction of HO-1 is primarily regulated at the transcriptional level, and its induction by various inducers is related to the nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2). However, it is worth taking note that SBSE has more powerful anti-inflammatory effects than SBSW. In this study we suggest that different solvent extraction makes different therapeutic actions.

Keywords □ Sabaek-san, solvent extraction, anti-inflammation, heme oxygenase-1, RAW264.7 cells

대표적 대식세포인 RAW264.7을 포함한 대식세포나 단핵구(monocyte)에 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하였을 때, inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase(COX)-2 등의 효소를 발현시켜 염증관련 인자인 nitric oxide(NO)와 prostaglandin E2(PGE₂)를 각각 생성한다. iNOS는 염증 반응을 보이는 대식세포에서 NO를 생성하여 염증 반응을 조절하는 중요한 역할을 하는 효소로, iNOS의 신호에 의해 발생된 소량의 NO는 체내에서 혈액순환을 촉진하거나 면역반응 증강 등 긍정

적인 작용을 하지만 외부 자극 또는 자가면역으로 인한 과도한 분비는 염증 반응을 촉진시켜 다양한 염증성 질환을 야기하므로 iNOS의 발현 및 그에 따른 NO생성의 조절은 염증 억제에 중요하다.¹⁾ 또한, 대식세포에서 LPS 처리시 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), interleukin(IL)-1 β , IL-6 등의 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 증가시킨다고 보고 되었다.^{3,5)} TNF- α 는 염증의 주요한 개시인자로서 조직 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. TNF- α 는 혈관 내피세포의 표면 부착인자의 발현을 유도하여 백혈구나 대식세포를 염증 병소로 모이게 한다. 이러한 염증성 생성물들은 감염초기에는 세균을 죽이거나 종양을 제거하는 등의 중요한 역할을 하지만, 병리적 요인들로 인한 과도한 발현은 오히려 만성적 염증을 유발시켜 조직의 손상과 유전자 변이 및 신경손상을 초래한다.

항염증 작용을 나타내는 여러 가지 메커니즘 중에서 최근 주

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로

Youn-Chul Kim, (전화) 063-850-6823 (팩스) 063-852-8837
(E-mail) yckim@wku.ac.kr

Hyuncheol Oh, (전화) 063-850-6815 (팩스) 063-852-8837
(E-mail) hoh@wku.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

목 받고 있는 heme oxygenase(HO)는 세포의 항산화 시스템에서 중요한 역할을 담당하는 단백질로서, HO 유도체들 중 유도 가능한 형태인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, billiverdin/bilirubin의 세가지 생성물을 만든다.⁶⁾ 이렇게 분해된 세가지 형태의 생성물들과 HO-1 그 자체는 세포손상 및 사멸의 억제,^{7,8)} 항염증⁹⁾ 및 항산화^{10,11)} 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 항염증 작용은 주로 billiverdin/bilirubin과 일산화탄소에 의한 것임이 보고 되었다. Nuclear factor-E2 related factor 2(Nrf2)의 핵 내로의 전사는 HO-1 단백질 발현에 관여하는 여러 메커니즘 중 매우 큰 부분을 차지하는 인자로 알려져 있다. 전사 인자로서의 Nrf2는 HO-1을 포함하는 항산화 또는 항염증 유전자에 존재하는 antioxidant response element(ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 유도하여 생체방어기전의 핵심적 역할을 담당한다.^{12,13)}

사백산(瀉白散)은 송대(宋代) 전을(錢乙)의 저서 소아약증직결(小兒藥證直訣)¹⁴⁾에 처음 수록된 처방으로 청사폐열(淸瀉肺熱), 평천지해(平喘止咳)의 효능을 지녀, 폐열(肺熱)(폐열이 있으면 기침하고 추웠다 열이 나며 높은 열이 나면서 물을 많이 마시고 숨이 차며 가슴이 답답하고 오른쪽 뺨이 붉다)로 해수(咳嗽)가 심하여 기급(氣急)하고 피부증열(皮膚蒸熱)하며 오후에 발열이 더욱 심하고 설홍대황(舌紅苔黃), 맥세삭(脈細數) 한 증상을 치료하는데 사용되어 왔다.^{15,16)} 사백산 처방은 상백피(桑白皮), 지골피(地骨皮), 감초(甘草)의 세 가지 약재로 구성되어 있다. 지골피는 구기자나무 *Lycium chinense* Mill.(가지과 Solanaceae)의 뿌리껍질로 해열, 혈압강하,¹⁷⁾ 혈당강하 작용이 알려져 있어 결핵에 의한 조열(潮熱), 골증열, 기침, 토혈, 번열소갈(煩熱消渴), 고혈압, 악성 종기에 쓰인다. 상백피는 뽕나무 *Morus alba* L.(뽕나무과 Moraceae)의 뿌리껍질로 이뇨, 혈압강하, 혈당강하,^{18,19)} 항균,²⁰⁾ 미백,²¹⁾ 항염증²²⁾ 작용이 있어 소염성 이뇨와 해열, 진해약으로 기관지염, 천식 등에 쓰인다. 감초는 유럽감초 *Glycyrrhiza glabra* L., 만주감초 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.(콩과 Leguminosae)의 뿌리와 주출경(走出莖)을 그대로 또는 주피를 제거 한 것으로 항염증, 진경 작용이 있어 진해거담약, 진경약, 소화기 궤양치료약 등으로 광범위하게 쓰인다.²³⁾

