

遠志의 항염증 작용에 대한 연구

오현석, 김병우
상지대학교부속한방병원 내과

Anti-inflammatory activity of the water extract of *Polygala tenuifolia* Willd

Hyun-suk Oh, Byoung-woo Kim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Sang-Ji University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the cellular and molecular mechanisms of anti-inflammatory activity of the water extract of *Polygala tenuifolia* Willd. (Pt-WE).

Methods : Using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine RAW264.7 cells, we examined inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 and prostaglandin E₂ (PGE₂). Also, the inhibitory effect of Pt-WE on the activity of activator protein 1 (AP-1) and upstream signaling molecules was evaluated. To assess the protective effect of Pt-WE on hydrochloride/ethanol (HCl/EtOH)-induced gastric ulcer in mice, we compared Pt-WE (200 mg/kg) with ranitidine (50 mg/kg) treated mice's gastric mucosa, based on gross observations.

Results : Pt-WE inhibited LPS-induced production of NO, PGE₂ in a dose-dependent manner, without causing cytotoxicity. Pt-WE suppressed AP-1 activation by reducing generations of both c-Jun and c-Fos. In addition, Pt-WE inhibited the p-MKK 4/7 (mitogen-activated protein kinase kinase 4/7) and p-JNK (c-Jun N-terminal kinase) 1 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. HCl/EtOH-induced gastric ulcer lesions were inhibited by pre-treatment of Pt-WE based on gross observations. In addition, Pt-WE decreased the phosphorylation level of JNK.

Conclusions : These results demonstrate that Pt-WE has anti-inflammatory and gastroprotective effects. Thus, Pt-WE may be used widely in treatment of not only neurodegenerative diseases but also inflammatory diseases.

Key words : *Polygala tenuifolia*, anti-inflammation, activator protein 1 (AP-1), signaling pathway, animal experiment

1. 서 론

대식세포(macrophage)는 탐식 기능을 통한 선천 면역과 항원 제시 기능을 통한 후천 면역을 동시에 담당하는 대표적인 면역세포로, 병원체, 세포 손상, 체내 다른 면역세포에서 분비한 cytokine 등

의 자극 물질에 의해 활성화되어 TNF- α , IL-1 등의 cytokine이나 NO, ROS, prostaglandins와 같은 염증매개물질을 분비하여 염증반응을 촉발시킨다^{1,2}. 이러한 일련의 과정은 모두 신호전달 단백질의 활성화에 의한 cell signaling에 의한 것으로, 대식세포의 세포막에 존재하는 pattern recognition receptors (PRRs)가 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)에 반응하여 NF- κ B, AP-1과 같은 transcription factor가 활성화되고 그 결과 iNOS, COX-2가 발현되어 염증반응물질인 NO나 PGE₂ 등이 분비된다³.

원지(遠志)는 원지과에 속한 다년생 초본인 원

· 교신저자: 김병우 강원도 원주시 우산동 283번지
상지대학교 부속한방병원 6내과
TEL: 033-741-9216 FAX: 033-741-9383
E-mail: kbw-omd@hanmail.net

· 이 논문은 2013년도 상지대학교 대학원 한의학석사 학위논문임.

지 *Polygala tenuifolia* Willd.의 뿌리를 건조⁴한 것으로, 味는 苦辛하고 性은 微溫하여 寧心安神, 祛痰開竅, 消散腫痛의 작용을 하여 神昏, 驚悸, 不眠, 健忘을 치료하고 초기의 癰腫에도 적용할 수 있다⁵. 최신 연구로는 원지의 寧心安神 작용과 신경 퇴행성 질환의 치료와 관련된 연구⁶⁻⁸를 위주로 진행되고 있으며, 원지가 TNF- α 와 IL-1 등의 염증 매개 물질인 cytokine을 억제하고 염증반응의 전사인자인 NF- κ B pathway에 작용하는 기전⁸이 밝혀졌다. 이에 원지의 항염증 효과와 작용기전을 보다 자세히 밝혀보고자 본 연구를 수행하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 시료

원지 500 g을 물 2500 cc와 함께 3000 cc 둥근 플라스크에서 3시간 전탕한 추출액을 여과지를 통과시켜 얻었다. 여과액은 동결건조기(일신Engineering, 한국)로 동결 건조하여 84.99 g(수득율 16.998%)을 얻었다. 동결 건조된 원지 물추출물(이하 Pt-WE)을 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 농도별로 조정된 후 세포실험에 사용하였고, 동물실험용 시료는 CMC(carboxymethyl cellulose)에 녹여 사용하였다.

2) 동물

6-8주차의 체중 19 ± 2 g 정도의 수컷 ICR mouse(대한바이오링크, 충북, 한국) 20마리를 사용하였으며, 물과 pellet diet는 자율 급식하였다.

