

## 담쟁이덩굴 추출물의 항염증 활성 연구

신경순<sup>#</sup>, 유지현, 길기정<sup>\*</sup>

중부대학교 한방보건의약학전공

### Anti-inflammatory effects of *Parthenocissus tricuspidata* extracts

Kyung-Soon Shin<sup>#</sup>, Ji-Hyun Yoo, Ki-Jung Kil<sup>\*</sup>

Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : While inducing inflammatory response due to LPS it will investigate mechanism associated with anti-inflammatory effects from macrophages and provide basic data for the possible use as anti-inflammatory materials.

**Methods** : We investigated cell viability, NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 by ELISA and expressions of iNOS, COX-2, MAPKs and NF- $\kappa$ B were measured in RAW 264,7 cells induced by LPS.

**Results** : The cell viability of *Parthenocissus tricuspidata* extracts(PTE) identified in macrophages showed that cell viability rate was more than 99% at the concentration of 8, 40, and 200  $\mu$ g/mL, NO generated amounts revealed that it relied on concentration and was significantly reduced compared to the control. The expression of iNOS was restrained by the control at the concentration of 200 and 400  $\mu$ g/mL. In addition, the expression of COX-2 was found to be significantly reduced to the untreated control at the concentration of 400  $\mu$ g/mL. TNF- $\alpha$  relied on concentration and showed a significant decreased compared to the control. In contrast, IL-6 relied on concentration, reduced compared to the control. Phosphorylation of ERK, JNK, and p38 mediated by LPS were restrained by relying on concentration. Phosphorylation and decomposition of I $\kappa$ B $\alpha$  as well as p65 nuclear transmission of NF- $\kappa$ B subunit were restrained.

**Conclusions** : By restraining the activation of NF- $\kappa$ B, anti-inflammatory effects were revealed by reducing phosphorylative activation of MAPKs, restraining the expression of iNOS and COX-2 and restraining the creation of NO, IL-6, and TNF- $\alpha$ . Therefore, it can be assumed that they can be used as a variety of anti-inflammatory materials.

**Key words** : *Parthenocissus tricuspidata*, Anti-inflammatory, NF- $\kappa$ B, Macrophage cell, LPS

## I. 서 론

담쟁이덩굴(*Parthenocissus tricuspidata*(Sieb. et Zuce.) Planch)은 포도과(Vitaceae)에 속한 낙엽 등본 식물로 덩굴손은 잎과 대생하고 끝이 분지하며 등근형태의 흡착근이 생겨 잘 떨어지지 않으며, 가지가 많이 갈라진다<sup>1, 2)</sup>. 또한 줄기마다 다른 물체에 달라붙는 흡착근이 있어서 주로 담쟁이나 나

무, 바위 등을 타고 올라가며 자생하지만, 약으로 쓸 때는 반드시 나무를 감고 올라간 담쟁이덩굴을 사용하여야 하며, 바위를 타고 올라간 것을 쓰면 독이 있으므로 주의해야 한다<sup>3, 4)</sup>. 한약명은 地錦, 洛石, 爬山虎, 石薜荔, 地錦常春藤 등으로 불려지고 있으며<sup>5)</sup>, 우리나라를 비롯하여 일본, 중국 및 타이완 등 동아시아와 북미 동부지역에 자생하며 모두 조경 식물로 유용하게 이용되었다<sup>6)</sup>. 性味는 맛은 달며 性質은 溫하고 독이

\*Corresponding author : Ki-Jung Kil, Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University, Geumsan 312-702  
· Tel : +82-41-750-6225 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr

#First author : Kyung-Soon Shin, Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University, Geumsan 312-702  
· Tel : +82-41-750-6394 · E-mail : sinks1@hanmail.net

· Received : 11 December 2018 · Revised : 08 January 2019 · Accepted : 25 January 2019

없으며, 瘀血을 없애며 몸 안에 있는 딱딱한 덩어리를 풀어 주고, 鎮痛, 活血, 祛風작용이 있고 류머티즘성 관절염, 神經痛, 鎮吐, 半身不隨, 偏頭痛, 喉頭炎, 黃疸 등에 이용된다. 또한 당뇨병의 혈당을 떨어뜨리고 암이나 옹종 치료에도 효과가 뛰어나 피부에 생기는 육종이나 양성종양에도 담쟁이덩굴을 사용되고 있으며, 민간에서는 담쟁이덩굴의 열매와 줄기를 약으로 귀중하게 사용되었다<sup>3, 4)</sup>.

담쟁이덩굴에 대한 성분 분석 연구로는 줄기에서 resveratrol과 resveatrol의 dimer에 대하여 분리가 되었으며<sup>7)</sup>, 잎에서 caffeic acid의 배당체를 밝혔다고 보고되었고<sup>8)</sup>, 열매에서는 methyl 1,2-dihydro-2-oxoquinoline-4-carboxylate, ethyl 1,2-dihydro-2-oxoquinoline-4-carboxylate가 분리되었다<sup>9)</sup>. 이외에 betulfol A, pallidol, (+)-catechin, piceatannol, tricuspidatoa A, myrciaphenone A, quadrangularins A 및 수종의 glucoside와 stilbene dimers가 확인되었다<sup>10-15)</sup>. 생리활성에 대한 연구는 줄기 추출물에서 세포 보호 작용과 항산화 활성 연구<sup>16)</sup>, 열매로부터 추출한 안토시아닌이 항우울증 관한 연구<sup>17)</sup>, 에탄올추출물 첨가에 따른 키토산의 항균활성 연구가 보고되었고<sup>18)</sup>, 담쟁이덩굴의 부위별에 따른 비효소적 및 효소적 항산화 방어체에 대한 연구가 보고<sup>19)</sup>되었다. 이에 담쟁이덩굴에 대한 성분 분석 및 생리활성 연구가 일부 보고되었으나, 세포수준에서의 항염증 활성에 대한 세부적인 기전 관련한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 시중에서 가장 많이 유통되는 소나무를 감고 오른 담쟁이덩굴의 항염증에 관한 기전을 살펴보고 항염증의 천연소재로서의 활용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료

