

仙鶴草추출물의 대식세포에서의 LPS-유도 염증반응에 대한 효능 연구

황지혜^{1#}, 남주현², 김우경³, 배효상^{4*}

1 : 동국대학교 한방신약개발센터, 2 : 동국대학교 의과대학 생리학교실,
3 : 동국대학교 의학전문대학원 알레르기내과, 4 : 동국대학교 한의과대학 사상체질의학교실

Effects of Agrimoniae Herba 30% ethanol extract on LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophage cells

Ji Hye Hwang^{1#}, Joo Hyun Nam², Woo Kyung Kim³, Hyo Sang Bae^{4*}

1 : Korean Medicine R&D Center, Dongguk University,
2 : Department of Physiology, College of Medicine, Dongguk University,
3 : Department of Internal Medicine, Graduate School of Medicine, Dongguk University,
4 : Department of Sasang Constitutional Medicine, college of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The aerial parts of *Agrimonia pilosa* Ledeb (Agrimoniae Herba; AH) has been traditionally used as a Korean medicine to treatment of abdominal pain, sore throat, headaches, bloody discharge, parasitic infections and eczema. In this study, we investigated the effect of AH ethanol extract on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW264.7 macrophage cells.

Methods : AH was extracted by 30% ethanol (AH-E). Raw264.7 cells were treated with AH-E extract at different concentrations for 30 min and then stimulated with LPS (1 μ g/ml) or without for indicated times. Cell viability was measured by MTT assay, and nitric oxide (NO) production was measured by Griess assay. The expression of inflammatory mediators, iNOS and COX-2 and inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 was detected by RT-PCR, and the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK MAP kinases (MAPKs) was analyzed by Western blot. Also, the expression of NF- κ B in nuclear and cytosol was detected by Western blot.

Results : AH-E extract significantly decreased LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. AH-E extract inhibited the mRNA expression of iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in LPS-stimulated cells with a dose-dependent manner. In addition, the phosphorylation of ERK, p38 and JNK MAPKs was also inhibited by AH-E extract. AP-E extract inhibited the nuclear translocation of NF- κ B in LPS-stimulated cells.

Conclusions : Our results suggest that AH-E extract has an anti-inflammatory activity in macrophages-mediated inflammation.

Key words : *Agrimonia pilosa* Ledeb, 30% ethanol extract, anti-inflammation, RAW264.7 cells

서론

아토피피부염(Atopic dermatitis)은 주로 유소아에서 발생하는 만성 재발성 피부염으로 알레르기 반응이 유전적으로 발생하는 아토피 질환에 속한다¹⁾. 아토피피부염은 대개 생후

2-3개월부터 2세 사이에 발생하여 일생 동안 지속적으로 나타날 수 있는 급·만성 습진이며, 얼굴, 머리, 몸통, 팔다리 등 퍼지는 부위에 주로 발생하여 태열과 급성 습진의 양상을 나타내게 된다. 현재 전 세계적으로 아토피 피부염 환자 수가 증가하는 추세로 우리나라에서도 유병률이 꾸준히 증가하여

*Corresponding author : Hyo Sang Bae, Department of Sasang Constitutional Medicine, college of Korean Medicine, Dongguk University
· Tel : +82-31-961-9041 · E-mail : bjypapa@gmail.com

#First author : Ji Hye Hwang, Korean Medicine R&D Center, Dongguk University
· Tel : +82-54-770-2658 · E-mail : jhbori@nate.com

· Received : 21 February 2016 · Revised : 25 March 2016 · Accepted : 25 March 2016

최근 20-30년 사이 어린이의 20% 이상에서 발병하는 것으로 보고되고 있다²⁾. 아토피피부염은 나이에 따라 유아기, 소아기, 사춘기 및 성인기로 구분하였으나 최근 알레르기 유무에 따라 내인성과 외인성으로 구분하고 있다. 아토피피부염은 복합적 요인으로 발병하는 다인자성 질환으로 발생 원인은 현재까지 구체적으로 밝혀지지 않았으며 가족력에 따른 유전적 요인, 알레르겐이나 자극물질, 감염, 기후, 스트레스 등의 환경적 요인, 2형 보조(Th2) T세포 면역반응의 이상, 피부보호막의 이상 등의 원인으로 다양한 아토피 피부염 증상이 발현하게 된다^{1,3)}. 현재 아토피피부염의 치료는 피부보습, 스테로이드 연고, 국소 면역조절제 등을 통한 일반 치료 외 항히스타민제, 피부감염 치료, 감마리놀렌산 등을 이용한 보조치료, 그리고 광선치료, 전신스테로이드제, 면역억제제 등의 선택치료를 사용하고 있다. 이중 국소 스테로이드제는 지난 50년 이상 아토피 피부염의 가장 기본적이고 효과적인 치료제로 사용되고 있다⁴⁾. 그러나 최근 피부 위축, 모세혈관확장증, 스테로이드성 여드름, 자색반, 팽창선, 다모증, 자반, 녹내장 등 다양한 부작용이 알려지면서 아토피 피부염 환자나 보호자의 70%가 스테로이드제 사용을 꺼리는 추세로 민간요법에 대한 이용 빈도가 높고 새로운 치료요법이나 치료제에 대한 관심도 높은 질환이다.