3) 시약 및 항체

세포배양용 배지에 사용한 Fetal Bovine Serum(FBS)와 항생제(penicillin, streptomycin)는 HyClone(South Logan, UT, USA) 제품을 사용하였다. MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 포함한 화학 시약은 Sigma 제품(St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. PGE₂ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) kit는 Amersham Life Science Inc.(Arlington Heights, IL, USA) 제품

이다. 본 실험에서 사용한 모든 항체는 Cell Signaling Technologies(Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다.

2. 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포를 사용하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. RAW264.7 세포의 세포배양을 위한 배지는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 media를 이용하였고, penicillin(100 IU/ml), streptomycin(100 μ g/ml)과 10% FBS를 첨가하여 사용하였다.

3. Nitric Oxide(NO) 측정

RAW264.7 세포를 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절된 후, 96 well plate에 접종하고, Pt-WE를 100~400 μ g/ml 농도로 전처리하여 5% CO₂ 및 37 °C에서 18시간 동안 전배양하였다^{9,10}. 전배양한 배지를 제거하고, LPS 1 μ g/ml를 처리하거나 무처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3분간)하여 상층액 100 μ l씩을 취한 것에, Griess 용액(0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H₃PO₄)을 혼합하였다. 이 혼합액을 상온에 10분 동안 방치한 결과 발색된 정도를 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 표준물질로 sodium nitrite를 사용하여 흡광도를 측정한 후 표준 정량곡선을 완성하였다.

4. Prostaglandin E₂(PGE₂) 측정

RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/ml 농도로 조절된 후 LPS 1 μ g/ml를 무처리하거나 처리하여 18시간 동안 전배양하고, Pt-WE를 300, 400 μ g/ml로 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 그 다음 배양액을 원심분리하여 상층액 100 μ l를 분리하고, PGE₂의 생성을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다.

5. MTT Assay

96-well plate에 1×10^6 개의 세포를 plating하고,

Pt-WE를 100~400 µg/ml 농도로 처리하여 37 °C에서 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 배양세포에 10 µl MTT 용액(stock concentration : 5 mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 동일 조건에서 추가 배양하였다. 각 well에 100 µl MTT stopping solution(10% sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCl)을 추가적으로 첨가하여 MTT-formazan을 용해시켰다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 Optical Density(OD) 값을 통해 산출하였다.

6. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase (COX)-2의 발현 정도를 전사수준에서 조사하기 위해 각 시료를 일정 시간 동안 처리하여 배양한 세포로부터 TRIzol® Reagent(Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA(1.0 µg)로 First strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 이것을 polymerase chain reaction(PCR)로 증폭시켰다. 이때 사용한 DNA primer의 염기서열은 Table 1에 정리되어 있으며, 기존문헌을 참고하여 제조하였다^{11,12}. PCR amplification을 위하여 i-Master mix PCR kit(iNtRON, 한국)을 사용하였으며, 94 °C에서 45초 간 DNA의 변성(denaturing), 60 °C에서 30초 간 primer 결합(annealing), 그리고 72 °C에서 1분간 extension하는 조건으로 총 30 cycle을 시행하였다. PCR의 결과물은 1% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide(EtBr) staining하여 관찰하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH)를 internal control로 사용하여 iNOS, COX-2의 발현을 상대적으로 평가하여 측정하였다.

7. Western blot analysis

Pt-WE(300 µg/ml)를 전처리한 RAW264.7 세포

(7×10⁶ cells/ml)에 LPS(1 µg/ml)로 처리하거나 무처리하여 지정된 시간이 경과한 후 세포를 회수하였다. 시간 설정은 upstream 경로에 따라 단계적으로 단축 적용하였으며, c-Jun과 c-Fos는 15/30/60분, MAPK는 5/15/30/60분 후에 발현량을 확인하였다. IRAK4, IRAK1, TAK1, MKK 4/7은 2/3/5분 후에 확인하였다. 회수한 cell들은 lysis buffer(조성 : 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM ethyleneglycotetraacetic acid, 50 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamide, and 2 mM hydrogen peroxide)와 sonicator를 사용해 세포를 깨어 total cell lysate을 만들었다.

각 표본의 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA) standard를 이용하여 측정했다. Internal control로는 lamin A/C와 β-actin을 사용하였다. 동일한 양의 단백질로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실행하고, wet transfer system을 통한 electroblotting으로 gel에 위치한 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 옮긴 후, 5% non-fat dried milk(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 사용해 membrane blocking하였다. 각 단백질에 특이한 1차 항체로 처리하고, washing하여 결합되지 않은 1차 항체를 제거한 후, 2차 항체 용액을 1시간 추가 처리하였다. 그리고 암실에서 membrane에 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 골고루 분주하여 X-ray film으로 감광하여 반응 정도를 확인하였다.

8. Immunoprecipitation(IP) Assay

Pt-WE(300 µg/ml)를 전처리한 RAW264.7 세포(1×10⁷ cells/ml)에 LPS(1 µg/ml)로 처리하거나 무처리하여 3분이 경과한 후 세포를 회수하여 cell lysate를 제작하였다. Lysate에 10 ml protein A-coupled Sepharose beads(50%v/v)(Amersham, UK)를 추가하여 4 °C에서 1시간 동안 pre-clearing 하였다.