본 실험에 사용된 담쟁이덩굴(*P. tricuspidata* (Sieb. et Zuce) Planch.)은 2016년 11월 대전광역시 동구 비래동 계곡산 일현산성 부근 해발 약 300m에서 소나무를 감고 오른 담쟁이덩굴을 지름 2cm 내외 크기로 선별 채취한 후 잘 씻어 절단하고 자연 건조(음건)시켰다. 실험 약재는 이용하기 전에 중부대학교 한방보건제약학전공 본초학교실에서 감정한 후 불순물을 제거하고 분쇄하여 4±1℃에서 냉장보관한 후 추출용 시료로 사용하였다.

### 2. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. EZ-Cytox kit는 Daeillab (Korea)에서 구입하였고, Nitric oxide detection kit는 Intron (Korea)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$  및 IL-6 ELISA kit는 e-Bioscience (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, phospho-extracellular

signal-regulated kinase (ERK) 1/2(p-ERK), ERK1/2 protein kinase, phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1/2 (p-JNK), JNK1/2 protein kinase, phospho-p38 mitogen-activated protein kinase(p-p38 MAPK), p38 protein kinase, phospho-inhibitory  $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), I $\kappa$ B $\alpha$  및 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B p65)의 1차 항체, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit 및 anti-mouse의 2차 항체 및  $\beta$ -actin, lamin A/C는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Membrane과 ECL 기질은 Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였고, Tween 20, phosphate buffer (PBS) 및 lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 055:B5)와 그 외 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 3. 방법

### 1) 시료 추출

자연 건조한 담쟁이덩굴을 100 g을 증류수 2L에 가해 열탕 추출기로 3시간 동안 3회 반복 추출하였다. Whatman filter paper로 여과한 다음 45±1℃ 수욕 상에서 감압증류장치로 농축 및 동결 건조하여 담쟁이덩굴 추출물(*Parthenocissus tricuspidata* extrats, PTE)을 제조한 후 deep freezer (Sanyo, Japan)에서 -80℃로 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다. PTE의 최종수율은 9.6% 이었다.

### 2) 세포배양

한국 세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받은 RAW 264.7 세포주는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양조건에서 10% FBS와 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 세포를 90% 이상 증식시킨 후 배양 2일 간격으로 배양세포 표면을 PBS 용액으로 2번 세척한 후 스크래퍼를 사용하여 계대 배양한 후 실험에 사용하였다.

### 3) 세포생존율 측정

RAW 264.7 세포를 2×10<sup>4</sup> cell/well로 분주한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 후 배지를 버리고 PBS로 세척하였다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료를 농도별로 각 well에 분주 한 후 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 EZ-Cytox kit를 이용하여 각 well에 10  $\mu$ L씩 분주한 후 1시간 동안 배양한 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

### 4) 전염증성 사이토카인 측정

RAW 264.7 세포를 2×10<sup>4</sup> cell/well로 분주하여 24시간 배양하였다. 배양 상등액을 제거한 후 PBS로 수세한 후 농도별로 시료를 첨가하였다. 1시간 후 LPS를 1  $\mu$ g/mL로 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 세포배양 상등액 내의 TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성량은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법

대로 정량하였다.

#### 5) Nitric oxide(NO) 생성 측정

전염증성 사이토카인 측정과 같은 방법으로 세포를 배양한 후 원심 분리하여 세포들을 침전시켜 각 well에서 세포배양 상층액을 수집하였다. Nitric oxide detection kit를 사용하여 Sulfanilamide in the reaction 용액 50  $\mu$ L와 세포배양 상층액 100  $\mu$ L을 넣고 10분 동안 반응 시켰다. 그 후 Naphthylethylenediamine in the stabilizer 용액을 50  $\mu$ L을 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader를 사용하여 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준 곡선을 작성하여 NO 대사물인 nitrite의 생성정도를 산출하였다.

#### 6) iNOS, COX-2, I $\kappa$ B 및 NF- $\kappa$ B p65 발현 측정

세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2, I $\kappa$ B 및 세포핵 내 NF- $\kappa$ B의 발현량 측정은 RAW 264.7 세포에 LPS(1  $\mu$ g/mL)와 PTE (100, 200, 400  $\mu$ g/mL)를 처리한 후, 20시간 배양하였고, 인산화된 I $\kappa$ B는 20시간 전 배양하고 PTE를 처리한 후 30분 동안 배양하였고, NF- $\kappa$ B는 30분 본 배양을 하였다. iNOS, COX-2, I $\kappa$ B, p-I $\kappa$ B의 경우 1% NP-40 용액을 이용하였으며, 30분간 4 $^{\circ}$ C에서 lysis 시킨 후 12,000 $\times$ g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. NF- $\kappa$ B p65의 경우 nuclear extraction kit(Abcam plc, UK)를 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 사용하여 정량하였으며, 동일한 양의 단백질(25  $\mu$ g)을 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)- polyacrylamide gel로 변성분리를 한 후 PVDF에 70 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 이 PVDF membrane은 5% skim milk가 함유된 TBST(0.1% Tween 20+ TBS) 용액에서 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 1차 항체 iNOS, COX-2, I $\kappa$ B, p-I $\kappa$ B, p65를 1 : 1000 비율로 TBST 용액에서 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시켰다. TBST 용액으로 3번 세척한 후 2차 항체로는 HRP conjugated anti-rabbit 및 anti-mouse IgG를 1 : 1000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 ECL 기질과 1~3분간 반응시켜 ChemiDoc<sup>TM</sup> Imaging Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 이용하여 분석하였다.