한의학에서 아토피피부염은 濕疹, 奶癬, 乳癬, 浸淫瘡, 胎熱, 血風瘡, 四彎風, 旋耳瘡 등의 범주로 설명하고 癢痒感, 紅斑, 浮腫, 滲出物, 鱗屑, 痂皮 등의 증상이 나타난다^{5,6)}. 이들의 발병 원인을 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能失調에 의한 胎火濕熱, 風濕熱의 侵入 등으로 본다⁷⁾. 한의학적 기본 치료방법은 淸熱解毒이 주가 되며 濕型和 乾型으로 나눌 수 있는데, 濕型의 경우 燥濕, 淸熱, 止痒의 治法으로 하고 乾型의 경우 淸熱, 止痒, 佐以除濕의 治法으로 한다⁸⁾.

仙鶴草(*Agrimonia pilosa* Ledeb; *Agrimoniae Herba*)는 장미과에 속한 다년생 본초인 깊은나물의 쏜초로, 性은 平하고 味는 苦澁하며 收斂止血, 截癩, 止痢, 解毒殺蟲의 효능이 있어 咯血, 吐血, 崩漏下血, 血痢脫力勞傷 등의 出血症과 癩疾, 癰腫瘡毒, 陰痒帶下 등에 사용한다⁹⁾. 한방에서는 지혈작용으로 이질, 위궤양, 장염, 설사, 자궁출혈 등에 사용해왔고, 민간요법으로는 폐암, 간암, 식도암, 종양, 통증제거, 지형, 지사, 토혈, 혈뇨, 결기 등에 활용되어 왔다^{10,11)}. 선학초는 전초에서 agrimonin, agrimonolide, tomentonic acid, ellagic acid 및 잎과 줄기에서 luteolin-7-glucoside이 주요 성분으로 구성되어 있고^{12,13)}, 최근 실험연구로서 항여드름 효과¹⁴⁾, 간 보호 효과¹⁵⁾, 혈관이완 효과¹⁶⁾, 항산화 활성 및 암세포 성장저해 활성¹⁷⁾, 폐암 종양크기 감소 효과¹⁸⁾, 항알레르기 효과¹⁹⁾, 항산화효소 활성 증진 효과²⁰⁾, 아토피 피부염에 대한 화피(樺皮), 만형자(蔓荊子), 선학초 외용제의 임상 효과²⁰⁾ 및 뇌 출혈 억제 효과²¹⁾ 등이 다양하게 보고되었다.

본 연구에서는 선학초의 항아토피 효능 중 염증반응에 대한 효과를 확인하기 위해 마우스 대식세포에서의 LPS-유도 염증반응에 대한 억제 효과와 기전을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 선학초(*Agrimoniae Herba*; AH)는 광명당제약(울산, 한국)으로부터 표준약재를 구입하여 추출물 제조에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약으로 lipopolysaccharide(LPS), MTT-based cell proliferation kit, Sulfanilamide, N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride(NED)는 Sigma-Aldrich사(St Louice, CA, USA), TRIzol reagent, NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents는 Thermo Fisher Scientific사(Grand Island, NY, USA), RIPA buffer, Quick Start™ Bradford Protein Assay 용액은 Bio-Rad Laboratories사(Philadelphia, PA, USA), M-MLV reverse transcriptase는 Promega사(Madison, WI, USA), Taq-based PCR enzyme는 Toyobo사(Osaka, Japan), ERK1/2, p38, JNK, NF- κ B에 대한 단클론항체(mAb)는 Cell Signaling사(Denvers, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 기기로 회전식 감압농축기(rotary evaporator)와 동결건조기는 선일아이러사(경기도, 한국), Asys microplate reader는 Biochrom사(Cambridge, UK), BioDoc-It² Imaging Systems은 UVP사(Upland, CA, USA), Nano-Drop은 Thermo Fisher Scientific사 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물 제조

선학초추출물은 선학초(*Agrimoniae Herba*; AH)의 전초 100 g을 30% 에탄올로 95 °C에서 2시간 추출하였으며 3겹 거즈 및 와트만 거름종이(Whatman No. 1)로 거른 후 회전식 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 이를 냉동시킨 후 동결건조기로 건조하였으며 이때 수율은 18.4%였다. 건조된 추출물은 가루 상태로 마쇄한 후 일정 용기에 담아 냉동 보관하였으며, 1x PBS에 일정 농도로 완전 용해시킨 후 0.22 μ m 주사기 필터(syringe filter)로 필터한 후 시험약물(AH-E extract)로 사용하였다.