Pre-cleared sample을 anti-TAK1 antibody(5 ml)를 첨가하여 4 °C에서 밤새 배양한 후, protein A-coupled sepharose beads(50%v/v) 10 ml를 넣어 4 °C에서 3시간 추가 배양하였다. 그 후, lysis buffer로 3회 세척하여 침강되지 않은 immune complex는 제거하였다. 침강된 beads-immune complex는 SDS-PAGE를 통하여 protein A와 분리한 후, MKK 4/7과 p-MKK 4/7에 특이한 항체를 이용하여 western blotting으로 분석하였다¹³⁻¹⁵.

9. HCl-EtOH에 의한 위궤양 유발 동물실험

수컷 ICR 마우스(6-8 weeks old, 19±2 g)를 정상 대조군, 궤양 대조군, ranitidine 및 Pt-WE 투여군으로 각 군당 5마리씩으로 나눠 실험을 실시하였다. Pt-WE(200 mg/kg)와 ranitidine(50 mg/kg)을 매일 2회씩 위궤양 유발 전 3일 동안 oral injection 하였다. 한편 정상 및 궤양 대조군에서는 멸균 증류수만 같은 용량으로 동일한 기간 동안 투여하였다. 최종 약물투여로부터 30분 후, Oyagi 등¹⁶의 방법에 따라 60% ethanol에 150 mM HCl이 혼합된 HCl/EtOH 용액 400 µl를 경구 투여하여 위궤양을 유발하였다. 모든 실험동물은 위궤양 유발 전에 투약 기간 동안 절식시켰다. HCl/EtOH 용액을 투여하고 1시간 후, 실험동물을 urethane으로 마취 후 희생시키고, 위를 적출하였다. 대만부를 절개하여 펼쳐 위 점막 궤양을 확인하였다. 염증반응의 신호전달 단백질 발현량 측정을 위해 Krishnendu와 Snehasikta¹⁷의 방법에 따라 샘플을 채취하여 western blotting 하였다.

10. 통계처리

모든 통계 실험은 SPSS 10.0 버전을 이용하여 시행하였으며, 그룹 간 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 ANOVA/Scheffe's post hoc test와 Kruskal-Wallis/Mann-Whitney test를 이용하여 분석하였다.

III. 결 과

1. Pt-WE의 NO와 PGE₂ 분비에 미치는 효과

LPS(1 µg/ml)에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서 NO와 PGE₂의 분비를 측정된 결과, Pt-WE 투여군에서 농도 의존적으로 NO와 PGE₂의 생성이 억제된 것으로 나타났다(Fig. 1).

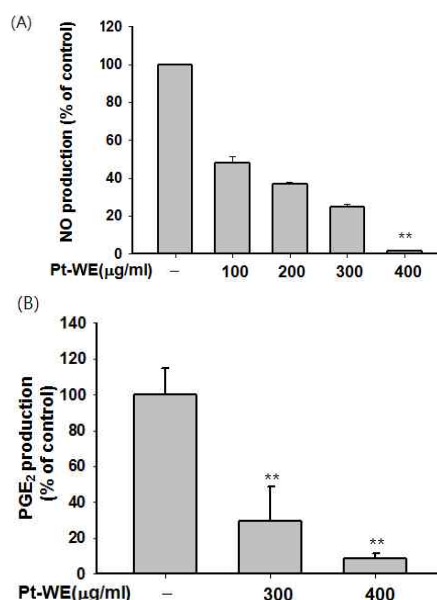


Fig. 1. Effect of Pt-WE on NO and PGE₂ production in LPS-treated RAW264.7 cells.

(A) RAW264.7 cell (1×10^6 cell/ml) were pre-treated with Pt-WE in the presence or absence of LPS (1 µg/ml) for 24 hrs. The level of NO was determined by Griess assay. (B) PGE₂ production was measured using ELISA kit. ** $p < 0.05$ compared to control.

2. Pt-WE의 세포독성 확인

MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, Pt-WE는 24시간 동안 최대 400 µg/ml 농도까지 RAW264.7 세포에 대하여 세포 독성 효과를 나타내지 않았다(Fig. 2).

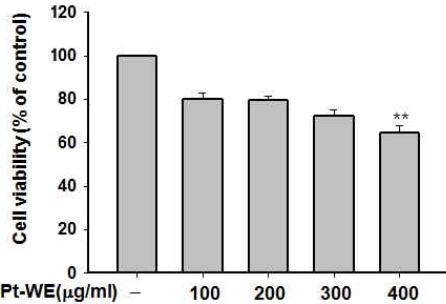


Fig. 2. Effect of Pt-WE on the viability of RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (1×10^6 cell/ml) were incubated with Pt-WE for 24 hrs. The cell viability was assessed by conventional MTT assay as described in Materials and Methods. ** $p < 0.05$ compared to control

3. Pt-WE의 iNOS, COX-2 gene expression에 대한 억제 효과

LPS (1 µg/ml) 처리한 RAW264.7 세포에 각각의 농도별로 Pt-WE를 처리하였을 때, Pt-WE 200 µg/ml 부터 iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 감소되는 것이 확인되었다(Fig. 3A). 또한, 대조군의 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 강도를 1로 보았을 때, Pt-WE (300 µg/ml) 투여군의 시료에서는 발현 강도가 0.5 수준으로 억제되었다(Fig. 3B).

