

玄兎丹의 RAW 264.7 대식 세포에서의 항염증 효과에 관한 연구

김마룡^{1#}, 강옥화^{1#}, 공룡¹, 서운수¹, 주전¹, 김상아¹, 김은수¹, 신민아¹, 이영섭², 권동렬^{1*}

1 : 원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소

2 : 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 인삼특작이용팀

The study of anti-inflammatory effect of *Hyeonto-dan* extract in RAW 264.7 macrophage

Ma-Ryong Kim^{1#}, Ok-Hua Kang^{1#}, Ryong Kong¹, Yun-Soo Seo¹, Tian Zhou¹, Sang-A Kim¹,
Eun-Su Kim¹, Min-A Sin¹, Young-Seob Lee², Dong-Yeul Kwon^{1*}

1 : Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute,
Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749

2 : Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, 92 Bisanro,
Eumsung, Chungbuk 369-873, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to investigate the unknown mechanisms behind the anti-inflammatory activity of *Hyeonto-dan*(HT) 70% ethanol extract on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Methods : Cells were treated with *Hyeonto-dan* 1 h prior to addition of 200 ng/mL of LPS. Cell viability was measured by the MTS assay. Nitric oxide levels were determined by the Griess assay. PGE₂ were measured using EIA kit. Pro-inflammatory cytokine production was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of COX-2, iNOS, and MAPKs was investigated by Western blot, qRT-PCR. NF-κB/p65 localization and interaction of the TLR-4 receptor with LPS was examined by immunofluorescence assays.

Results : *Hyeonto-dan* had no cytotoxicity at the measured concentration. *Hyeonto-dan* inhibited NO production and pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF-α, and PGE₂ as well as the protein and mRNA expression of iNOS and COX-2. Moreover, *Hyeonto-dan* inhibited the interaction between LPS and TLR-4 in murine macrophages. It suppressed phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-jun N-terminal kinase (JNK 1/2) and p38. Finally, it inhibited translocation of NF-κB in response to competitive LPS.

Conclusions : Based on the results of this study, *Hyeonto-dan* inhibited the binding of TLR-4 receptor to LPS and inhibited the phosphorylation of extracellular signaling pathway MAPKs. These inhibitory effects are thought that the amount of NF-κB delivered to the nucleus was decreased and the inflammatory reaction was prevented by decreasing the production of LPS-induced PGE₂, NO, IL-6 and TNF-α.

Key words : *Hyeonto-dan*, Anti-inflammatory effect, RAW 264.7 cells, TLR-4.

*Corresponding author : Professor Dong-Yeul Kwon, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Iksan-daero 460, Iksan, Jeonbuk 570-749, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr

#First author : Dr Ma-Ryong Kim, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Iksan-daero 460, Iksan, Jeonbuk 570-749, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : parvyolra@naver.com

#First author : Dr Ok-Hua Kang, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Iksan-daero 460, Iksan, Jeonbuk 570-749, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : kangokhwa@hanmail.net

· Received : 19 January 2017 · Revised : 2 March 2017 · Accepted : 15 March 2017

I. 서론

염증은 생체의 세포나 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상을 받으면 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증매개물질을 분비함으로써 몸을 보호해주는 보호기전이다^{1,2)}. 염증반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며, macrophage는 여러 자극이나 면역세포들이 분비하는 cytokines, hydrogen peroxide, viruses, antigen 등에 의해 활성화되어 proinflammatory cytokines, nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성함으로써 통증, 열, 부종 등의 염증 반응을 유발한다²⁾.

염증반응을 유발하는 cytokines, iNOS, COX-2의 발현은 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)에 의해 조절이 된다고 보고되고 있다³⁾. NF- κ B의 활성화는 inhibitor of κ B (I κ B)와의 결합에 의해 조절되는데 활성화되지 않은 상태에서는 cytosol에서 NF- κ B가 I κ B와 결합하여 불활성된 형태로 존재한다⁴⁾. 그러나 macrophage가 LPS와 같은 자극원에 의해 자극을 받게 되면, I κ B kinase (IKK)는 I κ B의 serine 32와 serine 36을 인산화 시키고, 인산화된 I κ B는 NF- κ B와 분리되어 proteasome에 의해 분해된다^{5,6)}. I κ B와 분리된 NF- κ B는 핵내로 이동하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β , COX-2, iNOS의 promoter region에 결합함으로써 다양한 cytokines의 분비를 조절한다⁷⁾. 특히, 만성염증 질환에서는 지속적으로 NF- κ B가 활성화되어 염증매개물질이 꾸준히 발현되는 것으로 나타나⁶⁾, NF- κ B의 활성을 억제함으로써 만성염증질환을 치유하고자 하는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다³⁾.

Toll-like receptors (TLRs)는 세포의 표면에 존재하는 병원체 감지 수용체로 인체에 침입한 병원체들을 가장 먼저 감지한다. TLRs는 하위 전염증성 활성들을 개시함으로써 초기 면역반응을 유도한다. 외래의 병원체와 TLRs간의 상호작용에 의해 촉발된 면역반응은 초기의 급성 염증반응의 매개자들을 작동시킨다. 현재까지 발견된 TLR family의 유전자들은 13 종류로 그중, TLR-4는 LPS와 결합하고 그 자극으로 인해 하위 염증반응이 나타나는 것으로 보고되어 있다⁸⁾. TLR-4에 의하여 유발되는 염증 발병 기전은 기존에 알려진 것들 이외에도 다양한 질환들에서 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. TLR-4 신호전달 체계의 차단은 상기와 같은 다양한 질환에 응용할 수 있으며, 다수의 생약이 이와 유사한 기전을 통하여 항염증 효과를 보이고 임상적 적용이 가능하다는 보고가 있다.