2) 세포배양

RAW264.7 세포는 ATCC사(Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 기본 배지로 하여 배양하였다.

3) 세포독성 평가

RAW264.7 세포에서 선학초추출물의 독성 농도를 선정하기 위해 MTT-based proliferation assay를 수행하였다. 즉, RAW264.7 세포(1×10^5 / ml)를 24-well culture plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/ml 농도로 처리한 후 24시간 배양하였다. 여기기에 10 μ l MTT(5 mg/ml) 용액을 넣고 37 °C CO₂ incubator에서 2시간 이상 반응시킨 후 상층액을 모두 제거하고 100 μ l DMSO를 첨가하여 교반기 위에서 15분 간 용해시켰다. 반응

액의 흡광도를 microplate reader기를 이용하여 590 nm에서 측정하였다. 세포생존도(%)는 정상세포의 생존률 100%를 기준으로 선학초추출물 처리군의 생존율을 계산하였다.

4) Nitric oxide(NO) 측정

세포배양액 내 NO 농도를 측정하기 위해 Griess assay를 수행하였다. 먼저 RAW264.7 세포(1×10^5 / ml)를 24-well culture plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하여 30분 간 배양하였다. 여기에 LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리 혹은 처리하지 않고 24시간 배양한 후 세포배양액을 수거하였다. 세포배양액 100 μl 를 96-well plate에 넣고 1% sulfanyamide(in 5% phosphoric acid) 용액 50 μl 와 0.1% NED 용액(in water) 50 μl 를 각각 넣은 후 실온에서 10분 간 정치하였다. 반응액의 흡광도를 microplate reader기를 이용하여 540 nm에서 측정하였으며, 0.1 M sodium nitrite(in water) 표준용액의 흡광도 곡선(reference curve)을 기준으로 NO의 농도를 계산하였다.

5) RT-PCR

세포 내 유전자 발현 변화를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 즉, RAW264.7 세포(1×10^5 / ml)를 6-well culture plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하여 30분 간 배양하였다. 여기에 LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리 혹은 처리하지 않고 5시간 배양한 후 세포를 수거하고 Trizol reagent를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 DEPC water에 녹인 후 Nano-Drop을 이용하여 정량하였다. 5 μg RNA에 M-MLV reverse transcriptase를 넣고 25 $^{\circ}\text{C}$ 10분, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60분, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15분 조건으로 반응시켜 cDNA를 합성하였으며, cDNA에 Taq-based PCR enzyme과 primer(Table 1)를 넣어 94 $^{\circ}\text{C}$ 30초, 58~61 $^{\circ}\text{C}$ 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60초 조건을 30회 반복하는 PCR을 수행하였다. PCR 반응산물은 EtBr이 함유된 1% agarose gel에서 100V 조건으로 20분 간 전기영동한 후 BioDoc-It² Imaging Systems을 이용하여 확인하였다. 각 밴드는 Image J program을 이용하여 density를 측정하고 GAPDH 발현에 대한 비율로 계산하여 반복실험에 대한 결과를 Histogram으로 나타내었다.

Table 1. Primer sequences for PCR

Name		Sequence (5'→3')
iNOS	Forward	CCCGAAGTTTCTGGCAGC
	Reverse	GGCTGTCAGAGCCTCGTGCTT
COX-2	Forward	GGAGAGACTATCAAGATAGTGATC
	Reverse	ATGTCAGTAGACTTTTACAGCTC
TNF- α	Forward	ATAGCTCCAGAAAAGCAAGC
	Reverse	CACCCCGAAGTTCAGTAGACA
IL-1 β	Forward	GCCTTGGGCCCTAAAGGAAAAGATC
	Reverse	GGAAGACACAGATTCATGGTGAAG
IL-6	Forward	TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG
	Reverse	TCTGACCACAGTGGGAATGTCCAC
GAPDH	Forward	GACATCATACTTGGCAGGTT
	Reverse	CTCGTGGAGTCTACTGGTGT