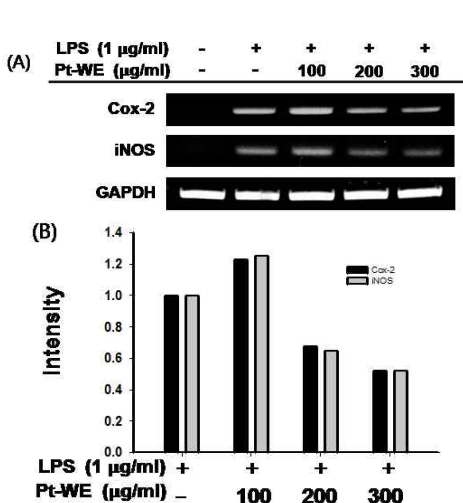


Fig. 3. Inhibition of iNOS, COX-2 gene expression by Pt-WE in LPS-treated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were stimulated with Pt-WE in the presence or absence of LPS (1 µg/ml) for 24 hrs. GAPDH was used as an internal control. (A) The iNOS and COX-2 mRNA levels were decreased slightly. (B) The relative intensity of iNOS and COX-2 expression in the results of RT-PCR were expressed as a bar graph based on the LPS band.

4. Pt-WE의 신호전달 과정에 미치는 효과

AP-1 pathway에 대한 Pt-WE의 작용을 확인한 결과, AP-1 pathway의 상위 신호전달 단계 중 c-Fos와 c-Jun, p-JNK 1, p-MKK4/7에 대하여 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. Pt-WE 투여군에서 c-Jun, c-Fos는 LPS를 처리 60분 후에 억제 효과가 확인되었고(Fig. 4), p-JNK 1과 p-MKK 4/7은 각각 LPS 처리 5분, 3분 경과 후에 억제 효과가 나타났다(Fig. 5, 6).

TAK1을 antigen으로 immunoprecipitation하여 얻은 lysate를 MKK 4/7과 p-MKK 4/7에 특이한 항체를 이용하여 western blotting으로 분석하였다. 그 결과, Pt-WE 투여군에서 LPS 처리 후 3분경과 시 TAK1의 downstream signal인 p-MKK 4/7의 발현이 억제되는 결과를 확인하였다(Fig. 7).

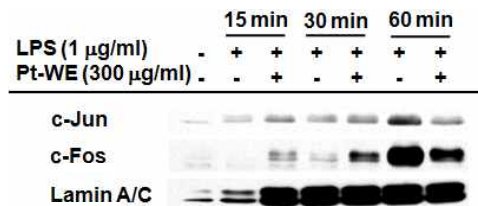


Fig. 4. Effect of Pt-WE on the activation of c-Jun and c-Fos in LPS-treated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (7×10^6 cells/ml) pre-treated with Pt-WE (300 µg/ml) were stimulated in the absence or presence of LPS (1 µg/ml) for indicated times. Lamin A/C was used as an internal control. The levels of c-Jun and c-Fos were decreased at 60 minutes after LPS treatment.

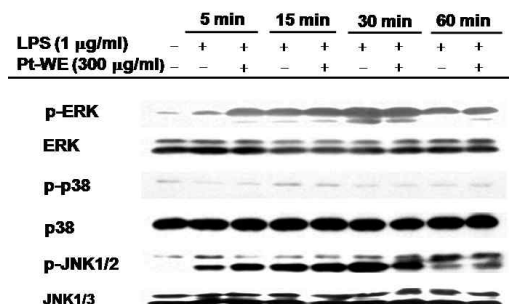


Fig. 5. Effect of Pt-WE on the activation of MAPK in LPS-treated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (7×10^6 cells/ml) pre-treated with Pt-WE (300 µg/ml) were stimulated in the absence or presence of LPS (1 µg/ml) for indicated times. The total or phospho-protein levels of MAPK were measured by western blotting. The levels of p-JNK 1 was decreased at 5 minutes after LPS treatment.

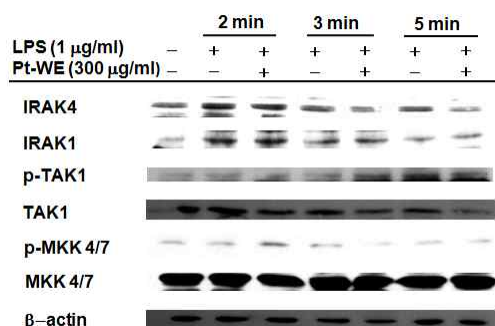


Fig. 6. Effect of Pt-WE on the activation of p-MKK 4/7 in LPS-treated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (7×10^6 cells/ml) pre-treated with Pt-WE (300 µg/ml) were stimulated in the absence or presence of LPS (1 µg/ml) for indicated times. β-actin was used as an internal control. After western blotting, the total or phosphorylation levels of IRAK4, IRAK1, TAK1, MKK 4/7 and β-actin were identified with phospho-specific or total protein antibodies. The level of p-MKK 4/7 was decreased at 3 minutes after LPS treatment.