#### 7) MAPKs (JNK, ERK, p-38) 발현 측정

인산화된 MAPKs의 발현량 측정은 RAW 264.7 세포를 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL으로 20시간 전 배양하고 PTE를 처리하여 30분 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS로 세척한 후, 1% NP-40 용액을 이용하였으며, 4 $^{\circ}$ C에서 lysis 시킨 후 12,000 $\times$ g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 1차 항체 p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK를 1:1000으로 희석하여 사용하였다. 2차 항체로 horseradish peroxidase가 결합된 anti-rabbit 및 anti-mouse IgG 1:1000으로 희석하여 iNOS, COX-2, I $\kappa$ B 및 NF- $\kappa$ B p65 발현 측정 방법과 동일하게 실험을 진행하였다.

## 4. 통계처리

모든 실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차 (mean $\pm$ SD)로 나타냈으며, 모든 실험의 분석결과의 통계분석은 SPSS(statistical package for the social science, version 12.0, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA를 실시하였으며, 실험군 간의 유의성은 Duncan의 다중범위 시험법으로 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

## III. 결 과

### 1. RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향

PTE가 세포독성에 영향을 주는지 알아보기 위해 RAW 264.7 세포를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. PTE의 100, 200 및 400  $\mu$ g/mL 농도에서는 각각 101.61%, 100.00%, 99.04%의 생존율을 보여 세포독성이 나타나지 않았다. 이하 세포독성이 나타나지 않는 400  $\mu$ g/mL 이하의 PTE 농도를 선택하여 후속 실험을 진행하였다(Fig. 1.).

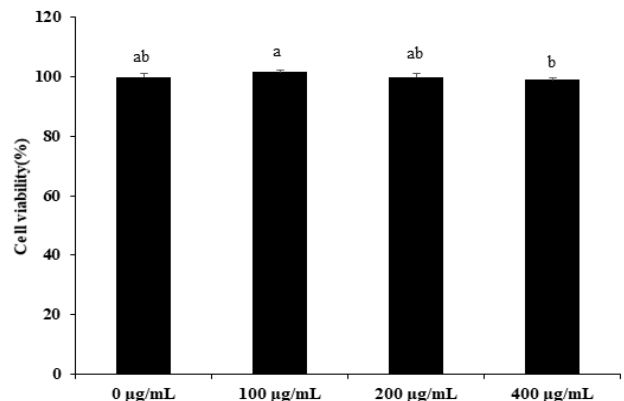


Fig. 1. Effect of PTE on cell viability in RAW 264.7 cells. The values are expressed as means $\pm$ standard deviation of triplicate tests. Means with difference letter (a-b) above the bars are significantly different at  $p$ <0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

### 2. 전염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

LPS 자극에 의해 유도된 RAW 264.7 세포배양 상층액 내에서 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성에 PTE가 미치는 영향을 알아보았다. TNF- $\alpha$  생성은 PTE의 100, 200, 400  $\mu$ g/mL 처리 시 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. IL-6 생성은 PTE의 100, 200, 400  $\mu$ g/mL 처리 시 농도 의존적으로 감소하였지만 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 2.).

### 3. NO 생성에 미치는 영향

LPS 자극에 의해 유도된 RAW 264.7 세포배양 상층액 내에서 PTE가 NO 생성에 미치는 영향을 알아보았다. LPS 자극에 의해 NO 생성은 2배 정도 증가하였고, PTE를 LPS와 함께 처리하였을 때 농도 의존적으로 NO 생성이 유의적으로 감소하였다(Fig. 3.).

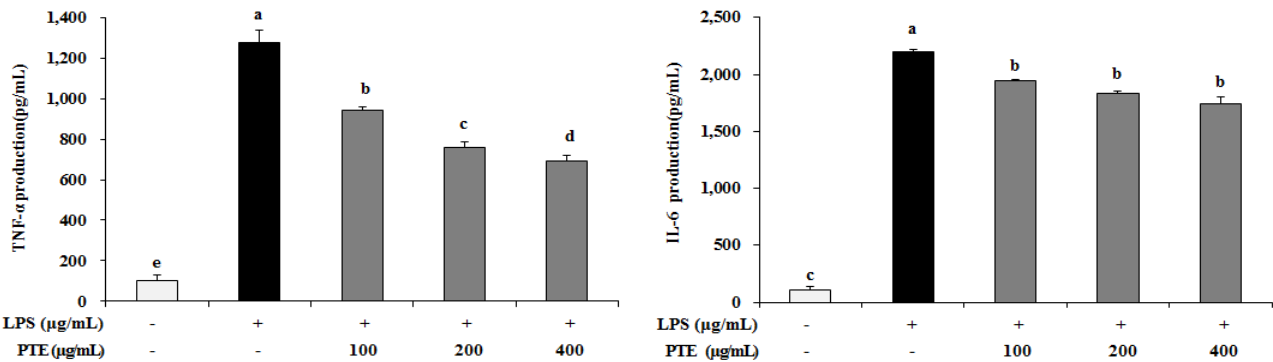


Fig. 2. Effect of PTE on TNF- $\alpha$  and IL-6 production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 100, 200, 400  $\mu$ g/mL of PTE for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. The values are expressed as means $\pm$ standard deviation of triplicate tests. Means with difference letter (a-e) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

