

Original Article / 원저

石決明의 抗炎症效果

문수영 · 김영우* · 김상찬*

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-Inflammatory Effects of *Haliotidis Concha*

Soo-Young Moon · Young-Woo Kim* · Sang-Chan Kim*

Medical Research Center (MRC-GHF), College of Oriental Medicine, Department of Herbal Formula,
Daegu Haany University

Abstract

Objectives : *Haliotidis Concha* has been used to treat various human diseases such as liver dysfunction and inflammatory disorder. Although it has been shown the effects of *Haliotidis Concha* on the various diseases, it has almost not been studied about the anti-inflammatory effects of the *Haliotidis Concha* and its mechanisms.

Methods : This research investigated the effects of the *Haliotidis Concha* ethanol extract (HCE) on the production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) as well as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). The protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were assayed by immunoblot analyses, and the productions of NO, PGE₂ and TNF- α were assessed by ELISA.

Results : *Haliotidis Concha* decreased the production of NO and PGE₂, and inhibited the expression iNOS and COX-2 proteins in a concentration-dependent manner in LPS-treated Raw 264.7 cells, HCE suppressed the ability of LPS to activate the signaling pathways of nuclear factor kappa B (NF- κ B) as indicated by HCE inhibited nuclear NF- κ B level and I- κ B α phosphorylation. Also, HCE inhibited mitogen-activated protein kinases (MAPKs).

Conclusions : HCE repressed the production of LPS-inducible NO, PGE₂ and TNF- α , which may be mediated by inhibition of NF- κ B translocation. This study suggest the use for the treatment of acute inflammatory disorders.

Key words ; *Haliotidis Concha*; LPS; iNOS; COX-2; Nuclear factor- κ B

I. 서 론

염증 (inflammation)은 외부 자극에 대한 생체조직 방어반응 중 하나인데, 임상적으로는 발열, 발적, 부종, 통증 등을 특징으로 하고, 해당 장기의 기능장애 등을 유발한다¹⁾. 이러한 인체에서 일어나는 병리현상에는 여러 가지 염증인자들이 관여하는데, 많은 양의 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), cytokine 등이 대표적인 관련인자들이다²⁾. Lipopolysaccharid (LPS)는 대식세포나 단핵구의 활성화를 유발하고, 이로 인한 염증성 cytokine 분비를 촉발하는데, LPS-binding protein에 의해 복합체가 만들어진다³⁾. 그리고 이것이 혈액 내 대식세포의 CD14에 결합하게 되면 Toll like receptor 4에 인식되어지고, nuclear factor kappa B (NF- κ B)가 활성화 된다⁴⁾.

NF- κ B는 염증성 질환, 세포 분화 및 부작의 생리적 반응 등에 관련된 여러 단백질들의 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. LPS 등의 염증 매개물질에 의해 활성화된 대식세포에서 NF- κ B는 inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2의 단백질 발현을 매개하여, NO, PGE₂, Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukins 등의 여러 염증 매개물질의 생산을 유도한다⁵⁻⁷⁾. NO는 면역기능, 혈액응고 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 염증시 iNOS에 의해 다량 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진 시킨다^{8,9)}. TNF- α 는 면역반응과 염증반응을 유도하는 염증유도매개 cytokine으로 단핵세포와 대식세포에서 생성된다¹⁰⁾. 다량의 TNF- α 발현은 심근 수축력 감소, 혈압강하, 대사과정의 손상을 유발하기도 한다^{11,12)}.

石決明은 전복과 동물 九孔鮑 또는 盤大鮑 등의 조개 껍질을 지칭하는 용어이다. 이 약재의 효능은 肝氣

를 평하게 하고 陽氣를 저장하며 열을 제거하여, 風氣逆上, 骨蒸勞熱, 青盲內障, 두통, 현기증, 갑작스런 인체 경련 등을 주치증상으로 한다¹³⁾. 石決明에 대한 이전 연구로는 장 등, 이 등이 실시한 자외선으로 손상 받은 피부세포에 대한 항산화 및 항노화 효과에 대한 연구가 있으며^{14,15)}, 장 등이 실시한 인삼 모상근의 성장과 Ginsenoside 성분들의 생합성에 미치는 石決明의 영향에 대한 연구가 있다¹⁶⁾. 이러한 연구결과들이 있음에도 불구하고, 石決明의 항염증효과 및 그 기전에 관한 연구 보고는 아직 미흡하다. 본 연구에서는 석결명에탄올추출물 (*Halitidis Concha* ethanol extract, HCE)이 NO의 생성, iNOS, COX-2의 발현 및 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 살펴보고자 본 연구를 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