본 연구에서는 사백산의 이러한 한의약학적 쓰임 중 하나인 항염증 작용의 과학적인 근거를 제시하고자 하였다. 또한, 저자들은 한방 처방들이 주로 전통적인 방법인 열수 추출물 형태로 임상적으로 이용되고 있으나, 한방 처방을 함수 알코올을 용매로 사용하여 가열 추출할 경우 추출 효율의 증대 등에 따른 추출물의 조성의 차이에 의한 효능의 변화를 예측하였다. 즉, 사백산의 물 추출물과 효능 비교를 위해 제조한 사백산 30% EtOH 추출물간의 항염증 효과가 차이를 보이는지를 생쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포주를 사용하여 비교하였다.

재료 및 방법

시료의 제조

본 실험에 사용한 사백산 처방의 약재들은 2011년 8월 익산 시 신용동 소재 대한한약국에서 구입하였으며, 형태학적 평가를 통하여 동정하였고 천연물신약표준화소재은행에 보관하였다. 사백산 처방의 약재는 방제학²⁴⁾의 처방을 토대로 지골피(*Lycii Radicis Cortex*) 30 g, 상백피(*Mori Radicis Cortex*) 30 g, 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 3 g의 조성으로(Table I) 하였다. 10배량의 증류수와 30% 에탄올을 각각 사용하여 가열 환류추출한 후 열시에 여과하고 여액을 감압농축하여 사백산 물 추출물(12.3 g, SBSW)과 사백산 30% 에탄올 추출물(15.6 g, SBSE)을 얻고, 추출물은 천연물신약표준화소재은행에 등록(SBSW: NNMB000291-1, SBSE: NNMB000292-1)하였다. 각 시료를 2.5 mg/ml의 농도로 메탄올에 용해시켜 검액을 만들고, 10 μ l씩 silica gel TLC plate에 점적하여 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}(4 : 1 : 0.1)$ 의 용매 조건으로 전개시키고 이를 10% 황산 발색하여 나타난 반점을 비교하였다. SBSE에서는 R_f 값이 각각 0.63, 0.72, 0.87 인 지점에서 SBSW에서는 보이지 않는 반점들이 관찰되었다.

시약 및 기기

DMEM 배지와 fetal bovine serum(FBS)를 포함한 세포 배양에 필요한 시약들은 Gibco Laboratories사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였으며, 96-well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 기타 언급하지 않은 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용된 iNOS의 1차 항체와 이에 결합하는 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. TNF- α , IL 1- β 를 측정하는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다.

HPLC 분석 - 본 연구에서 사용한 사백산 물 추출물(SBSW)과 사백산 30% 에탄올 추출물(SBSE)은 HPLC를 사용하여 함유 성분의 패턴을 분석하였다. 사용한 HPLC 장치는 Sykam S2100 system(Sykam, 독일)이었으며, 컬럼은 Inertsil ODS-3 (GL Sciences Inc., 4.6 \times 150 m, 5 μ m, 일본)를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile, methanol(JT Baker, 미국)을 사용하였으며, 온

Table I - The composition of Sabaek-san

한약명	생약명	조제량(g)
지골피	<i>Lycii Radicis Cortex</i>	30
상백피	<i>Mori Radicis Cortex</i>	30
감초	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3

도는 실온이었으며, 유속은 분당 1.0 ml이었다. 크로마토그램은 Sykam S3200 UV/VIS Detector(Sykam, 독일)를 이용하여 254 nm에서 검출하였다. 이동상 용매로는 0.1% formic acid in water를 A용매, methanol을 B용매로 하고, solvent B의 비율을 10%에서 40%(40 min), 40%에서 100(20 min)로 순차적으로 조절하였다. SBSW와 SBSE를 각각 20 mg을 정확히 취하고 50% methanol 20 ml에 녹인 후 30 μ l씩을 주입하였으며, 실험은 3회 반복하였다.

Western blot analysis

RAW264.7 세포를 60 mm dish에 3×10^5 cells/well 밀도로 24 시간 배양한 후 각각의 시료를 농도별 또는 시간 별로 처리 하였다. RAW264.7 세포에 RIPA buffer를 첨가한 다음, 4°C, 14,000 \times g 에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 nitrocellulose membrane(NC membrane)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% 무지방유가 포함된 신선한 blocking buffer (0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 blocking한 후 HO-1 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응 시켰다. 다시 2차 antibody(Anti-mouse IgG)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액을 1:1로 잘 섞어서 NC membrane 위에 가하여 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 actin antibody를 이용하여 actin을 측정한다.