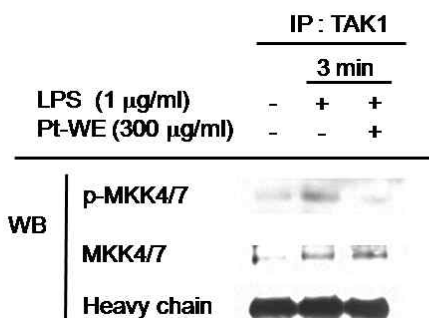


Fig. 7. Effect of Pt-WE on the activation of TAK1 and MKK 4/7 by immunoprecipitation.

RAW264.7 cells (1×10^7 cells/ml) pre-treated with Pt-WE (300 µg/ml) were stimulated in the absence or presence of LPS (1 µg/ml) for 3 minutes. After lysis with ice-cold lysis buffer, the cell lysates were immunoprecipitated with anti-TAK1 antibody. The immunoprecipitates were analyzed by western blotting with specific antibody against MKK 4/7 and p-MKK 4/7.

5. Pt-WE의 HCl-EtOH 유발 위궤양에 대한 억제 효과

HCl/EtOH로 위궤양을 유발한 ICR mouse의 위점막 병소를 육안으로 관찰한 결과, Pt-WE와 ranitidine 투여군 모두 육안 병소의 면적이 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 8A). 또한 HCl/EtOH로 유발한 위궤양의 염증 반응 signal에 대한 western blot을 시행한 결과, Pt-WE 투여군에서 JNK의 인산화 과정이 억제된 것으로 나타나 동물실험에서도 세포 실험과 같은 결과가 나왔다(Fig. 8B).

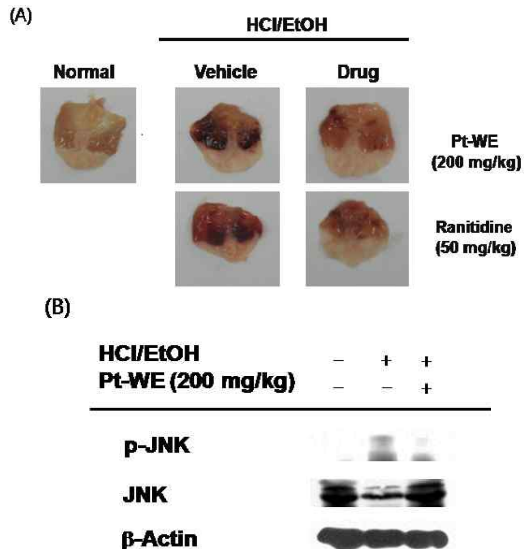


Fig. 8. Effect of Pt-WE on HCl/EtOH-induced gastric ulcer.

Pt-WE(200 mg/kg) or ranitidine(50 mg/kg) were orally administered for 3 days. After last treatment, HCl/EtOH was treated to the mice. One hour after, mice were sacrificed to determine anti-gastritis activity of Pt-WE. (A) Representative gross observations of the fundic mucosa in normal, HCl/EtOH control, Pt-WE 200 mg/kg, and ranitidine 50 mg/kg treated mice. HCl/EtOH-induced gastric lesions were markedly inhibited by pre-treated of both Pt-WE and ranitidine. (B) ICR mice pre-treated with Pt-WE were stimulated in the absence or presence of HCl/EtOH. Pt-WE pre-treated mice decreased the level of p-JNK in the result of the western blotting.

IV. 고 찰

원지는 寧心安神, 祛痰利竅, 抗炎症劑¹⁸로서 苦辛微溫한 性味로 苦泄辛散溫通 작용을 하여 心氣의 鬱結을 通하게 하며, 痰氣의 壅滯를 降하여 氣를 진정시키고 竅를 능히 開通한다. 따라서 寧心安神, 祛痰開竅의 효능으로 神昏, 驚悸, 不眠, 健忘을 치료하며, 濕痰이 經絡을 害하여 발생된 초기의 癰腫을 治療하는 消散腫痛의 効능이 있다⁵. 그 밖에 遺精, 帶下, 自汗, 心虛, 脾虛, 月經不通, 寒熱, 失音

등의 증상에 두루 처방되고 있다¹⁹.

원지의 消散腫痛의 효능과 관련 있는 처방으로 는 膽實熱 煩悶에 쓰이는 半夏湯, 胸痛, 脇滿, 膈背 肩胛兩臂內痛, 鬱冒, 心痛, 暴痞에 쓰는 黃芪茯苓 湯, 癰疽가 더진 후에 고름이 많이 나오고 속이 허 한 것을 治療하는 托裏黃芪湯, 七情內鬱이 癰疽가 된 것을 治療하는 遠志酒 등이 있다. 또한 癰疽의 調理法에 諸痛痒瘡瘍 皆屬於心이니 茯苓, 茯神, 遠 志, 益智仁, 石菖蒲 등을 복용하라고 하였다²⁰.

