

LPS로 활성화된 Raw 264.7 Cells에서 고삼 뿌리 추출물의 항염증과 항산화 효과

중앙대학교 의과대학 응급의학교실¹, 중앙대학교 의과대학 흉부외과학교실²,
중앙대학교 의과대학 피부과학교실³, 바이오랜드⁴

이동훈¹ · 손동섭² · 조대윤² · 김범준³ · 임윤영³ · 김영희⁴

= Abstract =

Anti-inflammatory and Anti-oxidant Effects of *Sophora flavescens* Root Extraction in Lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 Cells

Dong Hoon Lee¹, Dong Suep Sohn², Dai Yun Cho², Beom Joon Kim³,
Yun Young Lim³ and Young Heui Kim⁴

Department of Emergency Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea¹,
Department of Chest Surgery, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea²,
Department of Dermatology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea³,
Bioland, Cheonan, Chungnam, Korea⁴

Background: The macrophages activated by lipopolysaccharide produce numerous molecules and proteins, such as tumor necrotic factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and free radicals, associated with inflammation. The response was occurred by intracellular cascaded, NF- κ B pathway. So, the regulation of this pathway is very important in control of inflammation.

Objective: In this study, the anti-inflammatory and anti-oxidant effects of *Sophora flavescens* that is used empirically in oriental medicine and folk remedy were evaluated and the mechanism of the effects was studied.

Methods: By using the root extracts of *Sophora flavescens*, we performed experiment in LPS and interferon- γ (IFN- γ)-activated Raw 264.7 cells. We measured the production of NO, PGE₂ and expression of iNOS and COX-2 in activated Raw 264.7 cells with *Sophora flavescens* root extract. Also, we tested anti-oxidant effect of *Sophora flavescens* root extracts by ELISA kit in activated Raw 264.7 cells, and the free radical scavenging effect of material itself by DPPH assay.

Results: The *Sophora flavescens* root extracts decreased the production of NO ($p < 0.001$) and PGE₂ ($p < 0.01$) in Raw 264.7 cells activated by LPS and IFN- γ . The expression of proteins, iNOS and COX-2, suppressed along with the elevated concentration of *Sophora flavescens* root extracts. The result of DPPH assay was that the test material itself had scavenging effect for free radical ($p < 0.001$). And the antioxidant activity in activated Raw 264.7 cells was increased with the level of the *Sophora flavescens* root extracts ($p < 0.05$).

Conclusion: The *Sophora flavescens* root extracts suppressed the production of NO and PGE₂

접수일: 2010년 6월 5일, 수정일: 2010년 6월 5일, 최종승인일: 2010년 6월 5일

†별책 요청 저자: 손동섭, 156-755 서울시 동작구 흑석동 224-1, 중앙대학교 의과대학 흉부외과교실
전화: (02) 6299-1636, Fax: (02) 6298-8351, e-mail: sds999@cau.ac.kr

through the decreased expression of iNOS and COX-2. And the *Sophora flavescens* root extracts had the scavenging effect about free radicals itself and increased the antioxidant activity in activated macrophages. [Kor J Med Mycol 2010; 15(2): 39-50]

Key Words: *Sophora flavescens*, iNOS, COX-2

서 론

염증 반응에서 대식세포 (macrophage)는 병원체에 반응하여 tumor necrotic factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β 와 같은 염증유발인자 (pro-inflammatory cytokine)을 생성하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 합성하여 NO 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성한다¹⁻⁴. 생리학적으로 NO는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다⁵. 그러나 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO 생성하고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다⁵. PGE₂는 통증과 발열에 주로 관여하는 염증 인자로서 염증 반응이 일어나면 대식세포의 COX-2에 의해 생성된다^{6,7}. 따라서, 염증 반응에서 생성되는 물질 중 NO, PGE₂와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다.

염증 반응에서 다양한 염증유발인자 (pro-inflammatory cytokine)와 더불어 다양한 자유기 (free radical)가 생성된다. 정상적으로 자유기는 세포의 항상성 유지에 관여하며, 세포의 분화, 성장, 생존, 노화에 영향을 준다. 이러한 자유기 중 reactive oxygen species (ROS)는 세포 내의 미토콘드리아 (mitochondria)에서 호흡과 면역 반응에 의한 산소의 산화와 환원 과정을 통해 끊임없이 생성된다. 하지만 ROS는 정상적으로 존재하는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutamine reductase, vitamin C, vitamin E, uric acid, bilirubin과 같은 항산화 체계의 작용으로 제거되

면서 균형을 이루고 있다. 자유기의 생성과 소거의 균형이 무너지게 되면 "oxidative stress"가 발생하게 되어 염증, 노화나 암 유발과 같은 다양한 병리학적인 변화를 일으킨다^{8,9}. 실제로 많은 임상 질환에서 "oxidative stress"가 증가되는 것이 확인되었으며, 이러한 "oxidative stress"를 줄이기 위해 새로운 항산화 물질에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다.