6) Western blot

세포 내 단백질 발현 변화를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. 즉, RAW264.7 세포(1×10^5 / ml)를 6-well culture plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하여 30분 간 배양하였다. 여기에 LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리 혹은 처리하지 않고 15분(MAPK), 2시간(NF- κB) 배양한 후 세포를 수거하고 RIPA buffer를 이용하여 세포질을 분리하였다. 한편 NF- κB 의 핵에서의 발현 확인을 위해서 NE-PER nuclear and cytosol isolation kit를 이용하여 핵과 세포질을 각각 분리하였다. 세포질 내 단백질의 양을 Bradford protein assay 용액으로 측정한 후 30 μg 단백질을 SDS-PAGE하고, nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 3% bovine serum albumin(BSA) 용액으로 실온에서 1시간 block한 후 각 단백질에 대한 primary antibody를 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 O/N 반응시켰다. Membrane을 Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20(TBST) buffer(pH 7.5)로 5회 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody 용액과 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 TBST buffer로 5회 세척한 후 X-ray film에 감광시켜 밴드 유무를 확인하였다. 각 밴드는 Image J program을 이용하여 density를 측정하고 β -actin 발현에 대한 비율로 계산하여 반복실험에 대한 결과를 Histogram으로 나타내었다.

7) 통계학적 검정

모든 실험결과는 최소 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)에서 one-way ANOVA와 Tukey's test를 이용하여 검정하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성 평가

RAW264.7 세포에서 선학초추출물(AH-E extract)의 독성정도를 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 선학초추출물 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 처리 농도에서는 세포만 배양한 경우와 유사한 생존도를 나타내었으며, 0.5 mg/ml 처리 농도에서는 독성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 이후 실험에서는 독성이 나타나지 않은 0.5 mg/ml 이하 농도에서 수행하였다.

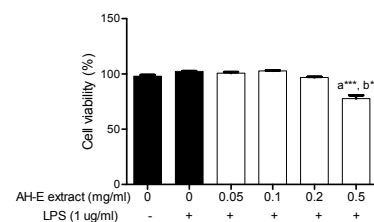


Fig. 1. Effect of Agrimoniae Herba ethanol extract on cell viability in RAW264.7 cells. Cells were treated with Agrimoniae Herba 30% ethanol (AH-E) extract at 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 mg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Data represents mean \pm SD of three independent experiments. *** P < 0.001 vs. normal (a) or LPS alone (b).

2. NO 생성에 대한 효과

활성화된 대식세포로부터 분비되는 대표적 염증물질인 Nitric oxide(NO)에 대한 선학초추출물(AH-E extract)의 억제 효과를 확인하기 위해 세포배양액 내 NO 농도를 Griess assay 방법으로 측정하였다. 그 결과, NO의 농도는 LPS 자극에 의해 현저히 증가되었으며, 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하였을 때 LPS 처리군에 비해 유의적으로 또한 처리농도에 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 한편 선학초추출물을 단독으로 처리한 군에서는 정상군과 마찬가지로 NO의 농도 증가가 나타나지 않았다.

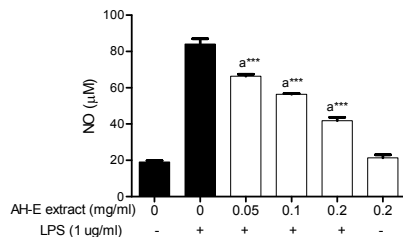


Fig. 2. Effect of Agrimoniae Herba exthanol extract on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. Cells were treated with Agrimoniae Herba 30% ethanol (AH-E) extract at 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 mg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 µg/ml) for 24 hr. NO levels were measured in culture medium by Griess assay. Data represents mean \pm SD of three independent experiments. $^{***}P < 0.001$ vs. LPS alone (a).

3. iNOS 발현에 대한 효과

NO 합성효소인 iNOS 발현에 대한 선학초추출물(AH-E extract)의 억제 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, iNOS의 유전자 발현은 LPS 자극에 의해 증가되었으며, 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하였을 때 처리농도에 의존적인 감소를 나타내었다(Fig. 3). 한편 선학초추출물을 단독처리 군에서는 정상군과 유사하게 증가하지 않는 것으로 나타났다.

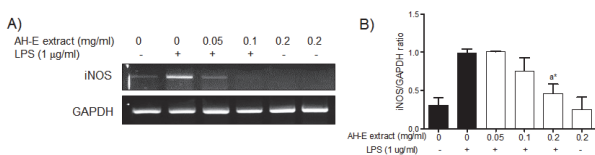


Fig. 3. Effect of Agrimoniae Herba exthanol extract on LPS-induced iNOS expression in RAW264.7 cells. Cells were treated with Agrimoniae Herba 30% ethanol (AH-E) extract at 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 mg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 µg/ml) for 5 hr. (A) The expression of iNOS mRNA was determined by RT-PCR. (B) iNOS band was analyzed per a GAPDH as an internal control, and represents histogram with mean \pm SD of three independent experiments. $^{*}P < 0.05$ vs. LPS alone (a).

4. COX-2 발현에 대한 효과

iNOS와 마찬가지로 대표적 염증물질인 COX-2 발현에 대한 선학초추출물(AH-E extract)의 억제 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, COX-2의 유전자 발현

은 LPS 자극에 의해 증가되었으며, 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하였을 때 처리 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 4). 한편 선학초추출물 단독 처리군에서는 COX-2의 유전자 발현이 낮은 것으로 나타났다.