LPS (*Escherichia coli* 055:B5)와 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Fetal bovine serum과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. iNOS antibody는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고 COX-2 antibody는 Cayman (Ann Arbor, Mi, USA)에서 구입하였다. Inhibitor kappa B (I κ B) α 와 NF- κ B 및 actin antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Inc, CA, USA)에서 구입하였고 phosphorylated I κ B α (p-I κ B α), phosphorylated p44/42 MAPK (p-ERK), phosphorylated p38 MAPK (p-p38), phosphorylated SARK/JNK (p-SARK/JNK)와 lamin A/C antibody는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. β -actin은 Sigma Chemical Co. (St.

교신저자 : 김상찬 또는 김영우, 대구한의대학교 한의과대학 방제학교실
(Tel : 053-819-1863, E-mail : sckim@dhu.ac.kr(김상찬);
ywkim@dhu.ac.kr(김영우))

• 접수 2013/10/7 • 수정 2013/11/1 • 채택 2013/11/8

Louis, MO, USA)에서 구입하였다. NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)사의 것을 사용하였다. TNF- α ELISA Kits는 Thermo (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였고 PGE₂ Assay Kits는 R&D Systems (USA)를 사용하였다.

2. 추출물 제조

石決明 (Haliotidis Concha)은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하여 평가를 거친 후 사용하였다. 石決明 600g을 에탄올 (EtOH)에 침지하여 실온에서 72 시간 동안 추출하였고 여과는 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, NY, USA)를 이용하였다. 얻은 여액은 농축을 거친 후 실험에 사용하였으며, 石決明의 최종 수율은 0.02%였다.

3. 세포배양

Murin macrophage cell line인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium에 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 세포를 24 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주한 다음 24시간 후에 serum이 없는 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하였다. HCE를 농도별로 처리하고 1시간 후에 LPS (1 μ g/ml)를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 생존세포에 MITT (0.1 μ g/ml)를 넣고 4시간 배양 후 assay를 실시하였다¹⁷⁾. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100 \times /(absorbance of treated sample)/

(absorbance of control)].

5. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포를 24 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주한 다음 24시간 후에 serum이 없는 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하였다. HCE를 농도별로 처리하고 1시간 후에 LPS (1 μ g/ml)를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양 후 540 nm에서 Titeritek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다¹⁷⁾.

6. Immunoblot analysis

Raw 264.7 세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 다음 24시간 후에 serum이 없는 배지로 교환하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. HCE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS (1 μ g/ml)를 처리하였다. 시간별로 배양한 후, Immunoblot analysis를 실시하였다¹⁷⁾. 발색 후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 Densitometric analysis를 실시하였다.

7. TNF- α 의 측정

TNF- α 를 측정하기 위하여 세포를 24 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 24시간 후에 serum이 없는 배지로 교환하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. HCE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS (1 μ g/ml)를 처리하였다. LPS 처리 후 12시간에 배지를 수거하여 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. TNF- α 생성률은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100 \times /(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

8. PGE₂의 측정

PGE₂를 측정하기 위하여 세포를 24 well plate에 5×10⁴ cells/well로 분주한 다음 24시간 후에 serum 이 없는 배지로 교환하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. HCE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS (1 μg/ml)를 처리하였다. LPS 처리 후 12시간에 배지를 수거하여 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다. Coating된 96 well plate에 배지를 150 μl씩 첨가하고 primary antibody solution과 PGE₂ conjugate를 50 μl씩 각각의 well에 넣은 후 상온에서 2시간 동안 배양하였다. Washing buffer로 4회 세척하고 200 μl의 substrate solution 30분간 반응시키고 stop solution을 100 μl 처리한 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D. 로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. HCE의 NO production에 대한 저해 효과

Raw 264.7 cell에서 HCE의 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 HCE를 3, 10, 30 μg/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 생성되는 NO양을 측정하였다. HCE는 LPS에 의해 유도된 NO의 양을 유의성있게 억제하였다(Fig. 1). HCE가 3, 10, 30 μg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, HCE의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위하여, HCE를 3, 10, 30 μg/ml로 처리하고 24시간 후 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 HCE의 3, 10, 30 μg/ml 농도에서 세포독성을 나타

내지 않았다(data not shown).