핵과 세포질 분획의 분리

RAW264.7 세포에 protease inhibitor cocktail I과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)를 첨가한 PER-mammalian protein extraction buffer를 첨가하여 균질화하고 4°C에서 15,000 \times g로 원심분리 하였다. 10분간 원심분리 후 상등액을 세포질 분획으로 사용하기 위하여 -80°C에서 저장하였다. 나머지 침전물은 PBS로 세척한 후 RIPA buffer[150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 50mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 20 mM ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na_3VO_4 , protease inhibitors]를 첨가하고 4°C에서 15분간 혼합한 후 4°C, 16,000 \times g에서 15분간 원심분리 하였다. 이후의 과정은 앞에서 설명한 western blotting 방법을 이용하였다.

Nitrite assay

배양된 세포를 5×10^5 cells/well 수준으로 96 well plate에 100 μ l씩 접종한 다음 24시간 동안 배양하고, 24시간 후 medium

을 제거한 후 DMEM으로 희석된 각 농도별 시료를 처리한 후 LPS(1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 후 세포에서 media로 방출되어 나온 NO의 양을 Griess 시약[0.1% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid]을 사용하여 반응하였다. 반응 후 ELISA micro plate reader(Bio Rad Laboratories Inc., California, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정 하였다.

TNF- α and IL-1 β assay

TNF- α 와 IL-1 β 의 측정은 항체(lyophilized TNF- α or IL-1 β conjugate to horseradish peroxidase)를 사용하여 enzyme-immunoassay system kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 측정하였다.

통계처리

본 실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준 ($p < 0.05$)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

결 과

사백산 추출물의 HPLC 분석

사백산 물 추출물(SBSW)과 사백산 30% EtOH 추출물(SBSE)의 HPLC chromatogram을 비교한 결과, 두 가지 추출물은 유사한 HPLC pattern을 나타냈으나, Rt 21.508 min의 peak는 SBSW보다 SBSE에서 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 1). SBSW와 SBSE의 HPLC chromatogram이 약간 다른 Rt치를 나타냈기 때문에 이 두 시료를 각각 동량 혼합하여 HPLC를 실시하여 Rt 21.508 min의 peak가 동일한 성분에 의한 것을 확인하였다.

사백산 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

SBSW와 SBSE가 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 두 추출물을 최저 농도 50 μ g/ml부터 최고농도 800 μ g/ml까지 24시간 동안 처리하였다. 이후의 모든 실험은 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 400 μ g/ml를 최고 농도로 하여 진행 하였다(Fig. 2).

추출용매에 따른 사백산 추출물의 iNOS 발현 억제 효과

추출용매에 따른 사백산 추출물의 iNOS 발현 양상을 western blot으로 확인한 결과, SBSW는 최고농도인 400 μ g/ml에서만 LPS

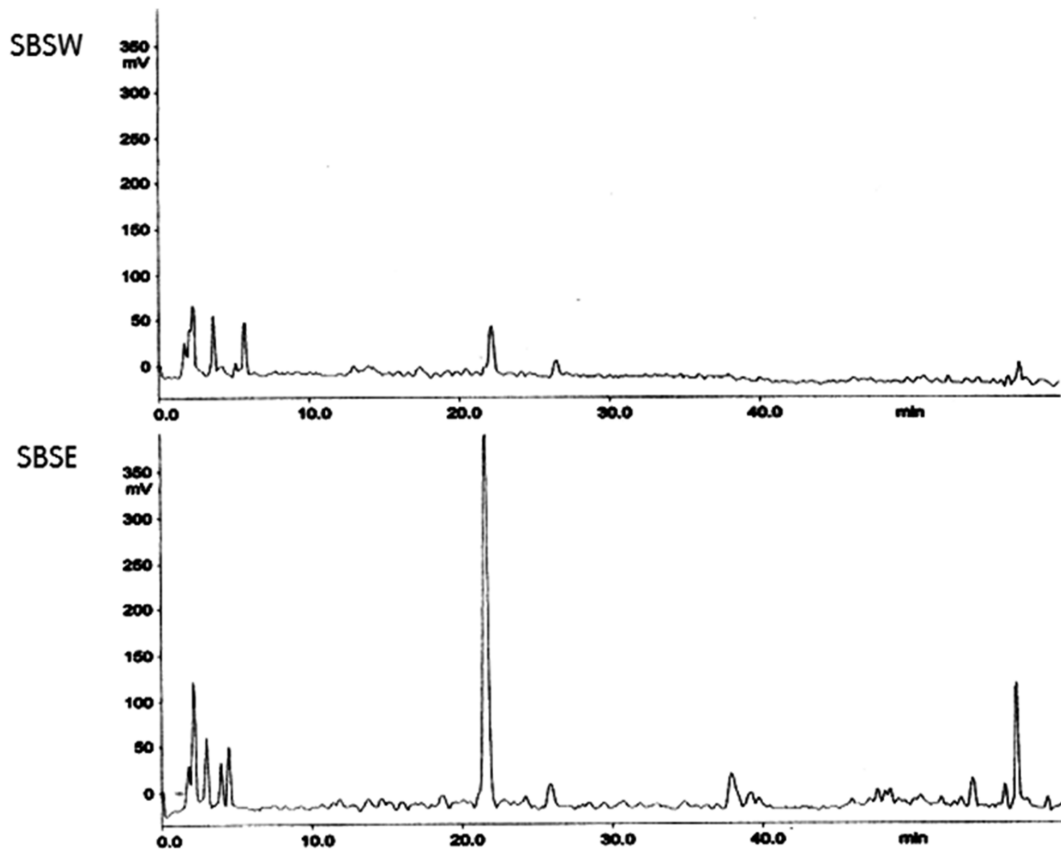


Fig. 1 – HPLC chromatograms of SBSW and SBSE.