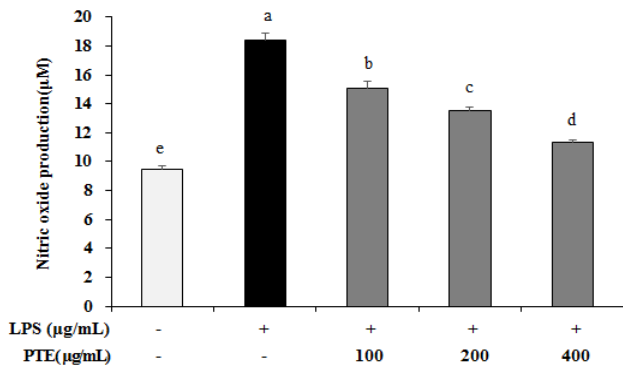


Fig. 3. Effect of PTE on NO production activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 100, 200, 400  $\mu$ g/mL of PTE for 1 h prior to the addition of LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. The values are expressed as means $\pm$ standard deviation of triplicate tests. Means with difference letter (a-e) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

#### 4. iNOS 및 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향

PTE에서 NO 생성에 관여하는 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot법을 활용하여 정량하였다. iNOS 단백질의 발현은 LPS 처리구가 무처리구 보다 발현이 증가하였고, PTE 200, 400  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS 처리구보다 유의한 수준으로 억제하였다. COX-2 단백질의 발현은 LPS 처리구가 무처리구 보다 발현이 증가하였고, PTE 400  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS 처리구보다 유의한 수준으로 억제하였다(Fig. 4.).

#### 5. MAPKs의 활성화에 미치는 영향

PTE의 억제 매커니즘인 MAPKs를 경유하는지 알아보기 위해 LPS에 유도된 RAW 264.7 세포에서 JNK, ERK 및 p38 인산화를 억제하는 것을 western blot을 통해 확인하였

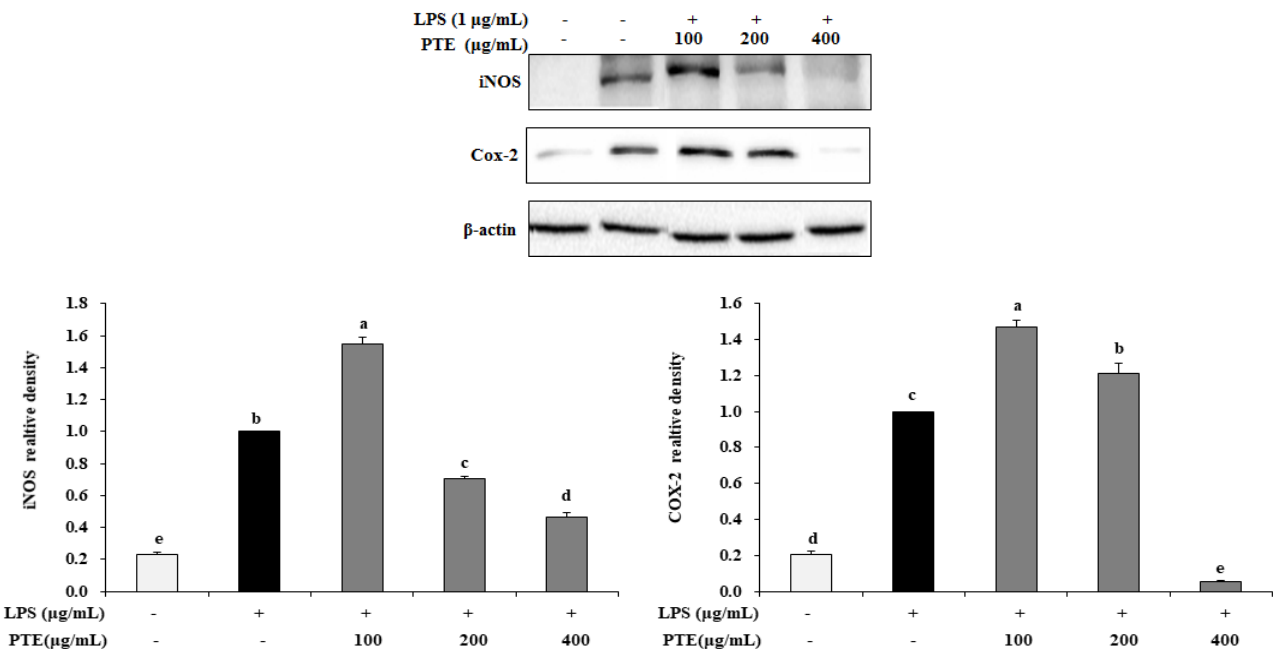


Fig. 4. Effect of PTE on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentrations of PTE (100, 200, 400  $\mu$ g/mL) and stimulated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 20 h. The iNOS and COX-2 protein expression were analyzed by western blot analysis. The values are expressed as means $\pm$ standard deviation of triplicate tests. Means with difference letter (a-d) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