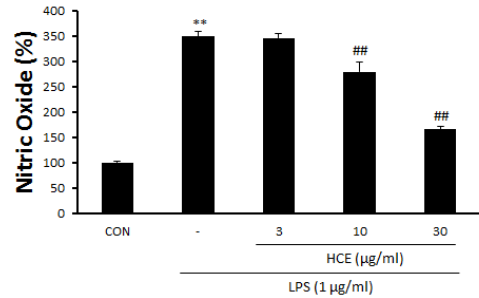


Fig. 1. The inhibitory Effects of HCE on the production of NO by LPS.

Raw 264.7 cells were treated with 3, 10, 30 μg/ml of HCE dissolved in DMSO for 1 h prior to the addition of LPS (1 μg/ml), and the cell was further incubated for 24 h. The data represent the mean ± S.D. of three separate experiments. The significances of the difference between the treated groups was evaluated using the t-test (significant as compared with vehicle-treated control, ***p* < 0.01; significant as compared with LPS alone, ##*p* < 0.01).

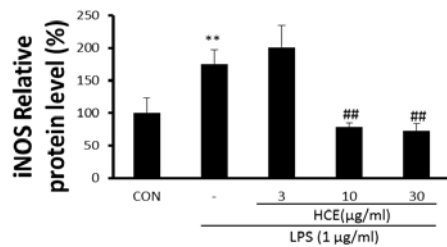
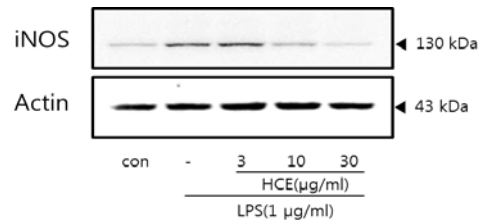


Fig. 2. The inhibitory effect of HCE on iNOS induction by LPS.

The level of iNOS protein was monitored 18 h after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) with or without HCE (3, 10, 30 μg/ml) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The actin was used as a loading control. The relative density level of protein bands was measured by scanning densitometry. The data represent the mean ± S.D. of three separate experiments. The significances of the difference between the treated groups was evaluated using the t-test (significant as compared with vehicle-treated control, ***p* < 0.01; significant as compared with LPS alone, ##*p* < 0.01).

2. HCE의 iNOS expression에 대한 억제 효과

NO 생성 억제에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사하였다. HCE를 3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. LPS 처리시에는 iNOS 단백질의 발현이 증가되었으나, LPS에 HCE를 처리시에는 iNOS 단백질 발현이 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 2).

3. HCE의 COX-2 expression에 대한 억제 효과

염증반응 또는 발암과정에서 중요한 역할을 하는 COX-2에 대한 HCE의 억제 효과를 확인하기 위해 HCE를 3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. LPS 처리시에는 COX-2 단백질의 발현이 유의하게 증가되었으나, HCE의 전처리는 COX-2 단백질의 발현을 유의하게 억제하였다 (Fig. 3).

4. HCE의 NF- κ B (p65) activation에 미치는 영향

바이러스나 박테리아에 감염되어 유도되는 염증반응에 의해 활성화되는 NF- κ B는 iNOS나 TNF- α 유전자의 발현을 유도한다¹⁸⁾. NF- κ B는 세포질에서 inhibitory molecule인 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105, p100 등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS 등의 자극에 의해 NF- κ B signaling cascade가 활성화되면 I κ B, p105, p100이 degradation 되면서, NF- κ B가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-xL, cIAPs 등의 전사를 유도하게 된다. I κ B protein의 종류는 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ 등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NF- κ B의 inhibitory protein은 I κ B α 이다¹⁹⁾. 본 실험에서는 I κ B α 의 전체 단백질 양과 p-I κ B α 의 양을 측정하였다. LPS 처리시에는 I κ B α 단백질이 감소되고,