최근의 연구 결과에서도 뇌 정상세포로부터 염증성 세포활성물질인 TNF-α와 IL-1의 분비를 억제하고⁶, 흥분성 신경독성에 의한 신경세포사를 억제하는 신경보호 효과⁷가 있는 것으로 확인되었다. 또한, 염증 반응의 cell signaling pathway 중에서 NF-κB activation과 toll-like receptor 4(TLR4), myeloid differentiation factor(MyD)-88 pathway의 활성 억제를 통한 항염증 작용 기전⁸ 등이 보고되어 있다. 이와 같이 원지의 항염증 작용에 대한 분자세포학적 신호전달 기전이 NF-κB pathway를 중심으로 일부 규명되었으나, AP-1 pathway 등 기타 다른 signaling에의 작용에 대해서는 연구가 미흡하여 LPS로 유도한 RAW264.7 세포의 NO 생성 조건에서의 원지의 억제 효과와 분자세포학적 기전을 확인해 보았다.

Pt-WE의 NO와 PGE₂의 분비 억제 효과를 확인하기 위하여, LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포를 Griess assay와 ELISA kit를 이용하여 각각 NO와 PGE₂를 측정하였다. 그 결과, Pt-WE에 대하여 농도 의존적으로 NO와 PGE₂의 생성이 억제되었으며, 400 µg/ml로 처리된 시료에서는 각각 최대 0%와 10%로 NO와 PGE₂의 생성이 억제된 것으로 확인되었다(Fig. 1). 그러나 Pt-WE 자체의 비특이적인 세포 독성 작용으로 인하여 NO 생성 억제 효과가 나타났을 가능성이 있으므로 Pt-WE의 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. Pt-WE를 24시간 동안 최대 400 µg/ml 까지 농도별로 처리한 결과 RAW264.7 세포의 cell

viability는 정상군의 7~80% 수준으로 나타나(Fig. 2), Pt-WE의 NO 생성 억제 는 세포 독성 작용에 의한 것이 아닌 것으로 판단하였다.

NO는 signaling molecule이자 free radical gas로서 다양한 생리적, 병리생리적 반응의 key mediator²¹가 되므로, NO signal pathway는 내재성 면역반응에서 매우 중요한 의미를 갖는다. NO는 iNOS의 활성화에 의해 매개되므로, iNOS mRNA의 발현 여부를 조사하여 NO의 생성 억제 효과가 mRNA 전사 과정 억제와 연관되어 있는지 확인하였다. LPS에 의해 유도된 iNOS mRNA를 RT-PCR로 정량해본 결과, Pt-WE에 의해 iNOS의 mRNA expression이 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). LPS (1 µg/ml)만 처리한 군의 iNOS mRNA expression intensity를 1로 보았을 때, Pt-WE(300 µg/ml) 처리군은 0.5 수준으로 iNOS mRNA의 발현이 억제되었다(Fig. 3B).

iNOS의 발현을 조절하는 대표적인 전사인자로는 NF-κB와 AP-1이 있으며, 이 중에서 Pt-WE는 NF-κB의 활성을 억제하며, IκB-α의 저하를 억제함으로써 NF-κB의 p65 subunit의 nuclear translocation을 억제한다. 또한, 대표적인 PRRs인 TLR4와 adaptor인 MyD-88 역시 억제하는 것으로 나타났다^{3,8}. 이러한 결과를 토대로 NO signal의 또 다른 축이 되는 AP-1 pathway에 대한 작용을 확인해 보고자, AP-1 활성 조절 상부신호전달 단백질(c-Jun, c-Fos, MAPK, MKK 4/7, TAK1, IRAK1, IRAK4)의 total protein과 phosphoprotein을 western blotting을 이용하여 측정하였다.

c-Jun은 Jun proto-oncogene의 하나로, c-Fos와 heterodimer의 형태로 결합하여 AP-1을 형성하는 전초기 유전자(immediate early gene)이다^{22,23}. Fig. 4의 결과와 같이, Pt-WE 300 µg/ml 처리군을 LPS로 자극하고 60분 경과 후 c-Jun, c-Fos가 감소한 것으로 나타나, AP-1의 활성 역시 억제될 것으로 해석하였다.

MAPK(Mitogen-activated protein kinases)는

ERK(extracellular signal-regulated kinases), JNK(c-Jun N-terminal kinases), p38 등 크게 세 가지로 분류된다²⁴. JNK는 3가지의 isotype이 있는데, JNK 1/2는 모든 세포와 조직에 존재하며 JNK 3은 뇌와 심장, 고환에서 발견된다^{25,26}. Fig. 5를 보면 LPS 자극으로 유도된 MAPK family 중에서 p-JNK 1이 5분 후에 감소한 것으로 확인되었다. p-JNK 1은 JNK 1의 phosphorylation(인산화) 형태로, JNK는 Mitogen-activated protein kinase kinase(MKK) 4/7에 의해 p-JNK로 인산화됨으로써 활성화된다²⁷. Kinase에 의한 phosphorylation은 단백질 등 유기화합물에 인산기(PO_4^{3-})를 가역적으로 결합시키는 반응으로, 많은 효소와 수용체가 인산화되어 그 기능이 활성화된다. 또한, cell signaling 과정에서 신호 전달의 방법으로써 protein phosphorylation은 매우 중요한 역할을 한다²⁸.