玄兎丹은 1345년 저술된 『世醫得效方 卷第七 痢瀉』에 수록된 처방으로 禁精하는 효능을 가지고 있으며, 三消瀉病을 치료한다고 되어있다. 또한 禁遺精하는 처방으로 『東醫寶鑑 雜病篇 卷六 消瀉』에 수록되어있다. 구성 약재는 같으나 배합 비율에서 약간의 차이가 있으며 『世醫得效方』에 수록된 玄兎丹은 茯苓, 山藥, 蓮子肉, 五味子, 菟絲子를 각각 3:6:3:7:10의 비율로 사용하도록 되어있으며 『東醫寶鑑』에서는 3:3:3:7:10의

비율로 사용하도록 되어있다^{10,11)}. 본 연구에서는 동의보감의 비율에 따라 시료를 조제하여 실험에 사용하였다.

玄兎丹에 대한 연구 논문이 거의 없기에 저자는 LPS로 유발시킨 RAW 264.7 cell 염증 모델에서 현토단의 항염증 효과를 구명하고자 실험을 진행하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재 및 추출

건조된 약재를 table 1.의 구성에 따라 혼합한 후 분쇄하여 약재 총량의 5배의 70% EtOH로 2회 환류 추출하였으며, 감압 농축 및 동결 건조하여 추출물 3,538 g (수득율 13.61%)을 얻었다. 현토단에 들어가는 약재인 菟絲子, 五味子, 茯苓, 山藥, 蓮子肉은 ***에서 구입하였다(Table 1).

Table 1. The composite of *Hyeonto-dan*

Herb name	Botanical name	Weight (g)	Country of origin
菟絲子	Cuscutae Semen	10	China
五味子	Schisandra Fruit	7	Korea
茯苓	Poria Cocos	3	Korea
山藥	Dioscorea Rhizome	3	Korea
蓮子肉	Nelumbo Seed	3	Vietnam

2) 시약

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 과 Bovine serum albumin과 streptomycin, penicillin은 Hyclone에서 구입하였다 (Logan, UT, USA). LPS, MTS, 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Sigma에서 구입하였다 (St. Louis, MO, USA). iNOS와 TLR4, COX-2, β -actin, peroxidase-conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였다 (Santa Cruz, CA, USA). anti-mouse TNF- α antibody와 biotinylated anti-mouse TNF- α antibodies, Anti-mouse IL-6 antibody biotinylated anti-mouse IL-6 antibodies는 BD Biosciences에서 구입하였다 (San Jose, CA, USA). 추가적으로, QuantiTect Reverse Transcription kit와 RNeasy Mini kit는 Qiagen에서 구입하였다 (Hilden, Germany). 마지막으로, fluorochrome-conjugated LPS와 fluorochrome-conjugated secondary antibodies는 Life Technologies Corp.에서 구입하였다 (Seoul, Republic of Korea).

3) Primer 준비

qRT-PCR을 위해 사용한 primer의 구성은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Primer sequences for qRT-PCR

cDNA	Primer sequence
iNOS forward	5'-GCAGAGATTGGAGGCTTGTG-3'
reverse	5'-GGGTTGTGTGCTGAACCTCCAGTC-3'
COX-2 forward	5'-GCCAGGCTGAACCTCGAAACA-3'
reverse	5'-GCTCAGGAGCCACTGATACCTA-3'
IL-6 forward	5'-TCTATACCACTTCACAAGTCGGA-3'
reverse	5'-GAATTGCCATTCACAACCTCTTT-3'
TNF- α forward	5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATC-3'
reverse	5'-CAGATGACCTAGTAACGGACT-3'
TLR4 forward	5'-AATCCCTGCATAGAGGTAAGTCTAAT-3'
reverse	5'-CTCAGATCTAGGTTCTTGGTTGAATAAG-3'
β -actin forward	5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'
reverse	5'-ATGAGCCACCGATCCACA-3'

2. 방법

1) 세포 배양

설치류 대식 세포주는 한국세포주 은행으로부터 분양받았다. RAW 264.7세포는 100 U/ml의 페니실린과 100 mg/ml의 스트렙토마이신을 첨가하고 10% FBS를 첨가한 RPMI 1640 배지에서 37°C의 온도, 5% CO₂의 습한 대기 조건으로 배양하였다.

2) 세포 생존율 측정

RAW 263.7 세포 생존율은 MTS 분석법으로 측정하였다. RAW 263.7 세포 (5×10^5 cells/ml)를 96 well plate에 100 μ l의 RPMI 1640배지에서 18시간 배양한 다음, 현토단을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 각 실험군에 5 mg/ml 농도의 MTS를 50 μ l 씩 넣은 후 2시간 동안 배양한 후 fomazon 생성량을 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 독성은 세포만을 배양한 비 처리군을 생존률 100%로 하여 약물처리군의 상대적인 세포 생존율을 이용해 계산하였다.

3) NO 생성량 측정

현토단을 여러 농도로 처리하고 여기에 200 ng/ml의 LPS를 각각 주입한 후 대식 세포주를 24시간 배양하였다. Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)와 수집한 배양한 상층액을 동량으로 혼합한 후 10분간 실온에서 방치하였다. Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 아질산의 농도는 결정하였다. 세포가 없는 배양액에 아질산 0-30 μ m을 넣어 측정하였으며, 이 값을 표준으로 하여 여러 실험군의 아질산 값의 흡광도를 측정하였다.

4) PGE₂생성량 측정

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO₂항온기에서 18시간 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고

현토단을 각각 다양한 농도로 처리한 후, LPS (200 ng \cdot ml⁻¹)로 대식 세포주를 자극하였다. 세포 부유액을 원심 분리하여 세포들을 제거한 상층액을 수집하고 상층액에 함유된 PGE₂ 생성량을 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 EIA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량해 분석하였다.

5) Cytokine 생성량 측정

전처리가 끝난 RAW 264.7 세포의 부유액을 원심분리한 후 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하였으며, 상층액에 포함된 IL-6와 TNF- α 의 생성량을 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량해 분석하였다.