p-I κ B α 이 유도되었으나, HCE의 전처리는 I κ B α 단백질이 증가하고, p-I κ B α 은 감소하였다(Fig. 4A). 이러한 I κ B α 인산화의 억제가 NF- κ B 활성을 저해시키는지 확인하기 위해 HCE를 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. LPS 처리시에는 NF- κ B (p65) 단백질의 핵내 발현이 유의하게 증가되었으나, HCE의 전처리는 NF- κ B의 핵내 발현을 유의성있게 억제하였다(Fig. 4B).

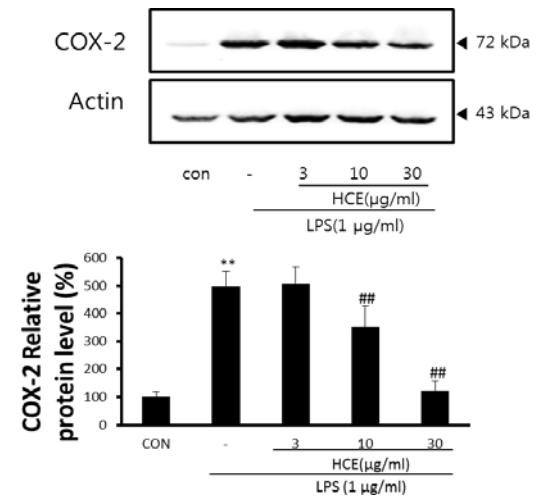


Fig. 3. The inhibitory effect of HCE on COX-2 induction by LPS.

The level of COX-2 protein was monitored 18 h after treatment of cells with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) with or without HCE (3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The actin was used as a loading control, and the relative level of protein was measured by scanning densitometry. The data represent the mean \pm S.D. of three separate experiments. The significances of the difference between the treated groups was evaluated using the t-test (significant as compared with vehicle-treated control, ** $p < 0.01$; significant as compared with LPS alone, ## $p < 0.01$).

5. HCE의 염증성 cytokine 및 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 대한 억제 효과

HCE의 PGE₂의 억제 효과를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포에서 HCE (30 $\mu\text{g/ml}$)를 처리한 다음, 1시간 후 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 12시간 동안 배양하여 PGE₂의 효과를 ELISA kit로 평가하였다. LPS처

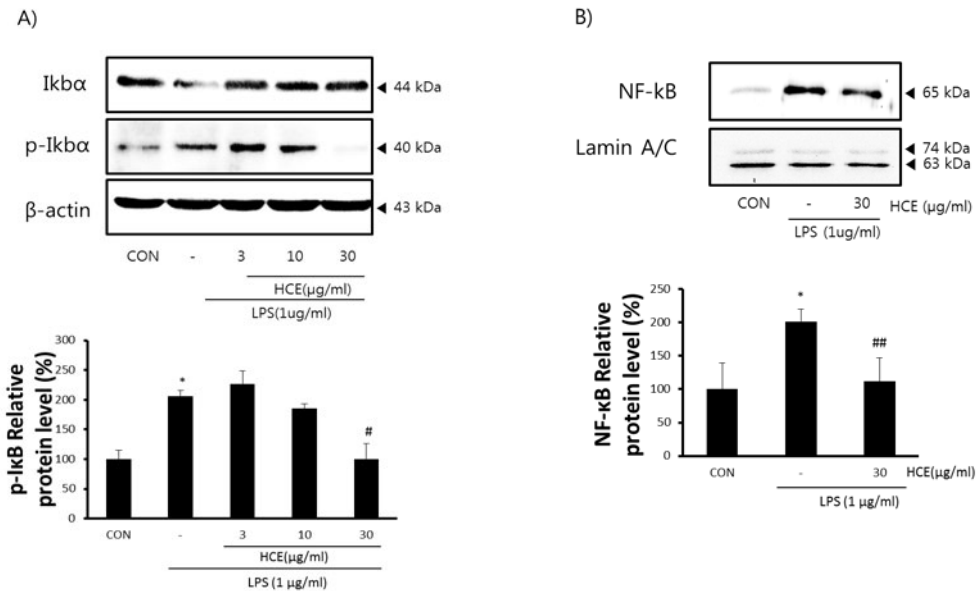


Fig. 4. Effects of HCE on the activation of NF-κ B (p65).