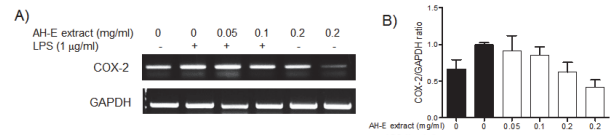


Fig. 4. Effect of Agrimoniae Herba exthanol extract on LPS-induced COX-2 expression in RAW264.7 cells. Cells were treated with Agrimoniae Herba 30% ethanol (AH-E) extract at 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 mg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 µg/ml) for 5 hr. (A) The expression of COX-2 mRNA was determined by RT-PCR. (B) COX-2 band was analyzed per a GAPDH as an internal control, and represents histogram with mean \pm SD of three independent experiments.

5. 염증성 사이토카인 발현에 대한 효과

대표적 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 발현에 대한 선학초추출물(AH-E extract)의 억제 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 유전자 발현은 모두 LPS 자극에 의해 증가되었고, 선학초추출물을 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도로 처리하였을 때 농도 의존적인 감소를 나타내었다(Fig. 5). 한편 선학초추출물을 단독처리 군에서는 정상군과 마찬가지로 TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자 발현에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

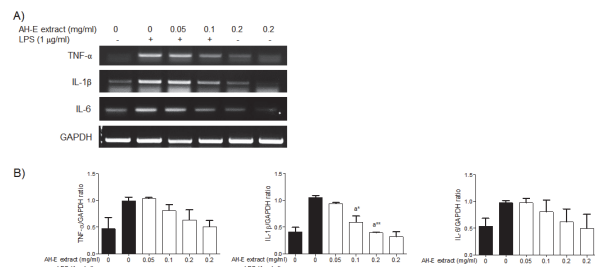


Fig. 5. Effect of Agrimoniae Herba exthanol extract on LPS-induced expression of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells. Cells were treated with Agrimoniae Herba 30% ethanol (AH-E) extract at 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 mg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 µg/ml) for 5 hr. (A) The mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 was determined by RT-PCR. (B) Each band was analyzed per a GAPDH as an internal control, and represents histogram with mean \pm SD of three independent experiments. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ vs. LPS alone (a).

6. 염증신호분자 발현에 대한 효과

활성화된 대식세포에서 염증물질의 합성과 분비를 조절하는 염증신호전달 분자들의 활성화에 대한 선학초추출물(AH-E extract)의 억제 효과를 확인하기 위해 ERK1/2, p38, JNK MAPKs와 NF- κ B에 대한 Western blot을 수행하였다. 그 결과, ERK1/2, p38, JNK MAPK 분자들은 모두 LPS 자극에 의해 인산화가 증가되었고, 선학초추출물 0.1 mg/ml 과 0.2 mg/ml 농도에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6A). 한편 선학초추출물을 단독처리 군에서는 정상군과 마찬가지로

ERK1/2, p38, JNK MAPK 분자들의 인산화에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 핵과 세포질에서의 NF- κ B 발현 변화를 조사한 결과, LPS 자극 후 NF- κ B의 핵으로의 이동에 의한 발현 증가가 관찰되었으며, 선학초추출물 처리에 의해 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6B).

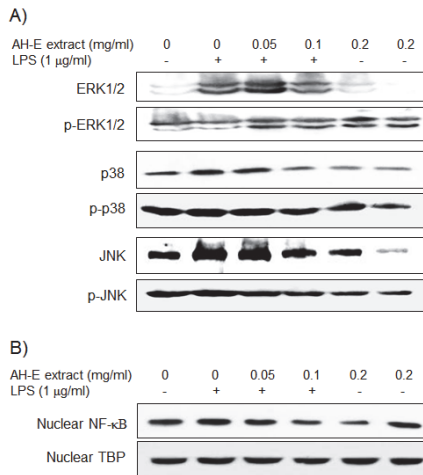


Fig. 6. Effect of Agrimoniae Herba ethanol extract on LPS-induced expression of MAP kinases and NF- κ B in RAW264.7 cells. Cells were treated with Agrimoniae Herba 30% ethanol (AH-E) extract at 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 mg/ml for 30 min, and then stimulated with or without LPS (1 μ g/ml) for 15 min (for MAPKs) and 2 hr (for NF- κ B). (A) The phosphorylation of ERK1/2, p38, and JNK MAPKs was determined in cytosol by Western blot. (B) The expression of NF- κ B p65 was determined in nuclear by Western blot.