6) Western blot analysis

RAW 263.7 세포에 현토단을 농도별로 처리하여 30분간 배양한 후 LPS (200 ng \cdot ml⁻¹)를 처리하였다. MAPK는 LPS 자극 1시간 후에 인산화 정도를 확인하였으며 COX-2와 INOS는 자극 후 24시간 후에 발현량을 확인하였다.

7) RNA 분리 및 quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR)

전 처리된 세포를 모아 PBS로 세척 후 이지 블루(easy blue, 인트론사) 1 ml를 가하여 교반하였다. 클로로포름 200 μ l를 넣고 교반하여 13,000rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액 400 μ l에 이소프로판올을 동량을 가하여 원심분리하여 RNA를 얻었다. 여기서 얻어진 RNA에 역전사효소(reverse transcriptase), 1 mM dNTP 0.5 μ g을 섞어 cDNA를 만들었다. qRT-PCR는 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 power SYBR® Green PCR master mix를 이용하여 진행하였다. 결과물은 StepOnePlus Real-Time RT-PCR System과 StepOne software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 β -actin mRNA의 발현량을 기준으로 상대적 발현 값을 정량하였다.

8) 면역형광염색법 (Immunofluorescence staining)

RAW 264.7는 chambered cover glasses (Nunc)에서 18 시간 동안 배양한 후, 현토단과 LPS를 처리하였다. 세포는 4% formaldehyde를 사용하여 실온에서 15분 동안 고정하였으며, 100% MeOH을 10분 동안 -20°C에서 처리하여 투과성을 높였다. 표본은 blocking buffer (PBS with 5% serum and 0.3% Triton X-100)를 사용하여 1시간 동안 blocking 하였으며 4°C에서 1차 항체를 하룻밤 동안 처리하였다. 형광 물질이 축합된 2차 항체는 실온, 암소 조건에서 1시간 처리하였다. PBS로 세척 후, 세포핵을 DAPI를 이용하여 대비 염색 하였다. 표본의 형광정도는 형광 현미경을 사용하여 관찰하였다(Carl Ziess, Oberkochen, Germany). 세포막에 결합된 LPS는 AlexaFluor 488와 축합된 LPS를 사용하여 관찰하였다.

9) 통계분석

통계분석은 Scheffe's test법을 따라 ANOVA를 실행하였다.

모든 실험은 3회 이상 반복적으로 이루어졌으며, 실험결과에는 각 항목에 따라 SPSS statistics 22 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 평균치 ± 표준편차 (SD)를 구하여 신뢰 수준 $P < 0.05$ 에서 통계적 유의성을 평가하였다.

III. 결 과

1. 세포생존율에 대한 현토단의 효과

현토단의 대식 세포의 생존율에 대한 영향을 확인하기 위해 MTS 시험법을 시행하였다. 세포는 다양한 농도로 24시간 동안 처리하였다. 실험 결과 현토단 500 $\mu\text{g/ml}$ 내에서 RAW 264.7 세포에 대해 독성이 나타나지 않았으며, 이후의 항염증 활성 실험을 진행하였다(Figure 1.).

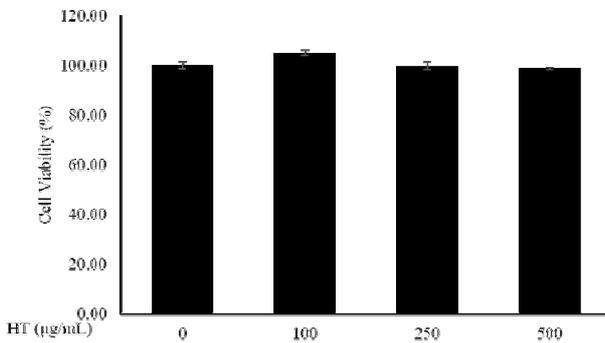


Figure 1. Effects of *Hyeonto-dan* on RAW 264.7 cells viability. Cell viability was evaluated with the MTS assay. Data are means \pm standard deviations of duplicate determinations from three separate experiments.

2. LPS로 유도된 NO 생성에 대한 현토단의 효과

NO의 생성에 현토단이 미치는 영향을 알아보기 위해 배지로 분비된 질산염의 농도를 Griess시약을 사용하여 측정하였다. LPS 비처리군에 비하여 LPS 처리 시 NO의 생성이 급격히 증가하였다. 현토단을 LPS와 함께 처리한 경우 농도 의존적으로 감소가 일어남을 확인하였다(Figure 2).

3. LPS로 유도된 PGE₂ 생성에 대한 현토단의 효과

PGE₂의 생성에 현토단이 미치는 영향을 알아보기 위해 EIA kit를 이용하여 정량해 분석하였다. LPS 비처리군에 비하여 LPS 처리 시 PGE₂의 생성이 급격히 증가하였다. 현토단을 전 처리한 경우 생성량이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3).

4. LPS로 유도된 IL-6와 TNF- α 의 생성 및 mRNA 발현에 대한 현토단의 억제 효과

LPS로 자극된 대식세포에서 cytokines인 IL-6와 TNF- α 의 합성에 대한 현토단의 효과를 알아보았다. 그 결과, LPS 처리 시 IL-6와 TNF- α 의 분비량이 유의적으로 상승함을 확인 할 수 있었다. 하지만 다양한 농도의 현토단을 동시에 처리한 경우 생성량이 줄어들었다 (Fig. 4A). TNF- α 의 생성량

역시 현토단 처리 시 농도 의존적으로 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4C). 더욱이 qRT-PCR의 결과를 보면 cytokines의 mRNA수준에서의 발현량 역시 LPS 단독 처리군과 비교하여 줄어드는 것이 확인 되었다 (Figure 4B, D).