(A) The protein levels of IκBα and p-IκBα were monitored at 30 and 15 minutes after treatment (LPS and/or HCE), respectively. The β-actin was used as a loading control. (B) The level of NF-κB protein was monitored 1 h after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) with or without HCE (30 μg/ml) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The Lamin A/C was used as a nuclear loading control. The relative density level of protein bands was measured by scanning densitometry. The data represent the mean ± S.D. of three separate experiments. The significances of the difference between the treated groups was evaluated using the t-test (significant as compared with vehicle-treated control, **p* < 0.05; significant as compared with LPS alone, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01).

리군은 control군에 비해 높은 증가를 나타내었으며, 이러한 증가는 HCE에 의해 억제되었다(Fig. 5A, left). 염증반응에 있어서 중요한 역할을 하는 TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 내재면역에 있어서도 중요한 역할을 한다. 대식세포와 비만세포에서 분되는 TNF-α는 종양세포에 세포독성을 나타내며 만성 염증성 반응과 관련되어 있다^{18,20}. HCE의 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의한 TNF-α 억제 효과를 확인하기 위해 HCE (30 μg/ml)를 처리한 다음, 1시간 후 LPS (1 μg/ml)를 처리하고 12시간 동안 배양하여 TNF-α의 효과를 ELISA kit를 이용하여 확인하였다. LPS처리군은 control군에 비해 유의성 있게 증가하였으며 이러한 증가는 HCE에 의해 억제되었다(Fig. 5A, light). 또한 MAPKs는 ERK (extracellular signal-regulated kinase, p44/42), JNK(c-Jun

N-terminal kinases), p38의 3종으로 구성된다. 세포 질에 존재하다가, LPS 등의 신호자극에 의해 인산화되어 핵으로 들어가서 NF-κB 등의 전사인자들을 활성화하고, 관련 단백질을 유도한다²¹. HCE에 의한 MAPK 활성화변화를 측정하기 위하여 JNK, ERK 및 p38의 인산화를 관찰하였다. LPS에 의해 증가된 3종의 MAPK 인산화는 HCE에 의해 억제되었는데, 그 중 ERK가 가장 강력한 억제효과가 나타났다(Fig. 5B).

IV. 고 찰

본 연구에서는 석결명 추출물이 Raw 264.7 세포에 미치는 항염증 효과를 관찰하였다. 염증은 각종 유해한 자극에 반응하여, 유해물질에 의해서 유발되는 상