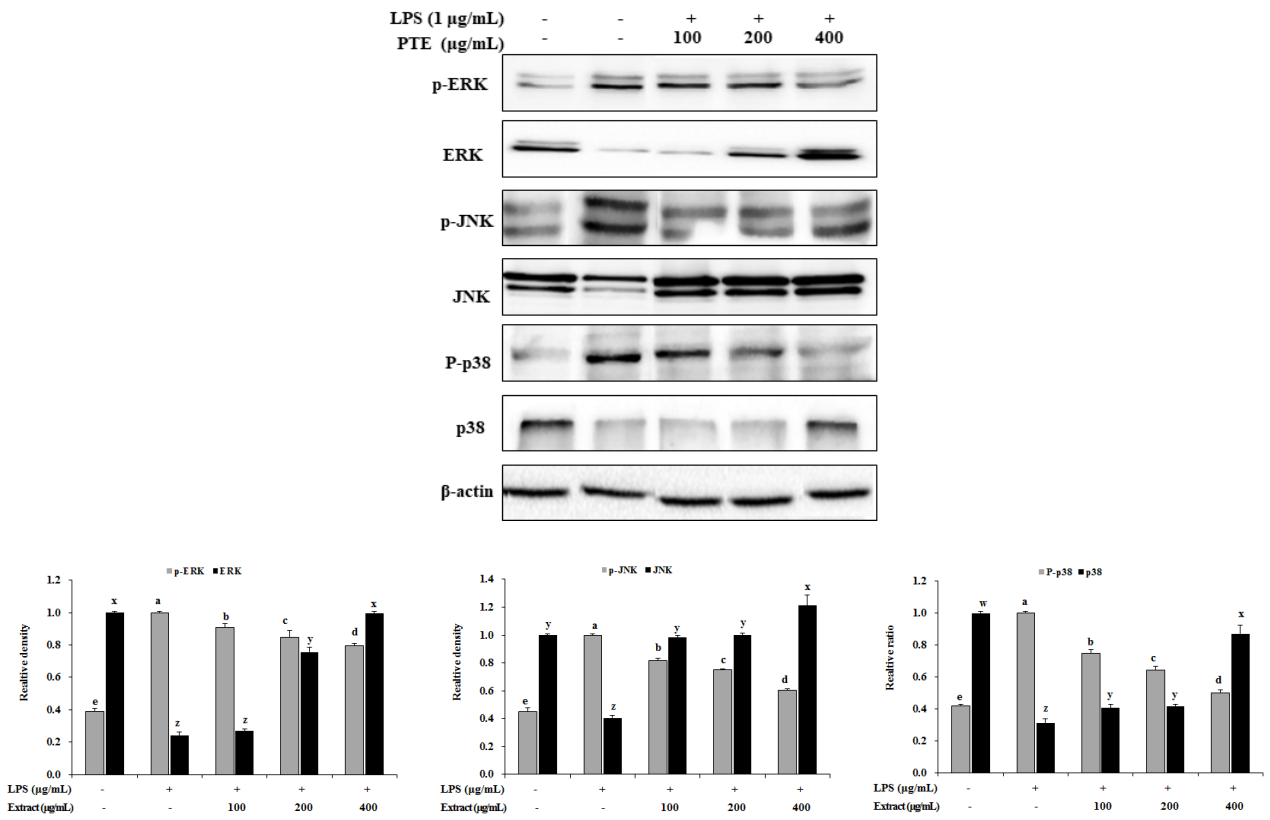


Fig. 5. Effect of PTE on MAPKs expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Phosphorylation and total protein expression of ERK, p38, and JNK were extracts prepared from the cells PTE treated with LPS-stimulated analyzed by western blot. The values are expressed as means±standard deviation of triplicate tests. Means with difference letter (a–e, w–z) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

다(Fig. 5.). LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 PTE 100, 200, 400 μg/mL를 처리한 경우 ERK, JNK 및 p38의

인산화 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 5.).

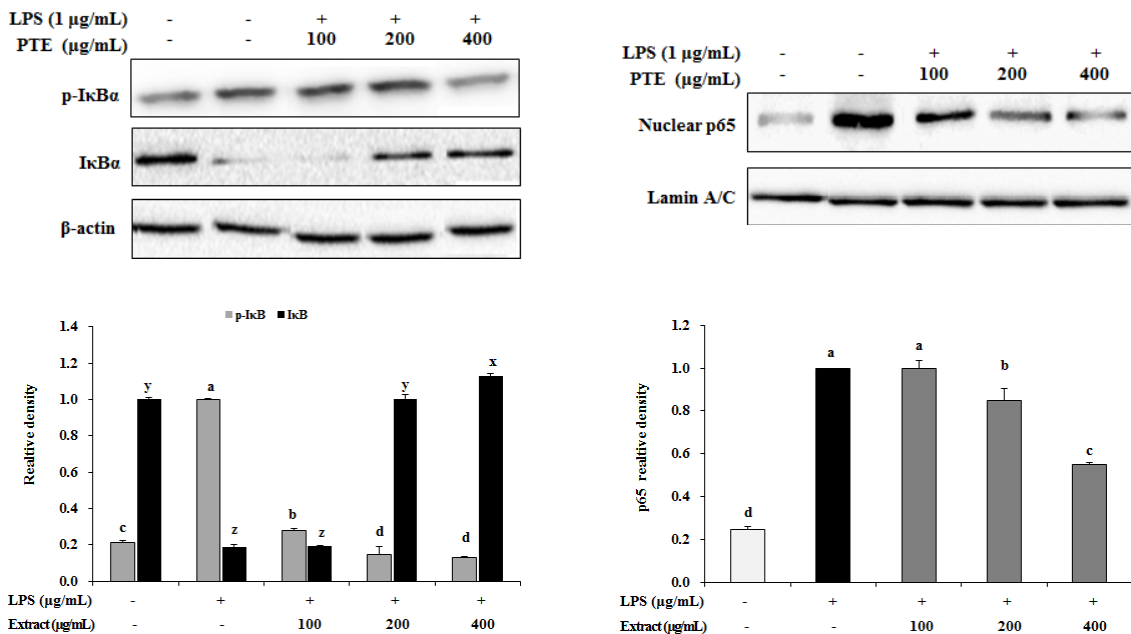


Fig. 6. Effect of PPE on NF- $\kappa$ B activation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Western blot analysis shows the effect of PPE on phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in cytosol and activation of NF- $\kappa$ B p65 in the nucleus. The RAW 264.7 cells were cotreated with PPE (100, 200, 400 μg/mL) and with or without LPS (1 μg/mL) for 20 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies. Means with difference letter (a–d, x–y) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

## 6. I $\kappa$ B 분해와 핵 내의 NF- $\kappa$ B의 활성화에 미치는 영향

PTE이 LPS에 유도된 RAW 264.7세포에서 I $\kappa$ B 분해와 NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 영향을 western blot 수행하여 확인하였다. NF- $\kappa$ B p65의 핵으로의 translocation에 미치는 영향을 측정된 결과, LPS 처리에 의해 translocation이 유도되었고, PTE에서는 농도 의존적으로 억제하였다. 세포질에서 I $\kappa$ B의 인산화에 미치는 영향을 확인한 결과, PTE에서 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 6.).