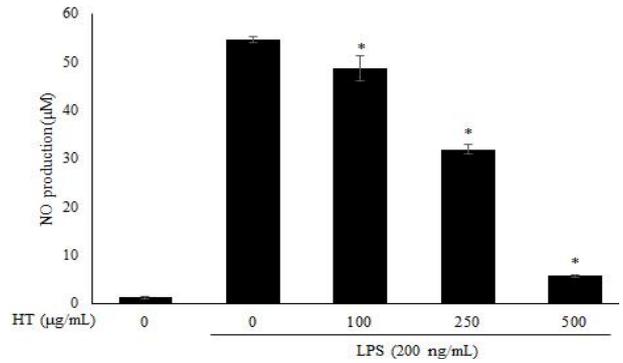


Figure 2. Effects of *Hyeonto-dan* on NO production in RAW 264.7 cells. The cells were treated with *Hyeonto-dan* at the indicated concentration for 30 min and then stimulated with 200 ng/ml LPS for 24 h. NO release was measured by the Griess assay. The culture supernatant was isolated and analyzed. * $P < 0.05$ compared to the LPS-treated group. Significant differences between treated groups were determined using analysis of variance followed by Scheffe's test for multiple comparisons. Values are means \pm standard deviations of duplicate determinations from three separate experiments.

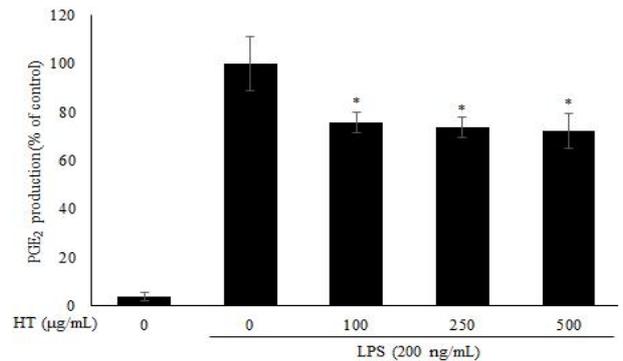


Figure 3. Effects of *Hyeonto-dan* on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. These were determined according to the manufacturer's protocol. * $P < 0.05$ compared to the LPS-treated group. Significant differences between treated groups were determined using analysis of variance followed by Scheffe's test for multiple comparisons. Values are means \pm standard deviations of duplicate determinations from three separate experiments.

5. LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 대한 현토단의 억제 효과

iNOS와 COX-2의 발현을 단백질과 mRNA수준에서 현토단의 영향을 알아보았다. 단백질과 mRNA수준에서 iNOS와 COX-2의 발현정도를 Western blot법과 qRT-PCR법을 활용하여 정량하였다. iNOS와 COX-2는 비 처리군에서 단백질과 mRNA수준에서 측정되지 않았으며, LPS 처리 시 유의적으로 상승하였다. 현토단은 최고농도에서 LPS 단독 처리군에 비해 COX-2의 발현을 단백질 수준 (Figure 5A, B)과 mRNA수준 (Figure 5C)에서 억제하였으며, iNOS 역시 단백질 수준 (Figure 5A, B)과 mRNA수준 (Figure 5C)에서 억제하였다.

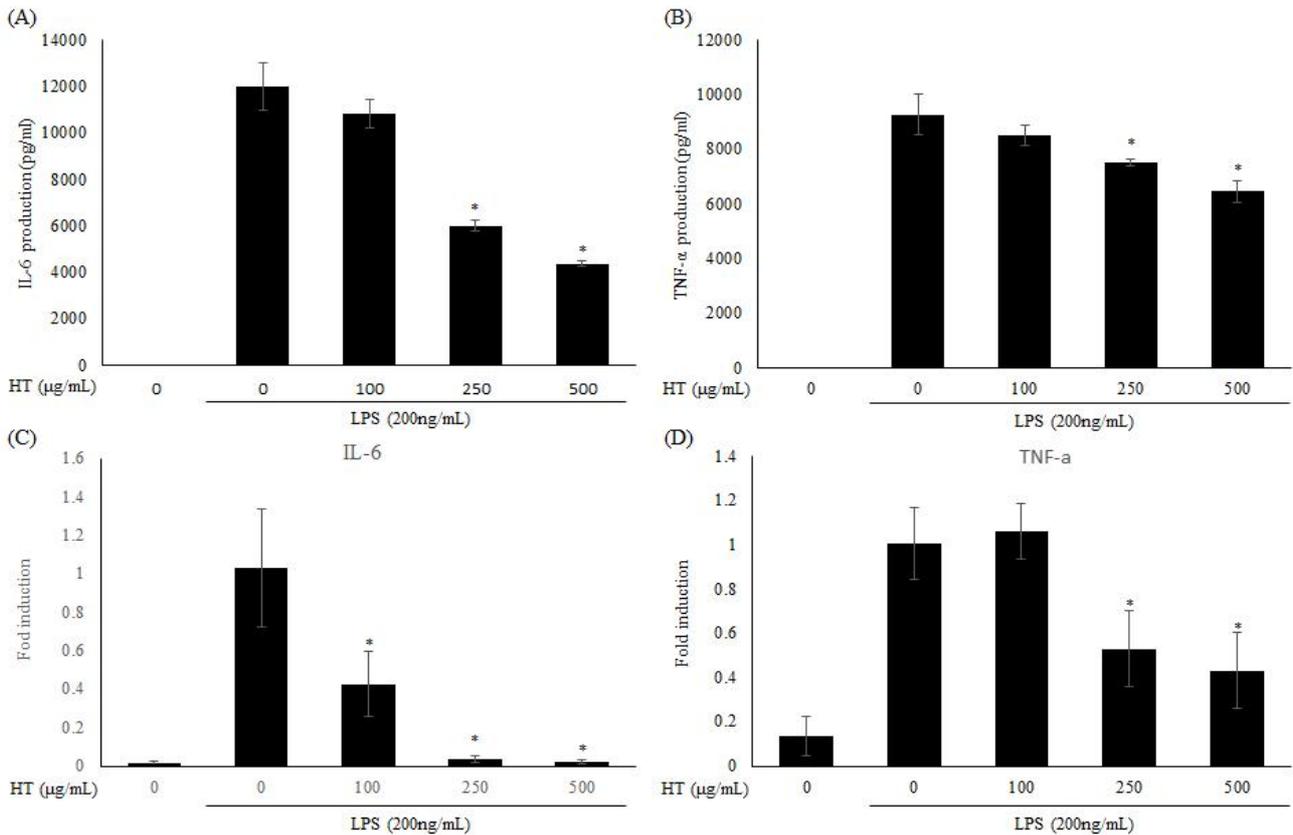


Figure 4. Effects of *Hyeonto-dan* on LPS-induced IL-6, TNF- α production (A, B) and mRNA expression (C, D) in RAW 264.7 cells, RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of *Hyeonto-dan* for 30 min before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 h. The culture supernatant was isolated and analyzed to measure IL-6 production, * $P < 0.005$ compared to the LPS-treated group. Significant differences between treated groups were determined using Scheffe's test. Values are means \pm standard errors of duplicate determinations from three separate experiments.