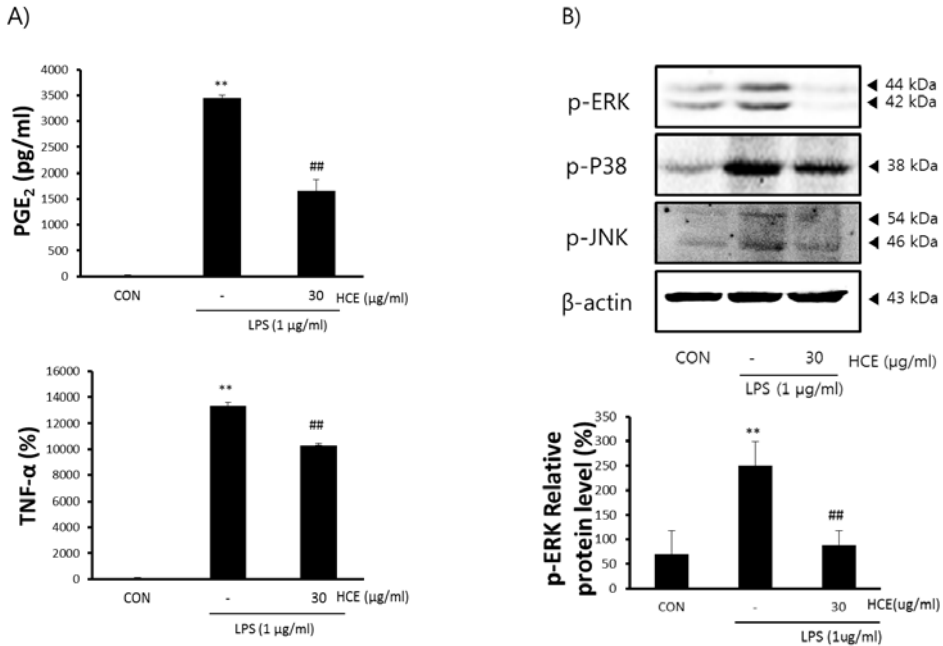


Fig. 5. The inhibitory Effects of HCE on the production of cytokines and expression of mitogen activated protein kinases (MAPKs).

(A) Raw 264.7 cells were cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of HCE for 12 h to determine the level of PGE₂ and TNF-α. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE₂ and TNF-α. The amount of cytokines were measured by immunoassay as described in materials and methods. The data represent the mean ± S.D. of three separate experiments. (B) Cells were treated with indicated concentrations of HCE for 1 h and induced with 1 μg/ml LPS for 15 minutes. The β-actin was used as a loading control. The significances of the difference between the treated groups was evaluated using the t-test (significant as compared with vehicle-treated control, ***p* < 0.01; significant as compared with LPS alone, ##*p* < 0.01).

해를 제거하고, 원래의 상태로 회복하려는 생체 조직의 방어 기작이다. 수많은 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 크게 상관없이 유사한 변화를 보이는데, 주로 발적, 동통, 발열, 종창과 같은 징후가 발생된다²²⁾. 전통적으로 염증은 “균의 감염, 외상, 열, 항원항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전”라고 정의된다. 그러나, 염증은 현재 신체 국소에서 일어나는 상해에 대한 생체조직의 방어반응으로 인식되기도 한다. 염증반응에서 일어나는 변화는 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체 내 국소 부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 하는데, 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, NO, PG, 염증을 유발시키는 여러 cytokine 등이 있다²²⁾.

NO는 면역기능, 혈압조절, 혈액응고, 신경전달 등의 역할을 하고, 항균작용과 종양제거에 있어서 중요한 역할을 한다²³⁻²⁵⁾. 또한 NO는 박테리아를 죽이거나 종양을 제거 시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO 형성은 염증을 유발하게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 유발한다²⁶⁾. 이러한 NO는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 합성된다^{23,24)}. NOS는 type I, II 및 III로 나누어진다. Type I (neuronal NOS, nNOS)과 Type III (endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 구성 NOS(constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS와 cytokines 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II인 유도형

NOS (iNOS)로 나누어진다²⁷⁾. 세포의 NOS 중에서 iNOS가 주로 염증에 관여하는데 LPS, Interferon 등 염증성 자극이 있을 때 활성화된다²⁸⁾. 이러한 iNOS에 의해 다량 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진 시키고 염증 매개 물질의 생합성을 촉진 하여 염증을 심화시킨다^{8,9)}.

본 연구에서는 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 HCE의 NO 및 iNOS에 대한 억제를 평가하기 위하여 HCE를 3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양 및 iNOS의 발현을 관찰하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량 및 iNOS의 발현양이 증가하였으며, HCE를 처리한 군에서는 농도의존적으로 감소하였다. LPS로 유도된 NO 및 iNOS의 생성을 감소시킨 것이 HCE의 세포독성으로 인한 세포수의 저하에서 기인하였는지 관찰하기 위해 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하여 확인해본 결과 HCE 3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. HCE는 오히려 LPS에 의한 세포독성을 억제하였다 (data not shown). 이러한 결과로 볼 때 LPS에 의한 과량의 NO가 Raw 264.7 cells의 세포생존율을 저하시켰으며, HCE는 NO의 생성을 억제함으로써 세포생존율을 증가시킨 것으로 판단된다.