## IV. 고 찰

염증이란 신체에 해로운 자극에 대한 방어반응으로 신체의 세포와 조직이 외부에서 자극을 받을 때 국소적으로 혈관 활성 물질들이 유리되어 손상된 부위를 복구시켜 유지하려는 신체의 방어기전으로, 주로 발열, 통증, 발적, 기능상실 및 종창 등이 나타내면서 염증을 유발한다<sup>20, 21</sup>. 서양의학에서는 급성 및 만성 염증 질환에서 진통작용, 해열작용 및 항염증 작용이 있는 비스테로이드 항염증제를 전 세계적으로 흔히 사용하고 있다<sup>22</sup>. 비스테로이드 항염증제는 COX효소를 차단함으로써 프로스타글란딘의 합성을 감소시켜 염증, 통증 및 발열과 관련된 다양한 종류의 질환에 흔히 사용되는 약제이지만<sup>23</sup> 광범위한 사용과 함께 여러 위장관계, 부종 및 이명 등 다양한 부작용들이 유발되고 있다<sup>24</sup>. 이에 따라 최근 한약재를 포함한 다양한 천연물로부터 낮은 독성과 우수한 항염증 작용이 있는 새로운 천연소재를 찾기 위한 많은 연구들이 활발히 이루어지고 있다<sup>25</sup>.

본 연구에서는 항염증 관련한 천연 기능성 소재를 발굴하기 위하여 아직까지는 생리활성에 관한 연구는 미비한 PTE를 소재를 사용하여, RAW 264.7 세포에 LPS로 염증을 유도하여 염증 매개물질인 NO 및 전염증성 사이토카인의 생성을 측정하였고, 항염증 기전을 조사하기 위하여 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B의 활성화를 분석하였다.

PTE를 100~400  $\mu$ g/mL 농도에서 RAW 264.7 세포생존율을 확인한 결과 99.04% 이상의 생존율로 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 100~400  $\mu$ g/mL 농도에서 *in vitro* 상에서 항염증 효과를 알아보았다.

염증매개인자에 의해 활성화된 대식세포는 NO와 prostaglandin의 유리와 TNF- $\alpha$  및 IL-6을 포함한 다양한 사이토카인을 생성하여 감염 초기 염증반응을 증가시킨다<sup>26</sup>. TNF- $\alpha$ 는 패혈쇼크 및 독성쇼크를 포함한 전신적 염증 반응 시 혈액 내에 증가하는 대표적인 사이토카인으로서 염증반응에 있어 중요한 역할을 하며<sup>27</sup>, 다른 사이토카인의 생성을 유도함으로써 염증반응을 지속시킨다<sup>28</sup>. IL-6도 LPS에 의해 염증반응이 과다하게 생성하게 되면 발열 증상이 나타나게 된다<sup>29</sup>. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성은 PTE를 100~400  $\mu$ g/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 LPS 처리구 보다 감소하였다. 기존의 보고<sup>26-29</sup>와 일치하게 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성을 조절을 통해 감염 초기의 염증반응을 효과적으로 조절할 수 있으며, 이러한 결과는 MAPKs

및 NF- $\kappa$ B의 조절을 통해 염증 반응이 억제됨을 의미한다.

대식세포에서 LPS 또는 염증성 사이토카인 등에 의해 발현이 유도되어 iNOS에 의한 과다하게 NO 생성을 하여 염증반응을 심화시켜, 유전자 변이나 신경손상을 일으키고, 다양한 염증질환에서 증상 유발하거나 질병 악화에 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>30, 31</sup>. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성을 측정된 결과 PTE를 100~400  $\mu$ g/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 LPS 처리구 보다 NO 생성이 감소되었다. 따라서 PTE는 염증 매개물질인 NO 생성을 유의하게 억제함으로, 이는 iNOS의 발현 억제에 기인하는 것임을 나타낸다.

iNOS에서 여러 자극으로 인한 활성화 세포에서 유도된 과량의 NO 생성과 염증 반응에서 생성되는 NO는 대부분 iNOS에 의한 것이라 보고<sup>32</sup> 되었다. RAW 264.7세포에 PTE를 100~400  $\mu$ g/mL 농도로 처리하여 세포질에서의 iNOS 단백질 발현은 PTE 200, 400  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS 처리구 보다 유의적인 발현 감소를 보였다. 따라서 PTE가 NO 생성을 감소시켜 iNOS의 단백질 발현을 억제하는데 영향을 주었다고 판단된다.

COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 대식세포 등 면역 관련 세포의 활성을 유도하여 염증반응을 일으키는 원인 물질이다<sup>33</sup>. COX-2의 단백질 발현은 PTE 400  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS 처리구 보다 유의하게 억제하였고, 무처리구와 비슷한 수준으로 COX-2 발현을 유의하게 억제하였다. COX-2의 발현이 억제함으로써 염증 유발 물질인 NO 역시 유의성 있게 감소함을 알 수 있었다.