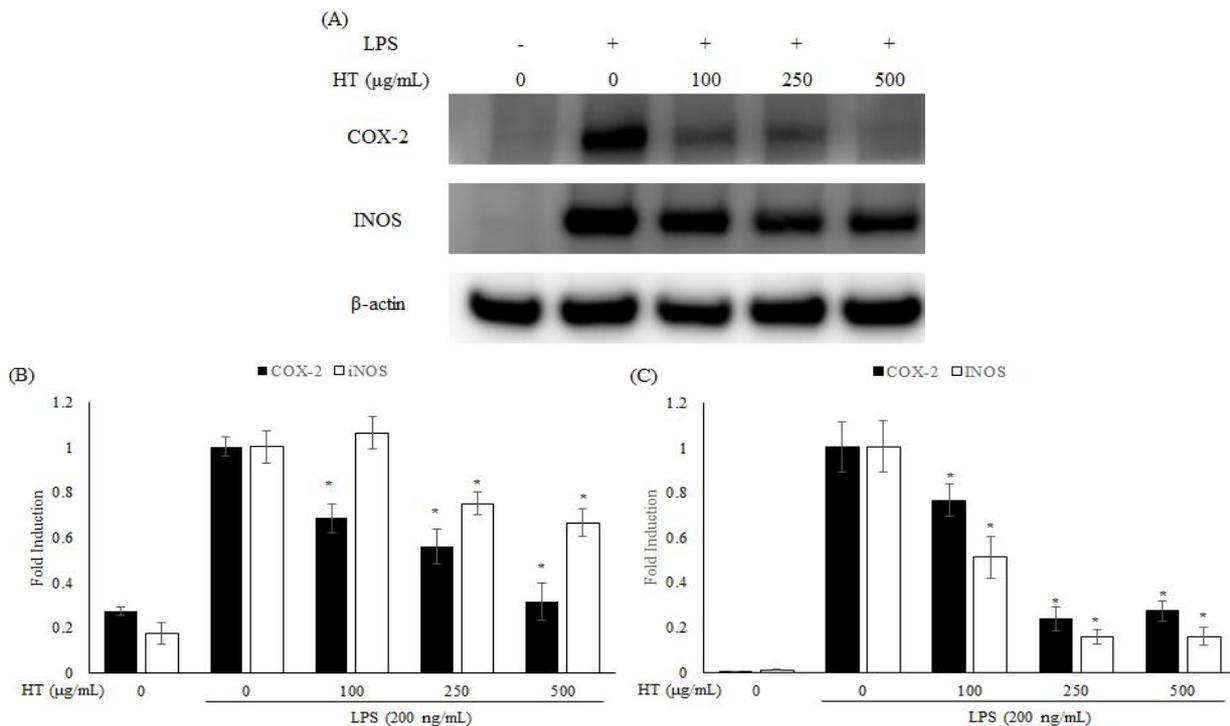


Figure 5. Effects of *Hyeonto-dan* on protein (A,B) and mRNA (C) expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with *Hyeonto-dan* for 30 min, and then incubated with LPS (200 ng/mL) for the indicated time. Representative Western blots of at least three separate experiments are shown, * $P < 0.005$ compared to the LPS-treated group. Significant differences between the treated groups were determined using analysis of variance followed by Scheffe's test for multiple comparisons. Values are means \pm standard deviations of duplicate determinations from three separate experiments.

6. MAPKs의 인산화에 대한 현토단의 효과

MAPKs는 세포의 성장과 분화 및 사이토카인과 스트레스 제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 현토단의 억제 메커니즘이 MAPKs 경유하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 LPS에 의해 활성화 된 RAW 264.7 대식세포에 HT를 처리한 경우 JNK와 ERK, p38의 인산화를 억제하는 것을 확인하였다 (Figure 6).

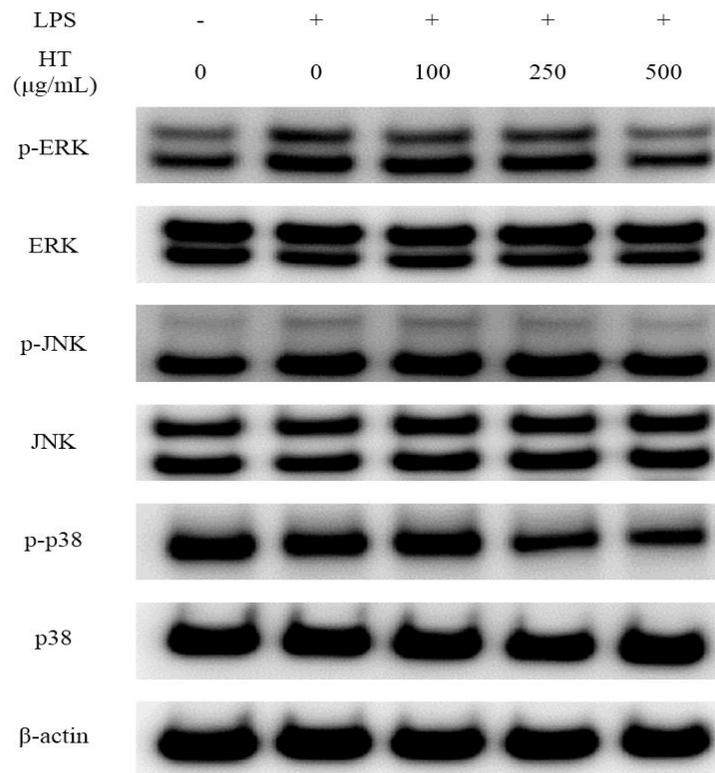


Figure 6. Effects of *Hyeonto-dan* on phosphorylation of MAPK family in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with *Hyeonto-dan* for 30 min, and then incubated with LPS (200 ng/mL) for 1 h. Representative Western blots of at least three separate experiments are shown.