MKK는 MAPK를 인산화시키는 효소로 MKK 4/7은 JNK의 activator로 작용한다²⁹. IRAK(interleukin-1 receptor-associated kinase)-4와 TAK1(TGF-β-activated kinase 1)³⁰의 경우 활성 억제 효과가 나타나지 않았으나, p-MKK 4/7은 Pt-WE 300 µg/ml에서 LPS 자극을 주고 3분 경과 후에 p-MKK 4/7의 활성이 감소하였다(Fig. 6).

TAK1은 MKK 4의 upstream kinase 중의 하나로³¹, Pt-WE가 p-MKK 4/7의 활성을 억제한 결과를 바탕으로 하여, 보다 상위 단계인 TAK1에까지 그 작용이 미치는지 immunoprecipitation(IP) 실험을 통하여 확인하였다. IP는 단백질 간 상호작용을 분석하는 중요한 실험기법^{13,14}으로, TAK1을 antigen으로 immunoprecipitation하여 얻은 immune complex를 western blotting으로 분석하였다. 그 결과, TAK1의 downstream signal인 p-MKK 4/7이 Pt-WE를 처리했을 때 발현이 억제되는 결과를 확인하였다(Fig. 7). 이로써 Pt-WE가 TAK1-MKK 4/7 pathway까지 작용하는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, TAK1을 시작으로 p-MKK 4/7, p-JNK 1, c-Jun으로 내려가는 pathway의 억

제 기전이 확인되었으며, c-Jun과 결합하여 AP-1을 형성하는 c-Fos의 억제 효과도 확인되었다. 이러한 억제 효과가 발현되는 시간이 p-MKK 4/7는 3분, p-JNK 1은 5분, c-Jun과 c-Fos는 60분 경과 후로 나타나 시간상의 배열과 signal 순서가 일치함을 알 수 있었다. 본 연구에서는 luciferase assay를 통하여 AP-1의 활성화 여부를 직접적으로 확인해 보지는 못하였으나, AP-1의 immediate early gene인 c-Jun, c-Fos의 억제 효과가 확인되었으므로 AP-1 activation에 대해서도 억제 효과가 있을 것으로 판단된다.

Pt-WE의 항염증 효과가 in vivo에서도 적용되는지 평가하고자, HCl-EtOH로 유발한 ICR mouse 위궤양 모델을 이용하였다. Pt-WE(200 mg/kg)를 3일간 경구 투여한 후, HCl-EtOH 용액을 이용하여 위궤양을 유발한 마우스의 위점막 조직을 관찰하여 항궤양 효과를 육안적으로 확인하였다. 그 결과, 대표적인 항궤양 치료제인 ranitidine(50 mg/kg)과 비교했을 때 유사한 항궤양 효과를 나타냈다(Fig. 8A).

만성 위궤양 상태에서는 p-ERK 1/2와 p-JNK가 증가¹⁷하는데, HCl-EtOH로 유발한 ICR mouse의 위궤양 상태에서 Pt-WE의 p-JNK를 억제시키는 효과를 확인하였다. 이로써 Pt-WE가 JNK signaling에 관여함으로써 항궤양 효과를 나타냄을 알 수 있었다³²(Fig. 8B).

결론적으로, Pt-WE는 염증 매개물질인 NO, PGE₂의 생성을 억제하고, AP-1 signaling pathway에도 관여함을 알 수 있었다. 또한, Pt-WE의 항염증 효과에 대한 in vivo 실험을 통해 JNK signaling의 억제에 의한 항궤양 효과 역시 확인하였다. 따라서, 원지는 기존의 연구와 마찬가지로 신경퇴행성 뇌질환의 치료제뿐만 아니라 염증성 질환의 치료제로서 활용 가능할 것으로 보인다.