MAPK 경로는 여러 가지 세포 외부의 자극에 의해 활성화되어 세포의 특정 기질의 인산화에 통해 세포 내 여러 가지 반응이 일어나도록 전환하는데, MAPK의 subfamily에는 ERK, JNK, 및 p38 등이 있다. p38 및 SAPK kinase는 MAP kinase군에 속하는 단백질 인산화 효소로서, 이 중 SAPK는 c-Jun의 N-말단 부위를 인산화 시킬 수 있기 때문에 JNK라고도 불리며, 여러 동형 단백질들이 존재한다<sup>34-36</sup>. p38 및 JNK kinase들은 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등의 염증성 사이토카인 들이나 여러 스트레스성 자극, 자외선, 염색체 손상물질 및 x-선 등에 의해 활성화되어 세포분화, 세포사멸 및 염증반응 등 다양한 생물학적 반응을 유도한다<sup>34-36</sup>. 또 다른 MAP kinase인 ERK는 세포의 성장이나 분화를 촉진하는 신호전달 경로에 관여한다<sup>34-36</sup>. PTE가 인산화된 MAPKs 단백질의 발현을 분석한 결과 LPS에 의한 증가한 p-ERK, p-JNK 및 p-p38의 발현이 PTE의 처리에 의해 농도 의존적으로 유의적으로 억제하였다. 이러한 결과는 PTE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화된 MAPK family인 p38, JNK 및 ERK의 신호전달인자를 억제하여 항염증 효과가 있다고 생각된다.

염증반응에 있어서 NF- $\kappa$ B는 iNOS 및 COX-2의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있는데, 일반적으로 NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B와 결합하여 세포질에 존재하지만 염증성 유도에 의하여 I $\kappa$ B kinase가 활성화 되고 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화에 의한 분해가 촉진된다. I $\kappa$ B가 degradation되면 자유로워진 NF- $\kappa$ B는 세포질에서 핵 내로의 이동이 촉진되어 전사조절인자로 작용하면서 iNOS 및 COX-2의 발현을 증가시켜 염증반응을 촉진시킨다<sup>37, 38</sup>. 본 연구에서 PTE가 I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$  및 NF- $\kappa$ B p65의

발현에 미치는 영향을 분석한 결과 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 는 LPS에 의해 증가되었으며, PTE를 100~400  $\mu$ g/mL로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 발현이 효과적으로 억제되는 것으로 나타나 PTE가 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 감소시켰다. 또한 LPS에 의해 증가하는 NF- $\kappa$ B p65의 발현은 PTE 처리에 의하여 농도 의존적으로 유의적인 감소를 하였다. 이 결과는 PTE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화로 염증 반응이 일어나면 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 시작되고 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 막으며, p65의 발현을 억제시킴으로 NF- $\kappa$ B 신호전달경로를 억제할 수 있음을 시사한다.

이상의 연구결과를 종합해 보면, PTE는 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로를 저해하여 MAPK의 인산화 활성을 감소시켜 염증과 관련된 인자 NO, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하였고, 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성을 억제시킴으로 우수한 항염증 활성을 나타내었다.

향후 염증성 관련한 천연소재로서의 활용과 다양한 분야에도 연구해볼만한 가치와 가능성이 있다고 생각되며, 우수한 생리활성 성분 분석과 함께 임상적인 효과를 검증하는 연구가 이루어졌으면 하는 바램이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 시중에서 가장 많이 유통되는 소나무를 감고 오른 담쟁이덩굴을 추출하여 RAW 264.7 세포에서 LPS로 인하여 염증반응을 유도했을 때, 항염증 효과와 관련 기전을 조사하여 천연소재로서의 활용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PTE는 100~400  $\mu$ g/mL 농도에서 99%이상의 세포생존율로 세포독성이 나타나지 않았다.
2. PTE는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$  생성은 LPS 처리구에 비해 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타내었다. IL-6 생성은 LPS 처리구에 비해 농도 의존적으로 감소하였으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.
3. PTE는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO생성은 농도 의존적으로 LPS 처리구에 비해 유의성 있는 감소하였다. iNOS 단백질의 발현은 200, 400  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS 처리구에 비해 유의적으로 억제하였고, COX-2 단백질의 발현은 400  $\mu$ g/mL 농도에서 무처리구 수준으로 유의성 있게 억제하였다.
4. PTE는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 ERK, JNK 및 p38의 인산화는 농도 의존적으로 억제하였다. LPS에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화는 농도 의존적으로 억제하였고, NF- $\kappa$ B p65은 핵 내로의 이동을 억제하였다.

결과적으로 PTE는 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 활성 억제를 통해 NO, iNOS, COX-2 및 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 생성을 억제시켜 우수한 항염증 활성으로 향후 천연소재로서 안전하고 다양한 항염증 질환 예방 또는 치료제로서 널리 활용되기를 기대한다.