7. NF- κ B의 핵 내로의 이동에 대한 현토단의 효과

기존의 연구에서 iNOS, COX-2, cytokines과 같은 염증성 인자의 조절에 NF- κ B가 연관성이 보고되었다. LPS 비 처리군에 비해 LPS 처리군에서 NF- κ B의 핵 내로의 이동이 증가되었다. 현토단을 LPS와 같이 처리한 군의 경우 NF- κ B의 이동이 현저하게 감소되었다(Figure 7). 따라서 현토단의 염증 억제 활성화에 있어서 NF- κ B의 이동을 막는 것이 주요 기전 중 하나로 보여진다.

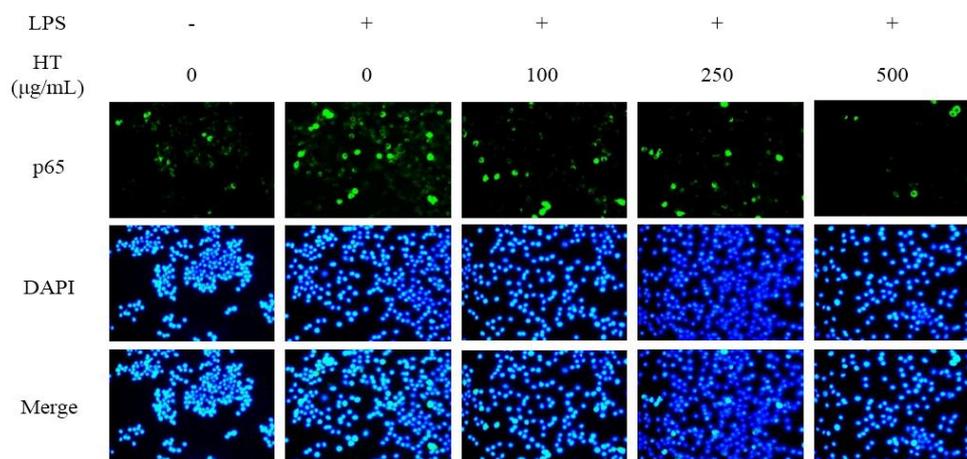


Figure 7. Effects of *Hyeonto-dan* on NF- κ B nuclear translocation. Cells were pretreated with *Hyeonto-dan* for 30 min and then incubated with LPS (200 ng/mL) for 1 h. Localization of NF κ B/p-65 was visualized with a fluorescence microscope after immunofluorescence staining. Nuclei were counterstained with DAPI. Similar results were obtained in three independent experiments, and results of one representative experiment are shown.

8. TLR-4 발현에 대한 현토단의 효과

LPS에 의해 유도되는 TLR-4 기전에 대한 현토단의 효과를 면역형광염색법과 qRT-PCR법을 통해 측정하였다. 수용체의 발현량은 24시간 동안 LPS로 자극한 후 확인하였으며, LPS 비처리군에 비해 증가하였다. 현토단과 LPS를 함께 처리한 군에서는 TLR-4의 발현이 mRNA 수준에서 유의적으로 감소되었다 (Figure 8A). 또한 형광 시약이 부착된 LPS를 처리하였을 때 세포 표면에 결합된 LPS의 양이 현토단 처리 시 감소하였다 (Figure 8B). 이러한 결과로 보아 현토단은 TLR-4 발현을 감소시키며 LPS와 경쟁적으로 작용하여 LPS가 세포 표면에 결합되는 것을 방해하는 것으로 생각된다.

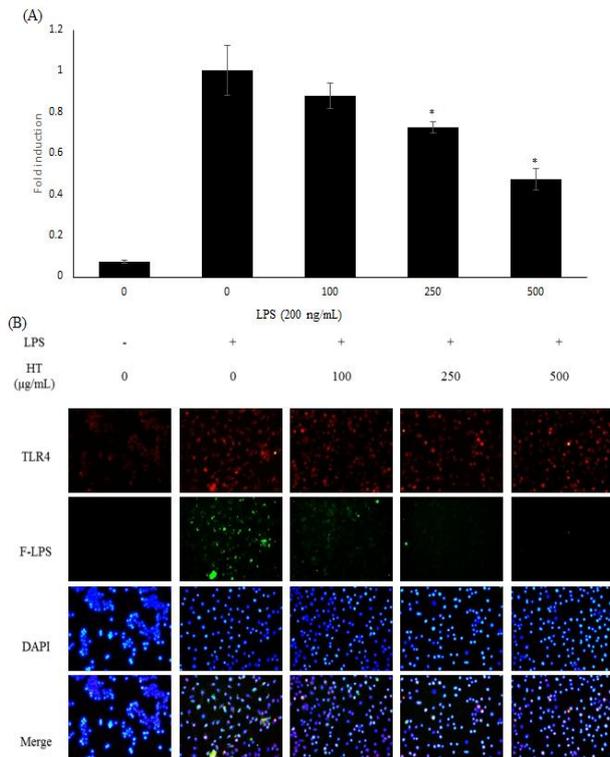


Figure 8. Effects of *Hyeonto-dan* on TLR-4 expression and the interaction between LPS and TLR-4. Panel (A) indicates expression of TLR-4 in mRNA levels. Cells used in the qRT-PCR were pretreated with *Hyeonto-dan* for 30 min and then incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 h. (B) Expression of TLR-4 on membrane of RAW 264.7 cells and interactions between LPS and TLR-4 were visualized with a fluorescence microscope after immunofluorescence staining. Cells for immunofluorescence were pretreated with *Hyeonto-dan* for 30 min and then incubated with fluorescence conjugated-LPS (200ng/mL) for 24 h. Similar results were obtained in three independent experiments, and the results of one representative experiment are shown. * $P < 0.005$ compared to the LPS-treated group. Significant differences between the treated groups were determined using analysis of variance followed by Scheffe's test for multiple comparisons. Values are means \pm standard deviations of duplicate determinations from three separate experiments.