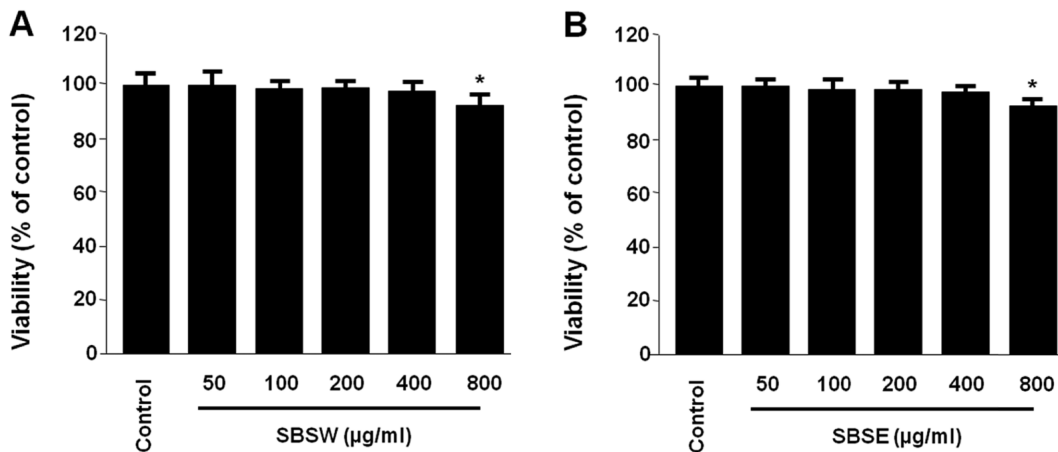


Fig. 2 – Effect of SBSW and SBSE on viability of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated for 24 h with various concentrations of Sabaek-san extracts (50~800 µg/ml). Cell viability was determined as described under materials and methods. Data represent the mean values of three experiments±SD. **p*<0.05 compared to control.

치리로 유도된 iNOS 발현에 약간의 감소 효과를 보이나 그 효과가 미미하였다. 반면 SBSE는 100 µg/ml에서부터 눈에 띄는 발현 감소를 나타내었고, 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 그 발현이 감소하여 최고농도인 400 µg/ml에서는 그 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다(Fig. 3).

추출용매에 따른 사백산 추출물의 NO 생성 억제 효과

추출용매에 따른 사백산 추출물을 12시간 전처리 후, LPS를 1 µg/ml 농도로 처리하여 24시간이 경과한 후 NO의 생성 양을 확인하였다. SBSW의 농도가 증가함에 따라 LPS 처리로 유도된 NO 생성 양이 감소하는 것을 볼 수 있으나 그 감소 정도가 극히 미

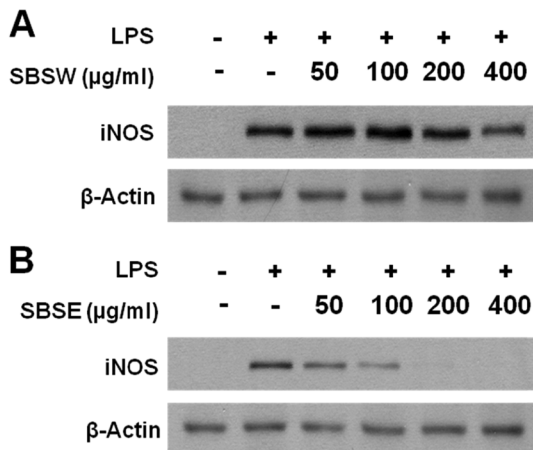


Fig. 3 – Effects of SBSW and SBSE on expression of iNOS proteins in RAW264.7 cells stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of Sabaek-san extracts and 18 h with LPS (1 μg/ml). Western blot analysis was performed as described in materials and methods, and representative blots of three independent experiments are shown.

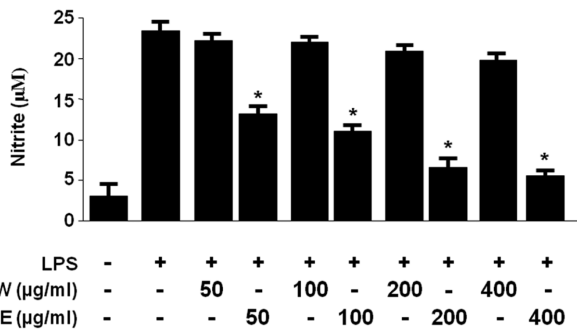


Fig. 4 – Effects of SBSW and SBSE on nitrite production in RAW264.7 cells stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of Sabaek-san extracts and stimulated 18 h with LPS (1 μg/ml). The concentration of nitrite was determined as described under materials and methods. Data represent the mean values of three experiments ±SD. **p*<0.05 compared to the group treated with LPS.