## References

1. Cho MY. Coloured Woody Plants of Korea. Seoul : Book Publishing Academy Book, 1989 : 343.
2. Kim CM, Shin MG, Ahn DG, Lee GS. Chinese herbal medicine dictionary. Seoul : Jungdam, 1999 : 3941-2.
3. Choi JK. The Native Herbal Plant Service Law 1. Seoul : Taeil Publishing Company, 2001 : 332-4.
4. Lee SJ. Korean Folk Medicine. Seoul: Publishing Center of Seoul National University, 1996 : 97.
5. Yook CS. Korean Medicinal Plants. Seoul : Book Publishing Academy Book, 1993 : 586.
6. Cao LH. Studies on the anticancer constituents with cytotoxic and topoisomerase inhibitory activity from the stems of *Parthenocissus tricuspidata*. Catholic University, 2004.
7. Kim HJ, Saleem M, SEO MS, Jin C, Lee YS. Two new antioxidant stilbene dimers, Parthenostilbenins A and B from *Parthenocissus tricuspidata*. Plantamed, 2005 ; 71 : 973-6.
8. Saleem M, Kim HJ, Jin CB, Lee YS. Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*. Arch. Pharm. Res. 2004 ; 27 : 300-4.
9. Wang YF, Zhang CG, Yao RR, Zhou WS. Studies on chemical constituents of *Parthenocissus tricuspidata* Planch. Yaoxue Xuebao, 1982 ; 17 : 466-8.
10. Hwang HK, Sung HK, Whang WK, Kim IH. Flavonol glycosides from *Parthenocissus tricuspidata* leaves. J. Pharm. Soc. 1995 ; 39 : 289-96.
11. Son IH, Chung IM, Lee SJ, Moon HI. Anti plasmodial activity of novel stilbene derivatives isolated from *Parthenocissus tricuspidata* from South Korea. Parasitol. Res. 2007 ; 101 : 237-41.
12. Kim MJ, Shin SY, Koo BG, Baek G, Kim TJ, Park JK. Synergic antimicrobial activity of chitosan with the ethanol extract from *Parthenocissus tricuspidata*. J. Chitin Chitosan. 2011 ; 16 : 177-82.
13. Kim HJ, Saleem M, SEO MS, Jin C, Lee YS. Two new antioxidant stilbene dimers, Parthenostilbenins A and B from *Parthenocissus tricuspidata*. Plantamed, 2005 ; 71 : 973-6.
14. Jeong HJ, Kim C.H. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. Kor J Pharmacogn. 2001 ; 32 : 175-80.
15. Tanaka T, Ohama M, Morimoto K, Asai F, Iinuma M. A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. Pergamon, 1998 ; 48 : 1241-3.
16. Jo NR, Park MA, Chae KY, Park SA, Jeon SH, Ha JH, Park SN. Cellular protective and antioxidative activities of *Parthenocissus tricuspidata* stem extracts.

- J. Soc. Cosmet. Scientists Korea, 2012 ; 38 : 225-36.
17. Lee KT, Lee HJ, Kim YS, Kim WJ, Park CW, Lee HJ. Anti-depress effect of anthocyanin from fruits of *Parthenocissus tricuspidata*. Korean Forest Bioenergy Society. 2011 ; 17 : 135-7.
  18. Kim MJ, Shin SY, Koo BG, Baek G, Kim TJ, Park JK. Synergic antimicrobial activity of chitosan with the ethanol extract from *Parthenocissus tricuspidata*. J. Chitin Chitosan. 2011 ; 16 : 177-82.
  19. Jeong HJ, Kim CH. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. Kor J Pharmacogn. 2001 ; 32 : 175-80.
  20. Kim YH. Pathology. 3/e. Seoul : Hyeonmunsa, 2010 : 51-69.
  21. Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extract in mouse macrophage. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2000 ; 29 : 342-8.
  22. Kim JW. NSAID-induced Gastroenteropathy. Korean J Gastroenterol. 2008 ; 52 : 134-41.
  23. Cho JW, Lee ES, Shin WG. Evaluation of NSAID usage and appropriateness for prevention of NSAID-related ulcer complications. Kor J Clin Pharm. 2012 ; 22 : 211-9.
  24. Cho YJ, Moon SL, Park KH, Cho NC, Song YW. Comparison of side effects of non-steroidal antiinflammatory drugs(NSAIDs) in rheumatoid arthritis patients. J Kor Soc Hosp Pharm. 1998 ; 15 : 186-92.
  25. Park HJ, Lee JS, Lee JD, Kim NJ, Pyo JH, Kang JM. The Anti-inflammatory Effect of Cinnamomi Ramulus. J Korean Oriental Med. 2005 ; 26 : 140-51.
  26. Byun SH, Yang CH, Kim SC. Inhibitory effect of Sctophulariae Radix extract on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and Nitric Oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264,7 cells. Kor J Herbology. 2005 ; 20 : 7-16.
  27. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Kuby Immunology. 6th Edit. New York : W.H. Freeman and Company. 2007 : 52-75.
  28. Carter AB, Knudtson KL, Monick MM, Hunninghake GW. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF- $\kappa$ B-dependent gene expression. The role of TATAbinding protein (TBP). J. Biol. Chem. 1999 ; 274 : 30858-63.
  29. Xin C, Jingshan M, Hao W, Fang Z, Jie H, Peng G, Yue W, Luyong Z, Ming Y. The anti-inflammatory activities of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract and its components in lipopolysaccharide-stimulated RAW264,7 macrophages through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. J. Ethnopharmacol. 2015 ; 170 : 72-80.
  30. Yun HY, Dawson VL, Dawson M. Neurobiology of nitric oxide. Crit. Rev. Neurobiol. 2008 ; 10 : 291-316.
  31. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD-and FMN-containing flavoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991 ; 88 : 7773-7.
  32. Hung YC, Guh JH, Cheng ZJ, Chang YL, Hwang TL, Liao CH, Tzeng CC, Teng CM. Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7hq derivatives: involvement of I kappaB-alpha stabilization. Eur J Pharmacol. 2001 ; 418 : 133-9.
  33. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994 ; 91 : 12013-7.
  34. Hyun MS, Woo WH, Hur JM, Kim DH, Moon YJ. The role of ROS and p38 MAP kinase in berberine-induced apoptosis on human hepatoma HepG2 cells. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2008 ; 51 : 129-35.
  35. Ahn JY, Lee ER, Kim JY, Cho SG. Protein phosphorylation as a regulatory mechanism of various cellular function. Cancer Prev Res. 2006 ; 11 : 1-8.
  36. Chun JH, Kang S, Varani J, Lin J, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin in vitro. J Invest Dermatol. 2000 ; 115 : 177-82.
  37. Liden J, Rafter I, Truss M, Gustafsson JA, Okret S. Glucocorticoid effects on NF- $\kappa$ B binding in the transcription of the ICAM-1 gene. Biochem Bioph Res Co. 2000 ; 273 : 1008-14.
  38. Pruet SB, Fan R, Zheng, Q. Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmic IkappaB, nuclear NFkappaB, and activation of NFkappaB in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone in vivo. Int Immunopharmacol. 2003 ; 3 : 1-16.