IV. 고찰

현토단의 잠재적인 항염증 효과와 염증 반응 억제 기전을 LPS로 유도한 염증 모델에서 확인하였다. 활성 산소종의 일

종인 NO는 혈관과 근육조직의 이완 조절에 관여하는 면역계 방어물질로서 인체 생리에 중요한 역할을 한다. 그리고 생리적인 효과뿐만 아니라 감염이나 조직 손상으로 인한 염증반응을 매개하는 인자로서 병리과정에도 작용한다¹²⁾. NO는 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 형성되며, 그 과정에서 nitric oxide synthase (NOS)라는 효소가 작용하게 된다. 활성화된 대식세포에서 iNOS의 발현에 의해 과도하게 생성된 NO는 세포독성이나 조직손상 등 염증반응을 촉진할 뿐만 아니라 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등과 같은 전염증성 cytokine 및 COX-2와 같은 염증 매개물질들의 생합성을 촉진하여 과도한 면역반응으로 인한 다양한 질병을 초래하게 한다¹³⁾. COX-2는 정상적인 상태에서 발현하지 않고, 주로 염증반응에 관여하는 PGE₂를 생성하여 발열, 혈관 확장을 유발하는 대표적인 염증 지표물질이다¹⁴⁾. 그러므로 NO와 PGE₂는 염증반응 동안 iNOS와 COX-2의 하위 반응기로서 작용한다. 대식세포에 LPS 자극을 주면 NO와 PGE₂의 생산을 증가한다. 하지만 LPS와 현토단을 함께 처리 하였을 때 NO와 PGE₂의 생성량이 감소하였다(Figure 2,3). 추가적으로 iNOS와 COX-2의 발현 역시 단백질수준과 mRNA수준 모두에서 감소하였다 (Figure 5). 이러한 결과로 보아 현토단의 NO, PGE₂ 억제효과는 iNOS와 COX-2발현 억제를 통한 작용으로 생각된다.

대식세포는 감염이나 조직의 손상으로 인한 염증 반응 동안 NO나 PGs와 같은 다른 염증성 인자와 마찬가지로 IL-6와 TNF- α 를 분비하며, 이는 다른 면역세포로부터 추가적인 반응을 유도한다¹⁵⁾. LPS로 처리된 RAW 264.7세포에서 IL-6와 TNF- α 의 분비가 증가된다(Figure 4). 하지만, 현토단을 전처리하면 IL-6와 TNF- α 의 생산량과 mRNA 발현량이 감소한다. 이를 통해 현토단의 항염증 작용은 전염증성 매개자의 발현을 억제함으로써 나타남을 알 수 있다.

MAPKs는 세포의 자극에 의해 반응하여 전사인자, 세포골격 단백질, 효소 등을 포함한 다수의 단백질들의 인산화를 통해 세포질 내에서 핵으로 정보를 전달하는데 중요한 역할을 하며, 세포 성장과 분화 및 생존에 관여한다¹⁶⁾. 이러한 MAPKs에는 extracellular signal regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 kinase (p38)의 3가지 신호 전달경로가 존재하는데, 이들은 물리적, 화학적인 자극에 의해 활성화되고 inhibitory kappa B kinase kinase (IKK)의 활성을 매개함으로써 NF- κ B를 핵으로 전위시켜 염증성 cytokine 및 iNOS, COX-2의 발현을 촉진한다¹⁷⁾. 현토단은 MAPK 신호 전달 경로를 차단함으로써 NF- κ B 활성화의 억제하는 것으로 나타났다(Figure 6).

염증반응을 유발하는 cytokines, iNOS, COX-2의 발현은 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)에 의해 조절이 된다고 보고되고 있다³⁾. LPS에 의해 세포가 자극되면 I κ B가 인산화되며 NF- κ B가 유리되고 유리된 NF- κ B는 세포의 핵내로 이동한다. NF- κ B활성의 주요 과정은 p65의 핵내로의 이동하면서 나타나는 p65의 전사촉진 활성이라고 보고되었다¹⁸⁾. 염증매개자에 대한 억제 작용은 NF- κ B 유리를 억제하는 것으로 나타났다(Figure 7).

Toll-like receptor는 선천성 면역계를 담당하는 세포에서 주로 발현되어 있는 transmembrane signaling molecule로⁹⁾ 현재까지 발견된 TLR family의 유전자들은 13종류로 일반적

으로 extracellular domain을 통하여 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)나 micro-organsim-associated molecular patterns (MAMPs)를 인식하여 선천성 면역 반응을 일으키고 염증세포의 활성화를 유발한다¹⁹⁾. LPS는 LPS-결합 단백질(lipopolysaccharide binding protein, LBP)과 결합하고 결합체는 대식세포나 가지세포의 CD40과 결합함으로써 Toll-like receptor (TLR)-4의 수용체를 활성화시킨다⁹⁾.

LPS로 자극된 TLR-4는 TLR-4-NF- κ B기전을 통해 NO, TNF- α , IL-6의 발현 증가를 촉발시키고 매개자들의 자가 피해를 유발한다²⁰⁾. 따라서 이번 연구에서는 RAW 264.7 세포주에서 현토단과 LPS의 TLR-4에 대한 상호작용을 연구하였다. 현토단을 처리하였을 때 세포표면에 부착된 LPS의 양이 특이적으로 감소하였으며 (Figure 8), 이를 통해 현토단이 TLR-4의 결합에 간섭함을 알 수 있다. 추가적으로 현토단은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포주에서 TLR-4의 발현을 억제하였다. 그러므로 현토단의 항염증작용에 있어서 TLR-4에 대한 경쟁적인 작용이 주요 기전으로 생각된다.