고찰

선학초는 薔薇果에 속한 다년생 본초인 짚신나물의 全草로, 큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria* L.)외에 짚신나물(*Agrimonia pilosa* L.), 산짚신나물(*Agrimonia coreana Pilosella* Satake) 등이 알려져 있으며, 이들을 통틀어 용아, 용아초, 황아초, 황용초, 지선초 등으로 부르기도 한다^{9,10}. 선학초는 다양한 추출물 형태에서 효능 보고가 이루어져 있는데, 메탄올추출물의 여드름 유발균 증식 억제 효과¹⁴, 물추출물의 흰쥐에서의 CCL₄-유도 급성 손상에 대한 간 보호 효과¹⁵, 부탄올추출물의 흰쥐 대동맥 혈관에서의 이완효과¹⁶, 다양한 분획물들의 항산화 활성 및 대장암, 위암, 자궁경부암 세포에서의 성장저해 활성¹⁷, 폐암 유발 마우스에서의 종양크기 감소 효과¹⁸, 메탄올추출물의 난알부민-유도 폐염증 유발 마우스에서의 알레르기성 염증 억제 효과¹⁹, 물추출물의 항산화효소 활성 증진 효과¹², 아토피 피부염에 대한 화피(樺皮), 만형자(蔓荊子), 선학초 외용제의 임상 효과²⁰ 및 흰쥐에서의 뇌 선초체 내 출혈 억제 효과²¹ 등이 보고되었다. 본 연구와 유사하게 메탄올 추출물이 NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6 분비와 iNOS, COX-2 발현을 억제한다는 보고가 있으나 ERK, JNK, p38 MAPK의 인산화에 대해 효과가 없는 것으로 보고¹⁹되어 차이를 나타내었다. 이는 추출물 유형 차이로 인해 활성에 차이가 나타난 것으로 해석할 수 있으나 이에 대해서는 추후 좀 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구자는 아토피피부염에서 나타나는 소양감, 피부손상,

염증반응 중에서 선학초는 염증을 억제하는 효능이 있다는 것에 착안하여 아토피피부염에 대한 효능을 검증하기 위한 연구 중 하나로 본 연구에서와 같이 RAW264.7 대식세포에서의 LPS-유도 염증반응에 대한 억제 효과를 조사하였다.

아토피 피부염은 심한 소양감을 동반하는 만성 재발성 피부염증이기 때문에 염증억제는 중요한 치료목표이며 스테로이드 제제에 비해 부작용이 적은 천연물제제에 대한 관심이 높아지고 있다²²⁻²⁴. 이러한 변화에 맞추어 염증과 알레르기에 관련된 세포 내 분자들을 대상으로 직접적인 항염증 인자 및 간접적으로 병리적 유관성을 가진 인자들에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다²⁵⁻²⁷.

한편 초기 염증반응에서는 항원을 인지한 대식세포가 항원을 처리하면서 면역세포에 항원을 제공함과 동시에 염증물질인 NO를 생성하고, TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 사이토카인들을 분비하게 된다^{28,29}. TNF- α 는 염증초기에 감염부위의 모세혈관 투과성을 증가시켜 해당 부위로 호중구를 유도하며, 급성 염증반응을 일으키는 주요 인자이고³⁰, IL-6는 백혈구내의 B림프구의 분화와 성장을 증가시키며, 항체를 생성하게 되면서 알레르기성 염증을 만성적인 단계로 진행시키게 된다³¹.

일반적으로 면역세포 내 염증 반응이 일어나게 되면 NO가 다량 합성되는 것으로 알려져 있는데, NO는 iNOS에 의해 합성되고 면역반응에 중요한 요소로서 특히 대식세포에서 만들어지는 고농도의 NO는 산화적 스트레스를 통해 염증유발 및 조직 손상과 관련이 있는 것으로 알려져 있고, 다양한 염증질환에서의 증상 유발과 질병 악화에 기여하는 것으로 알려져 있다^{32,33}. 본 연구에서 선학초의 30% 에탄올추출물은 RAW264.7 세포에서 LPS 자극에 의한 NO의 분비를 농도 의존적으로 감소시킴으로써 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

COX-2는 염증물질인 PGE₂를 합성하는 효소단백질로 PGE₂ 합성을 통해 혈관확장, 통증, 발열작용 등을 통한 염증유발과 면역반응을 과도하게 촉진시키는 작용이 있어 염증조절에 중요한 인자로 알려져 있다³⁴. 따라서 iNOS와 COX-2의 발현이나 NO, PGE₂의 정량 평가는 약물의 항염증 효능을 평가하는데 유용한 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서 선학초의 30% 에탄올추출물은 LPS 자극으로부터 발현이 증가되는 iNOS와 COX-2의 전사단계 조절을 통해 염증물질의 생성을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