미하였다. 반면 SBSE는 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 NO 생성 양이 감소하였고, 최고농도인 400 μg/ml에서는 control 그룹에 근접한 정도의 생성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4).

추출용매에 따른 사백산 추출물의 TNF-α 및 IL-1β 생성 억제 효과

추출용매에 따른 사백산 추출물의 pro-inflammatory cytokine 인 TNF-α 및 IL-1β의 생성 억제 효과를 확인하였다. TNF-α와 IL-1β 모두 SBSW보다 SBSE에서 그 생성 억제 효과가 현저하게 나타났고, 농도 의존적으로 TNF-α와 IL-1β 모두 생성이 감소하였다(Fig. 5).

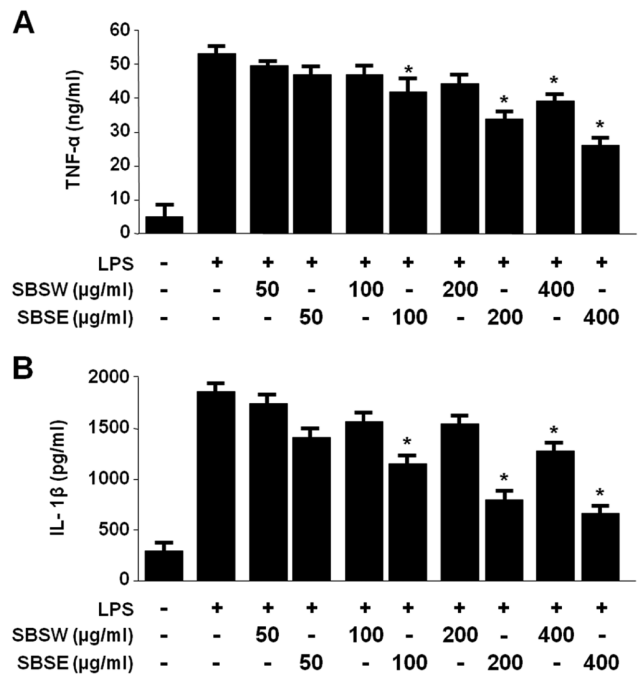


Fig. 5 – Effects of SBSW and SBSE on TNF-α (A), IL-1β (B) production in RAW264.7 cells stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of Sabaek-san extracts and stimulated 18 h with LPS (1 μg/ml). The concentration of TNF-α (A), IL-1β (B) were determined as described under materials and methods. Data represent the mean values of three experiments ±SD. **p*<0.05 compared to the group treated with LPS.

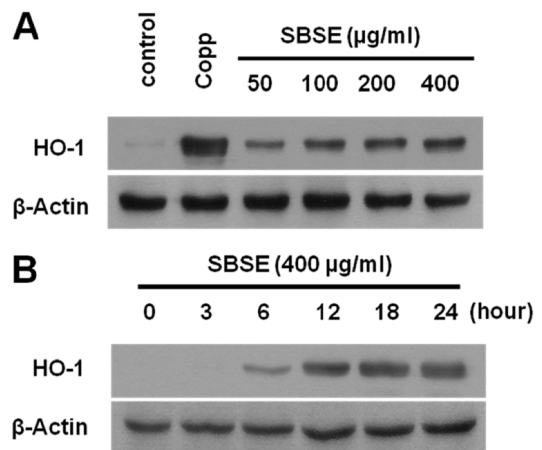


Fig. 6 – Effects of SBSE on HO-1 expression in RAW264.7 cells. Cells were incubated for 12 h with indicated concentrations of SBSE (A) and periods with 400 μg/ml of SBSE (B). The HO-1 inducer Copp increased HO-1 expression at 20 μM. Western blot analysis for HO-1 expression was performed as described in materials and methods and representative blots of three independent experiments are shown.