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주지만, 대부분 내인성 화학전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포로 전달된다. 염증 반응의 주요 화학 전달 매개물질로, 크게 즉시형 혈관 투과성 항진에 관여하는 amine류 (serotonin, histamine 등)와 kinin류 (bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 PG 등으로 분류된다²⁹⁾. 그 중, COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 세포자멸사의 억제, 세포분열 및 암세포 전이, 혈관신생을 유도하여 종양의 형성에 기여하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 HCE이 COX-2 단백질 발현을 억제하는지 평가해 본 결과 HCE은 LPS에 의해 증가된 COX-2 단백질 발현을 농

도의존적으로 감소 시켰으며 PGE₂의 생성 또한 유의성 있게 억제하였다. 이 결과는 HCE이 COX-2 단백질의 발현을 억제하며, 이를 통하여 PGE₂의 생성 억제가 나타나는 것을 의미한다.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다²²⁾. TNF- α 는 pro-inflammatory cytokine으로서 macrophages, endothelial cells, mast cells 등으로부터 분비된다. 근래 TNF- α 는 많은 자가면역질환에 있어서 염증의 개시 및 유지에 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{18,20)}. 본 연구에서 LPS는 Raw 264.7 cell에서 TNF- α 의 분비를 유의하게 촉진시켰으며, HCE는 TNF- α 의 생성량을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 HCE가 여러 종류의 면역계제 염증성 질환을 유의하게 개선시킬 수 있음을 의미한다.

염증 매개 단백질의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절 인자로는 NF- κ B, AP-1, C/EBP 등이 있으며¹⁸⁾, 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NF- κ B 이다³¹⁾. NF- κ B는 세포사멸의 억제, 세포주기조절, 종양 형성 등과도 관련이 있으며¹⁹⁾, virus나 bacteria 감염 시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS 나 COX-2 유전자의 발현에 관련 된다¹⁸⁾. NF- κ B는 세포질에서 inhibitory molecule인 I κ B α 와 결합하여 비활성형으로 존재하지만 자극에 의해 NF- κ B가 활성화되면 I κ B α 가 degradation 되면서 NF- κ B가 핵으로 translocation하여 target gene의 전사를 유도한다¹⁹⁾. 또한, MAPK는 ERK, p38, JNK의 3종으로 주로 인산화되지 않은 상태로 세포질에 존재하다가, 자극에 의해 염증반응이 활성화되면 인산화되어 핵으로 전위하여 NF- κ B 등의 전사인자들을 활성화하여 관련 단백질을 유도하는 핵심 신호전달 분자로 보고되고 있다²¹⁾. 본 연구에서는 I κ B α 의 phosphorylated form을 측정하였다. LPS 처리 시에는 p-I κ B α 단백질이 유도되었으나, LPS에 HCE를 처리한 실험군에

서는 p-I κ B α 의 양이 감소하였다. 이는 iNOS의 감소기 전에, NF- κ B의 translocation이 HCE에 의해 억제됨을 간접적으로 보여주고 있다고 할 수 있다. 또한, HCE는 LPS로 유도된 MAPKs의 인산화를 감소시켰다. 이러한 결과는 HCE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B, MAPK의 억제를 통해 염증매개 반응을 억제함을 의미한다.

石決明은 한의학적으로 性은 微寒하며, 味는 甘苦鹹하다. 그 효능으로는 淸肝明目, 潤腸通便의 작용이 있어, 目赤腫痛, 頭痛, 眩暈, 目不明 등의 증상을 치료한다¹³⁾. 이러한 석결명의 효능은 인체의 熱을 낮추어 통증을 제거하는 의미라고 해석할 수 있는데, 이는 현대의학적으로 염증반응의 개선효과를 통해서도 드러날 수 있다. 그러므로, 전통한의학적 지식과 본 연구 결과를 바탕으로 석결명이 가지는 항염증, 항산화 효능에 대한 보다 다각도의 연구가 필요하다고 하겠다.