LPS는 대식세포에서 toll-like receptor(TLR) 4와 결합함으로써 활성화되어 각종 염증물질의 합성-분비를 통해 염증의 개시 및 유지에 중요한 작용을 한다. 이러한 염증반응은 ERK, p38, JNK MAPK와 같은 염증신호분자들의 인산화와 염증전사인자인 NF- κ B pathway를 통해 각종 염증성 사이토카인들이나 염증물질의 합성과 분비로 급성 염증반응 뿐 아니라 만성 염증반응으로의 이행을 유도하게 된다³⁵. MAPK들은 대식세포에서 염증반응을 유발하도록 세포 밖 신호를 핵 내로 전달하게 하는 대표적인 염증신호전달분자로, LPS와 같은 자극원으로부터 인산화되어 염증전사인자인 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 촉진시킴으로써 대식세포 내 염증반응 개시를 유도하게 되고, 이러한 염증기전 가동에 의해 NO, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증물질들이 합성, 분비됨으로써 염증이 발달하게 된다^{36,37}. 본 연구에서 선학초의 30% 에탄올추출물은 LPS 자극으로부터 활성화된 대식세포에서

MAPK 분자들의 인산화 억제와 NF- κ B pathway 차단을 통해 NO 분비 및 iNOS, COX-2의 발현 억제 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등 염증성 사이토카인들의 전사단계 조절을 통해 염증반응을 제어할 수 있는 것으로 나타났다.

결론

본 연구에서는 RAW264.7 대식세포에서 선학초 30% 에탄올추출물의 염증억제효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 선학초추출물(0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)은 RAW264.7 세포에서 LPS-유도 nitric oxide의 생성을 억제하였다.
2. 선학초추출물(0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)은 RAW264.7 세포에서 LPS-유도 iNOS와 COX-2의 유전자 발현을 억제하였다.
3. 선학초추출물(0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)은 RAW264.7 세포에서 LPS-유도 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 유전자 발현을 억제하였다.
4. 선학초추출물(0.1, 0.2 mg/ml)은 RAW264.7 세포에서 LPS-유도 ERK1/2, p38, JNK MAPK의 인산화를 억제하였다.
5. 선학초추출물(0.1, 0.2 mg/ml)은 RAW264.7 세포에서 LPS-유도 NF- κ B의 핵에서의 발현 증가를 억제하였다.

따라서 선학초 30% 에탄올추출물은 대식세포 활성화에 따른 염증반응 억제 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 아토피피부염에서의 피부조직 염증 억제에 효과가 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 "양·한방 융합기반 기술개발사업"의 재정지원을 받아 수행된 연구입니다(HI15C0256).

References

1. Boguniewicz M, Leung DYM. Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2006 ; 117(Suppl) : 475-80.
2. Kapoor R, Menon C, Hoffstad O, Bilker W, Leclerc P, Margolis DJ. The prevalence of atopic dermatitis in children with physician-confirmed atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, 2008 ; 58 : 68-73.
3. Buske-Kirschbaum A, Gierens A, Hollig H, Hellhammer DH. Stress-induced immunomodulation is altered in patients with atopic dermatitis. *J Neuroimmunol*, 2002 ; 129 : 161-7.
4. Charman CR, Williams HC. The use of corticosteroid and corticosteroid phobia in atopic dermatitis. *Clin in Dermatol*, 2003 ; 21 : 193-200.
5. Hong CE. Pediatrics. Seoul : Daehan Publisher, 1994 : 1066-7.
6. Ha YT. A Study on Combination of Topical Jachobokhabbang (JBB) and Internal Hwangtogamibang (HTGMB) for the Treatment of Atopic Dermatitis. Daejeon Univ, 2009.
7. Park SN. Effect of Sopungsan in BALB/c Mouse Model of Atopic Dermatitis. Kyunghee Univ, 2004.
8. Cha KB, Kim YS, Seol IC. Literatual study on Atopic dermatitis. *J Orient Med Res Center Daejeon Univ*, 2005 ; 14(2) : 113-26.
9. The National College of Oriental Medicine Herbology Classroom, Herbology. Seoul : Youngrimsa, 2008 : 190-1, 427-8, 738.
10. Kang BS. Medical herbs. Seoul : Youngrimsa, 1992 : 384-86.
11. Lee Y, Kim M, Chung D. Effect of extract *Agrimonia pilosa* L. on biological activity in rats. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2002 ; 10(3) : 167-77.
12. Yoon JY, Lee SY, Lee JY. Anti-aging effects of solvent fraction from *Agrimonia pilosa* L. extracts. *J Appl Biol Chem*, 2012 ; 55(1) : 35-9.
13. Pei YH, Li X, Zhu TR. Studies on the structure of a new ellagic acid glycoside from the root sprouts of *Agrimonia pilosa*. *Yao Xue Xue Bae*, 1990 ; 25 : 798-800.
14. Kim HJ, Lim HW, Kim BH, Choi SW, Yoon CS. Studies on the Anti-acne Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 2006 ; 32(1) : 53-8.
15. Kang SC, Lee CM, Koo HJ, Ahn DH, Choi H, Lee JH, Bak JP, Lee MH, Choung ES, Kawk JH. Hepatoprotective effects of aqueous extract from aerial part of Agrimony. *Kor J Pharmacogn*, 2006 ; 37(1) : 28-32.
16. Hua CL, Lee JK, Cho KH, Kang DG, Kwon TO, Kwon JW, Kim JS, Sohn EJ, Lee HS. Mechanism for the vascular relaxation induced by butanol extract of *Agrimonia pilosa*. *Kor J Pharmacogn*, 2006 ; 37(2) : 67-73.
17. Min KJ, Song JW, Cha CG. The antioxidative and antitumor activity of extracts of *Agrimonia pilosa*. *J Fd Hyg Safety*, 2008 ; 23(2) : 149-56.
18. Choi SJ, Baik JW, Park JH, Jun CY, Choi YK, Ko SG. Mechanism of apoptosis & tumor growth inhibition of *Agrimonia pilosa* Ladebour (APL) in vitro and in vivo. *Korean J Orient Int Med*, 2009 ; 30(2) : 399-409.