V. 결론

원지의 항염증 작용을 확인하기 위하여 LPS로 유도된 RAW264.7 세포를 이용하여 분자세포학적 수준에서 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 원지는 LPS로 유도된 NO와 PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 세포 생존율을 검정한 결과 NO와 PGE₂ 생성 억제 효과는 원지의 세포독성에 기인한 것이 아니었다.
2. 시간에 따른 세포 내 AP-1 signaling molecule의 활성을 확인한 결과, LPS로 유도된 p-MKK 4/7, p-JNK 1, c-Jun, c-Fos의 활성이 억제되었으며, 이를 통해 AP-1의 활성 억제 효과가 있을 것으로 판단하였다.
3. 원지의 항염증 효과가 in vivo에서도 적용되는지 HCl-EtOH induced gastric ulcer model을 이용하여 실험한 결과, 육안적으로 위점막 병소의 감소가 확인되었다. 또한, p-JNK의 활성 억제 효과가 나타나 JNK signaling에 관여함으로써 항궤양 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

이상의 결과로, 원지가 NO와 PGE₂의 생성을 억제하고 AP-1과 그 상위 신호전달 단백질의 활성을 저해함으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단된다. in vivo 실험을 통해 항궤양 효과 역시 확인되었으므로, 기존의 연구가 신경 퇴행성 뇌질환의 치료법으로만 국한되었던 것과는 다르게 염증성 질환 치료제로 보다 폭넓게 사용될 수 있을 것으로 전망한다.

참고문헌

1. Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Neurol Clin* 2006;24:585.

2. Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 2005;4(6):607-18.
3. Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:1-19.
4. 전국한의과대학공동교재편찬위원회공저. 본초학 (本草學). 서울: 永林社; 2007, p. 532-3.
5. 강병수, 김영관. 방제의 체계적 구성을 위한 임상 배합본초학. 2판. 서울: 永林社; 1996, p. 309-11.
6. 황시영, 강형원, 류영수. 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果에 關한 研究. 동의신경정신과학회지 1999;10(1):95-108.
7. 이수배, 성낙술, 이영중. 遠志가 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과. 대한본초학회지 2005;20(2):115-25.
8. Cheong MH, Lee SR, Yoo HS, Jeong JW, Kim GY, Kim WJ, et al. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF-kB activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. *J Ethnopharmacol* 2011; 137:1402-8.
9. Mosmaan T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunological Methods* 1983;65:55-63.
10. Cho JY, Baik KU, Jung JH, Park MH. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur J Pharmacol* 2000;398:399-407.
11. 셴팅, 이용진, 조재열. 반지련(*Scutellaria barbata* D. Don) 추출물이 lipopolysaccharide에 의해 활성화된 대식세포에 미치는 영향. 한국약용작물학회지 2008;16(5):313-9.
12. Lee YG, Lee WM, Kim JY, Lee JY, Lee IK, Yun BS, et al. Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *Br J Pharmacol* 2008;154:852-63.
13. Miernyk JA, Thelen JJ. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J* 2008;53:597-609.
14. Ren L, Emery D, Kaboord B, Chang E, Qoronfleh MW. Improved immunomatix methods to detect protein: protein interactions. *J Biochem Biophys Methods* 2003;57:143-57.
15. Lal A, Haynes SR, Gorospe M. Clean western blot signals from immunoprecipitated samples. *Mol Cell Probes* 2005;19(6):385-8.
16. Oyagi A, Ogawa K, Kakino M, Hara H. Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. *BMC Complement Altern Med* 2010;10:45.
17. Ganguly K, Swarnakar S. Chronic gastric ulceration causes matrix metalloproteinases-9 and -3 augmentation: Alleviation by melatonin. *Biochimie* 2012;94(12):2687-98.
18. 이지혜, 이봉효, 김창열, 노성수. 遠志의 화학성분과 약리효능에 대한 한의학적 고찰. 韓藥應用學會誌 2010;10(1):25-33.
19. 신흥중, 조연행, 조창환, 오민석. 『方藥合編』中 遠志 및 石菖蒲를 포함한 處方に 대한 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집 2006;15(2):231-8.
20. 허준. 동의보감. 초판 4쇄. 경남 하동: 동의보감출판사; 2010, p. 270, 896-7, 1545, 1550.
21. Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:418-30.
22. Udou T, Hachisuga T, Tsujioka H, Kawarabayashi T. The Role of c-Jun Protein in Proliferation and Apoptosis of the Endometrium throughout

- the Menstrual Cycle. *Gynecol Obstet Invest* 2004;57(3):121-6.
23. Monje P, Hernández-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD, Gutkind JS. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Bio Chem* 2005;280(42):35081-4.
 24. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22(2):153-83.
 25. Waetzig V, Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Br J Pharmacol* 2005;26(9):445-61.
 26. JM Kyriakis, J Avruch. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807-69.
 27. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase(JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(2):205-19.
 28. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006;127(3):635-48.
 29. Dérijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995;269(5220):17.
 30. Kondo M, Osada H, Uchida K, Yanagisawa K, Masuda A, Takagi K, et al. Molecular cloning of human TAK1 and its mutational analysis in human lung cancer. *Int J Cancer* 1998;75(4):559-63.
 31. Akiyama S, Yonezawa T, Kudo TA, Li MG, Wang H, Ito M, et al. Activation Mechanism of c-Jun Amino-terminal Kinase in the Course of Neural Differentiation of P19 Embryonic Carcinoma Cells. *J Biol Chem* 2004;279(35):36616-20.
 32. Kovalenko PL, Kunovska L, Chen J, Gallo KA, Basson MD. Loss of MLK3 signaling impedes ulcer healing by modulating MAPK signaling in mouse intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303(8):G951-60.