V. 결 론

본 연구에서는 석결명추출물 (HCE)의 항염증효능을 평가하기 위하여, Raw 264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후 NO의 생성량과 iNOS, COX-2, I κ B α , p-I κ B α , NF- κ B, MAPKs의 발현 및 PGE₂, TNF- α 등에 미치는 HCE의 영향을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HCE는 LPS에 의해 증가한 NO 생성을 유의하게 억제하였으며, NO를 억제한 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 또한 LPS에 의해 증가된 iNOS의 발현을 감소시켰다.
2. HCE는 LPS로 증가된 I κ B α 의 인산화를 감소시켰으며, 핵으로의 NF- κ B 전위를 억제하였다.
3. HCE는 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 분비되는 TNF- α 의 생성량을 감소시켰으며, LPS에 의해 발현이 증가된 COX-2와 PGE₂를 감소시켰다.
4. HCE는 LPS에 의해 증가된 MAPKs의 인산화를

억제하였다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No.2012-0009400)

참고문헌

1. Yun HJ, Hoe SK. Anti-inflammatory Effect of Injinho-tang in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology*. 2008;23:169-78.
2. Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payá M, et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;361:98-106.
3. Kim ID, Kang KS, Kwon RH, Yang JO, Lee JS, Ha BJ. The Effect of Rubus coreanum Miquel Against Lipopolysaccharide-induced Oxidative Stress and Lipid Metabolism. *J Fd Hyg Safety*. 2007;22:213-7.
4. Charles AJ. *Immunobiology*, 5th. Seoul:Life science Publication co. 2002:76-7.
5. Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L622-45.
6. Brown Z, Robson RL, Westwick J. Regulation and expression of chemokines : potential role in glomerulonephritis. *J Leukoc Biol*. 1996;59:75-80.

7. Melcion C, Lachman L, Killen PD, Morel-Maroger L, Striker GE. Mesangial cells, effect of monocyte products on proliferation and matrix synthesis. *Transplant Proc.* 1982;14:559-64.
8. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res.* 2001;7:431-8.
9. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res.* 2003;17:485-9.
10. Yoon HJ, Moon ME, Park HS, Im SY, Lee JH, Kim YH. Research Papers : Effects of Chitosan oligosaccharide on the *C. albicans*-induced Inflammatory Effect in Mice and RAW264.7 Macrophage Cells. *J Chitin Chitosan.* 2007;12:15-20.
11. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem.* 1991; 266:7313-6.
12. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today.* 1997;18:487-92.
13. Kang So Sin Medical Institute. Dictionary of Chinese Medical Herbs. Shanghai Science Publishing. 1998;2895-6.
14. Jang JH, Lee C, Kim SC, Chung JW, Park CI. Protective Effect of Marine Natural Products against UVB-induced Damages in Human Skin Fibroblast via Antioxidant Mechanism. *J Soc Cosmet Scientists Korea.* 2010;36:79-87.
15. Lee C, Jang JH, Kim BA, Park CI. Anti-aging Effects of Marine Natural Extracts against UVB-induced Damages in Human Skin Cells. *J Soc Cosmet Scientists Korea.* 2012;38: 255-61.
16. Jeong DY, Kim YJ, Shim JS, Lee JH, Jung SK, Kim SY, et al. The Effect of *Halitidis Concha* on the Growth and Ginsenoside Biosynthesis of Korean Ginseng Hairy Root. *J Ginseng Res.* 2009;33:206-11.
17. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol.* 2008;154:165-73.
18. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology.* 2003;139: 11-20.
19. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 2001;159: 387-97.
20. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 2003;37:355-61.
21. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine

- recycling. *J Nutr*, 2007;137:1616S-20S.
22. Hwang SY, Jo MJ, Kim SC, Jee SY. Anti-inflammatory effects of the MeOH extract of *Humulus japonicus* in vivo. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2009;22:92-103.
23. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258:1898-902.
24. Galla HJ. Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1993;32:378-80.
25. Weis ZA, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. 1996;316:209-15.
26. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1993;178:749-54.
27. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6:3051-64.
28. Cheon YP, Mohammad LM, Park CH, Hong JH, Lee GD, Song JC, et al. *Bulnesia Sarmienti* Aqueous Extract Inhibits Inflammation in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Journal of Life Science*. 2009;19:479-485.
29. Heo JY, Jeong CH, Sim GH. Chemical Components of *Humulus japonicus* Leaves and Stalks. *Journal of Agriculture & Life Sciences*. 2003;37:1-7.
30. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:736-47.
31. Park HJ, Yoon HJ, Yoon JW, Yoon SW, Ko WS. Inhibitory Effect of Omisodok-eum on the Secretion of NO in LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages. *Korean journal of oriental physiology & pathology*. 2002;16:921-7.