19. Kim JJ, Jiang J, Shim SW, Kwon SC, Kim TJ, Ye SK, Kim MK, Shin YK, Koppula S, Kang TB, Choi DK. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb extract on murine cell lines and OVA-induced airway inflammation. *J Ethnopharmacol*. 2012 ; 140 : 213-21.
20. Hong JH, Jung HA. Clinical efficacy of external application containing *Betula platyphyllae* Cortex, *Vitidis Fructus*, *Agrimoniae Herba* in atopic dermatitis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2014 ; 27(1) : 1-16.
21. Kim YS, Choi YS. Neuroprotective Effects of *Agrimoniae Herba* against Intrastratial Hemorrhage in Rats. *Kor J Herbol*. 2010 ; 25(4) : 31-7.
22. Hoffman ES, Smith RE, Renaud BC Jr. From the analyst's couch: TLR-targeted therapeutics. *Nat rev drug discov*. 2005 ; 4(11) : 879-80.
23. Kim TY. Treatment of Atopic Dermatitis : an Update and Review of the Literature. *Pediatr Allergy Respir Dis(Korea)*. 2009 ; 19(3) : 209-19.
24. Lee EH, Lee SE, Lee SH. Current Trends of Diagnosis and Treatment of Atopic Dermatitis. *Korean Soc Skin Barrier Res*. 2010 ; 12(1) : 103-10.
25. Kang RY, Park BK, Gim SH, Choi HJ, Kim DH. The effects of HYT on various immunological factors related to pathogenesis of allergic dermatitis in NC/Nga mice induced by Biostir AD. *J Orient Med Res Center Daejeon Univ*. 2009 ; 18(2) : 47-62.
26. Kim MW. The cure effect of *Chengsimyenjatang* on atopic dermatitis by regulation of Th2 cell differentiation and anti-inflammatory mechanism. *Dongguk Univ*. 2006.
27. Kim HG. Inhibitory Effect of *Galgeunhaegi-Tang* on Compound48/80 stimulated Allergic Reaction. *Daegu Univ*. 2008.
28. Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun KJ, Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF- κ B inactivation in Raw 264,7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int Immunophar*. 2008 ; 8 : 431-41.
29. Baugh JA, Bucala R. Mechanisms for modulating TNF- α in immune and inflammatory disease. *Curr Opin drug discov devel*. 2001 ; 4(5) : 635-50.
30. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*. 1992 ; 258 : 1957-9.
31. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006 ; 8 : 1-3.
32. Chae SC, Jung HT. NO and the immune response. *Allergy Asthma Respiratory disease*. 2002 ; 22(3) : 514-28.
33. Kwon YH, Joo KB, Bae SC, Kim SY. Nitric oxide(NO) in inflammatory arthritis. *Hanyang Medical Reviews*. 1996 ; 16(2) : 227-41.
34. Yang Y, Kim SC, Yu T, Yi YS, Rhee MH, Sung GH, Yoo BC, Cho JY. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm*. 2014 ; 2014 : 352371.
35. Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Suppression of Inflammatory Responses by Black Rice Extract in RAW 264,7 Macrophage Cells via Downregulation of NF- κ B and AP-1 Signaling Pathways. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015 ; 16(10) : 4277-83.
36. Ivashkiv LB. Inflammatory signaling in macrophages: transitions from acute to tolerant and alternative activation states. *Eur J Immunol*. 2011; 41(9) : 2477-81.
37. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Jackson-Bernitsas D, Ahn KS, Sethi G, Ichikawa H. TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006 ; (56) : 161-86.