SBSE의 HO-1 발현 유도 효과

SBSE의 이러한 항염증 효과가 강한 항산화와 항염증 작용을

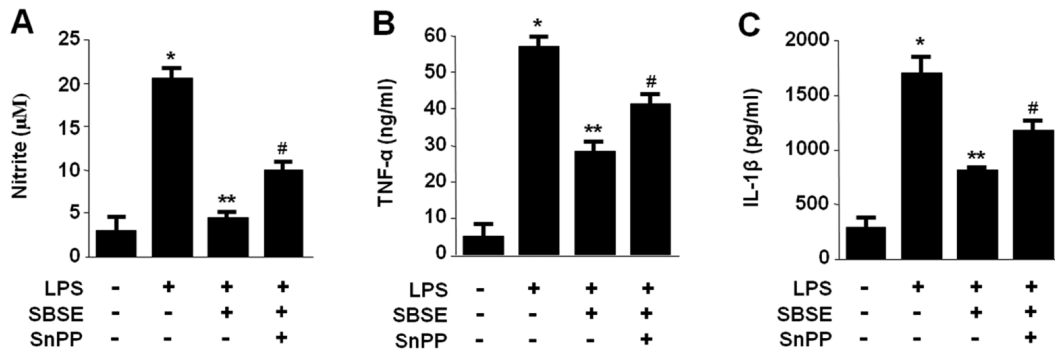


Fig. 7 – Effects of SnPP on inhibition of nitrite (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) production by SBSE pre-treatment of LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were pre-treated for 12 h with SBSE (400 μ g/ml) in the presence or absence of SnPP (50 μ M), and stimulated for 18 h with LPS (1 μ g/ml). The concentrations of nitrite (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) were determined as described in materials and methods. Data represent mean values of three experiments \pm SD. * p < 0.05 compared to the control group; ** p < 0.05 compared to the group treated with LPS alone; # p < 0.05 compared to the group treated with SBSE plus LPS.

나타내는 것으로 알려진 HO-1 단백질의 발현에 의한 것인지 알아보기 위하여, SBSE를 농도별로 처리하고, HO-1의 발현을 확인하였다. 그 결과 400 μ g/ml에서 가장 많은 HO-1 발현을 나타내었다(Fig. 6A). SBSE의 처리 시간에 따른 HO-1의 발현 양상을 관찰한 결과, SBSE를 처리한지 3시간 후부터 발현이 시작되어 18시간 후에 가장 많이 발현되었다(Fig. 6B). 이러한 HO-1 유도가 SBSE의 항염증 효과와 직접적인 연관성이 있는지 확인하기 위하여 HO activity의 선택적 억제제인 SnPP를 SBSE와 함께 처리하였다. LPS의 처리로 인해 생성된 NO, TNF- α 와 IL-1 β 의 pro-inflammatory mediator가 SBSE의 처리로 인해 억제되었으나, SBSE와 SnPP를 함께 처리하였을 때는 SBSE로 인해 억제되었던 pro-inflammatory mediator의 생성이 다시 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 7).

SBSE의 처리에 의한 Nrf2의 핵 내로의 전사

SBSE의 처리에 의한 Nrf2의 핵 내로의 전사 여부를 알아보기 위하여 400 μ g/ml 농도의 SBSE를 시간별로 처리하고 Western blot을 이용하여 분석하였다. 시간이 경과함에 따라 세포질의 Nrf2는 점점 감소하는 반면, 핵 내부의 Nrf2는 증가하는 것으로 보아 SBSE의 처리로 인하여 Nrf2의 핵 내로의 전사가 이루어졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

사백산은 지골피(Lycii Radicis Cortex), 상백피(Mori Radicis Cortex), 감초(Glycyrrhizae Radix) 세 가지 약재로 구성된 처방으로, 개개의 약재 별 항염 효과나 혈압강하, 해열, 진통 등의 효과를 지녀 그 처방은 청사폐열과 평천지해의 효능을 지녔다.^{15,16} 지금까지 사백산에 대한 효능 연구는 거의 이뤄지지 않았으며, 또한 추출 용매에 따른 효능 차이에 대한 비교 연구는 본 연구가 처음이다. 따라서, 본 연구에서는 사백산의 항염 효과와 그 작용 기전과 추출 용매에 따른 항염증 활성 차이를 알아보려고 하였다.

염증(inflammation)이란 생체나 조직에 물리적 충격이나 화학 물질, 세균감염 등과 같은 생화학적 자극에 의해 발생된 손상부위의 정상상태로의 복구 및 재생을 목표로 하는 생체 방어 반응의 하나로 조직변질, 순환장애와 조직증식 등의 생체 변화를 수반한다. 염증은 외부로부터의 유해물질이나 화학적 자극에 의한 손상뿐 아니라 신체 내부로부터의 자극에 의해서도 유발될 수 있으며, 염증 반응 시에는 다양한 염증매개인자들(pro-inflammatory mediators)이 유도되어 발적, 발열, 종창, 동통, 가려움, 기능장애 등의 임상 증상이 나타나게 된다.²⁵ Nitric oxide(NO)는 면역계를 포함한 많은 조직에서 생리학적, 병리학적으로 그 중요성이 잘 알려져 있다. NO는 nitric oxide synthases(NOS)에 의해 생

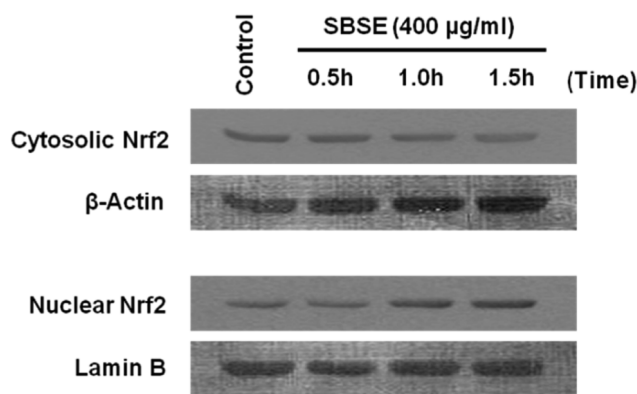


Fig. 8 – Effects of SBSE on nuclear translocation of Nrf2 in RAW264.7 cells. Macrophages were treated with 400 μ g/ml of SBSE for 0.5, 1.0, and 1.5 h. The nuclei were fractionated from the cytosol using PER-Mammalian Protein Extraction buffer as described in materials and methods. Nrf2 protein was detected by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown.