이번 연구에서 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포주에서 염증반응에 의해 NO, PGE₂, IL-6, TNF- α 와 같은 염증매개체의 발현이 증가되었다. 또한 NF- κ B의 핵 내로의 이동과 TLR-4의 분비 역시 LPS자극 이후 증가되었다. 과거의 연구들에서 TLR4-NF κ B 기전은 LPS자극에 의한 염증반응의 주요기전으로 보고되어있다. 실험 결과 현토단은 자극된 RAW 264.7세포에서 LPS와 TLR-4의 결합을 억제하였다. 또한 LPS자극에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하고 NF- κ B 기전을 조절함으로써 염증 반응을 약화시켰다. 현토단의 하위 염증성 매개자(iNOS, COX-2)와 인자들(NO, PGE₂, IL-6, TNF- α)에 대한 억제작용이 위의 기전을 통해 나타나는 것으로 추측된다. 따라서 현토단이 염증성 질환의 예방 및 치료에 유효할 것으로 생각된다.

V. 결 론

현토단의 염증반응 억제 효과를 알아보기 위해 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 NO, PGE₂의 생성, iNOS, COX-2의 발현, 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 의 분비, 신호전달 기전을 알아보기 위해 세포내 신호전달 단백질인 MAPK의 활성 및 TLR-4 활성화 정도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 현토단은 LPS로 유도된 대식세포에서 NO와 PGE₂ 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
2. 현토단은 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 단백질 수준과 mRNA수준 모두 억제하였다.
3. 현토단은 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 IL-6와 TNF- α 발현을 현저하게 억제하였다.
4. 현토단은 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 JNK와

ERK, p38의 인산화를 억제하였다.

5. 현토단은 LPS로 유도된 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 억제 하였으며 상위 기전인 TLR4와 LPS의 결합을 현저하게 억제하였다.

이러한 결과로 미루어 보아 현토단은 대식세포에 작용하여 LPS와 경쟁적으로 작용함으로써 TLR4-NF- κ B 기전을 저해하여 MAPKs의 인산화 활성을 떨어뜨려 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하고 NO와 PGE₂, IL-6, TNF- α 의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단의 이공분야기초연구사업(NRF-2016R1D1A1B03934552)과 2017년도 정부[미래창조과학부]의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2017-0062484)의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim Yang-Ho, Pathology, Korean Society of Pathologists : Gomunsa, 1991 : 71-92.
2. Laroux FS, Mechanisms of inflammation : the good, the bad and the ugly, *Frontiers in Bioscience*, 2004, 9 : 3156-62.
3. Barnes P.J. and M. Karin, Nuclear factor- κ B : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, *New England Journal of Medicine*, 1997 ; 336(15) : 1066-71.
4. Lee J.I. and G.J. Burckart, Nuclear factor kappa B : important transcription factor and therapeutic target, *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1998 ; 38(11) : 981.
5. Grover A, Shandilya A, Punetha A, Bisaria VS, Sundar D, Inhibition of the NEMO/IKK β association complex formation, a novel mechanism associated with the NF- κ B activation suppression by *Withania somnifera*'s key metabolite withaferin A, *BMC Genomics*, 2010 ; 11(4) : 25.
6. Tak P.P. and G.S. Firestein, NF- κ B : a key role in inflammatory diseases, *Journal of Clinical Investigation*, 2001 ; 107(1) : 7-12.
7. Sun SC, Chang JH, Jin J, Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity, *Trends Immunol*, 2013 ; 34(6) : 282-9.
8. Kim Seung-Hyun, Kong Gu, Role of Immune-Inflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease and Other Degenerative Diseases, *Journal of the Korean Neurological Association*, 2002 ; 20(6) : 575-84 .

9. Leon CG, Tory R, Jia J, Sivak O, Wasan KM. Discovery and Development of Toll-Like Receptor-4 (TLR4) Antagonists. A New Paradigm for Treating Sepsis and Other Diseases : Pharmaceutical Research, 2008 ; 25(8) :1751-61.
10. Ui Yeok-lim. Seuideukhyobang. Uiseongdang. 1990 : 220.
11. Heo Joon. Donguibogam 3rd ed, Yeogang Publishing Co. 2005 : 2010.
12. Oky Maeng, Yong Chan Kim, Young Sang Kim, Sang-Gi Paik, Hayyoung Lee. Identification of a gene that is up-regulated in RAW264,7 macrophage cells by nitric oxide. Bulletin of Biotechnology Chungnam National University. 2002 ; 8(2) : 1-9.
13. Mu MM, Chakravortty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264,7 macrophage cells : J. Endotoxin Res. 2001 ; 7(6) : 431-8.
14. Dubois R,N et al. Cyclooxygenase in biology and disease. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 1998 ; 12(12) : 1063.
15. Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells : a role for NO in macrophage function and fate. Toxicology. 2005 ; 208(2) : 249-58.
16. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. J Cell Sci. 2005 ; 118 : 3569-72.
17. Gray Pearson, Fred Robinson, Tara Beers Gibson, Bing-e Xu, Mahesh Karandikar, Kevin Berman, and Melanie H. Cobb. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways : Regulation and Physiological Functions. Endocrine reviews. 2001 ; 22(2) : 153-83.
18. Guo AK, Hou YY, Hirata H, Yamauchi S, Yip AK, Chiam KH et al. Loss of p53 enhances NF-B-dependent lamellipodia formation. J Cell Physiol. 2014 ; 229(6) : 696-704.
19. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol. 2006 ; 117(5) : 979-87.
20. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. Nat Rev Microbiol. 2005 ; 3(1) : 36-46.