성되는데, neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)와 같은 3종류의 이성체 형태가 존재한다. 림프 조직에서 주로 iNOS의 형태로 존재하고, 대식세포에서 그 발현이 많다고 알려져 있다. iNOS는 발현이 유지되는 eNOS와 nNOS와는 달리, IFN- γ , TNF- α 등의 cytokine 또는 LPS 등의 면적학적 자극에 의해 반사적으로 유도되어 NO를 생성한다.²⁶⁻²⁸⁾

추출용매에 따른 사백산 추출물의 iNOS 발현 양상을 western blot으로 확인한 결과, SBSW는 LPS 처리로 유도된 iNOS 발현에 미미한 감소 효과를 보이는 반면 SBSE는 100 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서부터 발현 감소를 나타내었고, 농도 의존적으로 그 발현이 감소하여 최고농도인 400 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서는 그 발현이 현저하게 감소하였다. NO의 생성 역시 iNOS의 발현 양상과 유사하게 SBSW보다 SBSE가 뛰어난 억제 효과를 나타내었다. Pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 및 IL-1 β 의 생성 억제 효과 모두, SBSW보다 SBSE에서 그 생성 억제 효과가 현저하게 나타났다. SBSE의 항염 작용 기전이 HO-1의 발현 유도에 기인하는지 알아보기 위하여 SBSE를 농도별, 시간별로 처리하여 HO-1의 발현 여부를 western blot으로 확인하였을 때, SBSE의 농도가 증가함에 따라 HO-1의 발현이 증가하였다. SBSE의 HO-1 발현 유도가 항염 효과와 직접적인 연관성을 가지는지를 알아보기 위하여, HO activity inhibitor인 SnPP를 SBSE와 처리하여 pro-inflammatory mediator들의 생성 억제 효과에 영향을 미치는지 알아보았을 때, SBSE 처리로 인한 pro-inflammatory mediator들의 생성 억제 효과가 SnPP를 처리하였을 때는 부분적으로 반전하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 사백산 30% EtOH 추출물(SBSE)의 항염 효과가 부분적으로 HO-1의 발현에 의한 것임을 보여준다. 한편, HO-1과 같은 제 2상 대사 효소의 발현에 의한 해독작용의 메커니즘 중에서 Nrf2의 세포질에서 핵 내로의 전사가 매우 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있는데, 전사인자인 Nrf2는 다양한 해독작용 유전자와 항산화 유전자의 발현을 조절한다. 세포질 내에서 Keap1 단백질에 의해 억제되어있던 Nrf2는 외부의 자극이나 산화적 스트레스에 의해서 Keap1 단백질에서 떨어져 나와 핵 내로 전사가 이루어 진다. 핵 내에서 Nrf2는 small Maf 단백질과 이합체를 형성하여 ARE에 결합해 항산화 유전자의 발현과 단백질 생성을 유도 함으로써 생체 방어기전을 활성화 시킨다.²⁹⁻³¹⁾ SBSE 처리에 의한 HO-1의 발현은 Nrf2의 핵 내로의 전사에 기인한 것임을 확인하였다.

본 연구결과 사백산은 항염 효과가 우수하게 나타났으며, 이러한 효과는 HO-1 발현이 관여한다는 것을 확인하였다. 또한, 기존 한약처방인 사백산의 추출용매에 따른 항염 활성 차이를 비교한 결과 사백산 물 추출물 보다 30% EtOH 추출물이 더욱 우수한 항염 활성을 갖는 것을 확인하였다. 이러한 추출 용매의 변화에 따른 활성의 차이는 기존 한약처방의 극대화된 치료효과를 얻을 수 있는 하나의 대안이 될 수 있을 것으로 판단된다. 한편,

사백산 물 추출물(SBSW)과 사백산 30% EtOH 추출물(SBSE)의 HPLC chromatogram을 비교한 결과, Rt 21.508 min의 peak가 SBSW보다 SBSE에서 높게 나타나는 것 외에는 서로 유사한 HPLC pattern을 보였다. 두 추출물의 항염증 효력의 차이는 일부 물질들의 추출율의 차이에 의한 것으로 추정되지만, 사백산이 항염 효과를 나타내는 다른 기전 및 용매 차이에 따른 주요 활성 물질에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

사백산의 한의약학적 응용 중의 하나인 항염증 작용에 대한 과학적 근거의 제시와 추출용매의 차이에 따른 항염증 효력의 변화를 비교하고자 사백산 물 추출물(SBSW)과 사백산 30% EtOH 추출물(SBSE)을 사용하여 실험하였다. RAW264.7 세포에서 LPS 처리로 iNOS 단백질 발현과 그에 따른 NO 및 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 생성을 유도하였고, SBSW와 SBSE의 전 처리가 대식세포에 미치는 염증 억제 효과를 살펴본 결과, SBSE의 RAW264.7 세포에서 LPS로 유발한 iNOS 단백질 발현과 그에 따른 NO, TNF- α 와 IL-1 β 생성 억제 효과가 SBSW에 비하여 매우 우수함을 확인하였고, 이러한 항염증 효과는 HO-1의 발현 유도에 기인한 것임을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 20110028274).

참고문헌

- 1) Wheeler, M. A., Smith, S. D., Garcia-Cardena, G., Nathan, C., Weiss, R. M. and Sessa, W. C. : Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **99**, 110 (1997).
- 2) Hempel, S. L., Monick, M. M. and Hunninghake, G. W. : Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Clin. Invest.* **93**, 391 (1994).
- 3) Remick, D. G., Strieter, R. M., Eskandari, M. K., Nguyen, D. T., Genord, M. A., Raiford, C. L. and Kunkel, S. L. : Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am. J. Pathol.* **136**, 49 (1990).
- 4) Hsu, H. Y. and Wen, M. H. : Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 22131 (2002).
- 5) Yoshimoto, T., Nakanishi, K., Hirose, S., Hiroishi, K.,

- Okamura, H., Takemoto, Y., Kanamaru, A., Hada, T., Tamura, T. and Kakishita, E. : High serum IL-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and IL-1/tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **148**, 3596 (1992).
- 6) Morse, D. and Choi, A. M. : Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 8 (2002).
- 7) Deng, Y. M., Wu, B. J., Witting, P. K. and Stocker, R. : Probulcol protects against smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1. *Circulation* **110**, 1855 (2004).
- 8) Choi, B. M., Pae, H. O., Jeong, Y. R., Oh, G. S., Jun, C. D., Kim, B. R. and Chung, H. T. : Overexpression of heme oxygenase (HO)-1 renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 858 (2004).
- 9) Kapturczak, M. H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T. M. and Atkinson, M. A. : Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am. J. Pathol.* **165**, 1045 (2004).
- 10) Clark, J. E., Foresti, R., Green, C. J. and Motterlini, R. : Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem. J.* **348**, 615 (2000).
- 11) Llesuy, S. F. and Tomaro, M. L. : Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta.* **1223**, 9 (1994).
- 12) Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S. and Yamamoto, M. : Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**, 16023 (2000).
- 13) Lim, H. J., Lee, K. S., Lee, S., Park, J. H., Choi, H. E., Go, S. H., Kwak, H. J. and Park, H. Y. : 15d-PGJ2 stimulates HO-1 expression through p38 MAP kinase and Nrf-2 pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **223**, 20 (2007).
- 14) 錢乙 : 小兒藥症直決. 北京, 中國醫藥科技出版社. pp. 109-120 (1998).
- 15) 李尙仁 : 漢藥臨床應用. 서울, 成輔社. pp. 63-66, 225-227, 308-313 (1978).
- 16) 毀苦寒 : 中醫類方辭典. 天津大學出版社. pp. 160-163 (1995).
- 17) Funayama, S., Yoshida, K., Konno, C. and Hikino, H. : Structure kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium chinense* root barks. *Tetrahedron Letter.* **21**, 1355 (1980).
- 18) Hikino, H., Mizuno, T., Oshima, Y. and Konno, C. : Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glycoprotein of *Morus alba* root barks. *Planta. Med.* 159 (1985).
- 19) Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. : N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* **259**, 243 (1994).
- 20) Park, K. M., You, J. S., Lee, H. Y., Baek, N. I. and Hwang, J. K. : Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 181 (2003).
- 21) Shin, N. H., Ryu, S. Y., Choi, E. J., Kang, S. H., Chang, I. M., Min, K. R. and Kim, Y. : Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 801 (1998).
- 22) Hong, C. H., Hur, S. K., Oh, O. J., Kim, S. S., Nam, K. A. and Lee, S. K. : Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.* **83**, 153 (2002).
- 23) 생약학교재편찬위원회 : 생약학. 서울, 동명사. pp. 104-107, 366-367, 527-530 (2007).
- 24) 韓醫科大學 方劑學教授 共編著 : 方劑學. 永林社. pp. 198-199 (1999).
- 25) Mariathasan, S. and Monack, D. M. : Inflammation adaptors and sensors; intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 31 (2007).
- 26) Bogdan, C. : Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907 (2001).
- 27) MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. : Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323 (1997).
- 28) Liew, F. Y. and Cox, F. E. : Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol. Today* **12**, A17 (1991).
- 29) Abraham, N. G. and Kappas, A. : Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol. Rev.* **60**, 79 (2008).
- 30) Bellezza, I., Mierla, A. L. and Minelli, A. : Nrf2 and NF- κ B and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers.* **2**, 483 (2010).
- 31) Motohashi, H. and Yamamoto, M. : Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.* **10**, 549 (2004).