고삼 (*Sophora flavescens*)은 콩과에 속하는 여러해살이 풀로 맛이 쓰고 효능이 삼과 유사하다. 전통적으로 한의학에서 고삼의 뿌리를 건위약, 이뇨약, 해열약, 진통약, 습진, 마른버짐 등에 사용하고 항염증 작용, 항알레르기 작용이 있어 피부 가려움과 과민 반응을 억제하며 열독으로 인한 피부 조직의 손상을 예방하고 치유하는 효과가 있다고 알려져 있다. 고삼에는 마트린, 옥시마트린, 소포라놀, 아나기린, 메틸시티진, 바브티플린, 알로마트린 등의 알칼로이드 (alkaloid)가 존재하며, 그 중에서도 뿌리에는 총 1.1%의 알칼로이드가 존재한다¹⁰. 또한 플라보노이드 (flavonoid)인 이소안히드로이카리딘, 노르안히드로이카리딘 등이 분리된다. 최근 고삼의 알칼로이드와 플라보노이드 성분을 이용하여 뇌허혈에서 신경 보호 기능, 비만세포 (mast cell)에서의 히스타민 분비 억제를 통한 항알레르기 기능, 암세포에서의 증식 억제 기능 등의 연구가 이루어지고 있다¹¹⁻¹³.

본 연구는 새로운 항염증 물질로서 고삼에 대한 효과를 실험적으로 확인하고자 하였으며 항염증 효과의 기전으로 대식세포의 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 경로를 억제하는 것을 확인하고자 하였다. 또한 염증 반응에서 생성되는 자유기의 소거능과 대식세포에서의 항산화 활성 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 WELGENE (Daegu, Korea)에서 구하였고, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구하였다. E. coil lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), Griess reagent, Sodium Nitrite, Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구하였다. PGE₂ ELISA Kit는 R&D system, Inc., antioxidant assay kit는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA.), iNOS antibody는 BD biosciences (San Jose, CA, USA), COX-2 antibody는 Santa Cruz biotechnology, Inc.에서 구하였다.

2. 추출물 제조 및 세포 배양

고삼 추출물의 제조는 뿌리 부분만을 이용하였으며, 고삼 뿌리는 경동 약업 시장에서 구입한 것으로 바이오랜드 (Byeongcheon, Korea)에서 구하여 제조하였다. 고삼 뿌리를 세절하여 어두운 곳에서 수분이 제거될 때까지 건조하였다. 건조된 고삼 뿌리 100 g을 70% 에탄올 (ethanol, w/w)을 이용하여 24시간 두 번 추출하여 합한 후, 250 mesh와 whatman 여과지로 여과하였다. 여과액을 60°C에서 감압농축하여 에탄올을 증발시켜 6 g의 갈색의 고삼 뿌리 추출물 (6% 수율) 얻었다.

Raw 264.7 cell은 Penicillin/streptomycin 100 unit/ml과 10% FBS이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다. Raw 264.7 cell을 1×10⁶/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주하고 혈청제거 (serum free) 배지로 교환한 후, LPS 100 ng/ml과 IFN- γ 10 unit/ml를 고삼 뿌리 추출물 0, 1, 5, 10, 25 μ g/ml 농도에 처리한 실험군과

LPS와 IFN- γ 를 첨가하지 않은 대조군을 24시간 배양하였다.

3. Griess 분석 방법을 이용한 nitrite 측정

LPS와 IFN- γ 로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 고삼 뿌리 추출물의 NO 생성 억제를 측정하기 위해 고삼 뿌리 추출물을 0, 1, 5, 10, 25 μ g/ml 농도로 처리한 실험군과 대조군을 24시간 세포 배양 후 Griess 분석 방법을 이용하여 nitrite를 측정하였다. 96 well plate에 세포 배양 상등액과 Griess reagent를 1:1로 혼합하여 넣고 5분 동안 반응 시킨 후 ELISA microplate reader (SoftMax Pro5, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. MTT 분석 방법을 이용한 세포 생존능 측정

고삼 뿌리 추출물의 Raw 264.7 cell에 대한 독성 효과를 측정하기 위해 각 실험군과 대조군을 24시간 배양 후 5 mg/ml 농도의 MTT (노란색) 시약을 넣고 4시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 세포를 용해 시킨 후 세포 내의 미토콘드리아에서 MTT 환원에 의해 생성된 formazan (보라색)을 ELISA microplate reader (SoftMax Pro5, Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. PGE₂ 생성 저해능 측정

NO와 더불어 대식세포에서 생성되는 PGE₂를 측정하여 항염증 효과를 확인하였다. 고삼 뿌리 추출물을 농도 별로 처리한 실험군과 대조군을 24시간 배양 후 상등액을 회수하여 R&D system의 PGE₂ ELISA kit를 이용하여 측정하였다. PGE₂ 표준시료 (standard)는 0, 39, 78, 156, 312, 625, 1250, 2500 pg/ml의 농도를 이용하였고, 실험군과 대조군은 calibrator buffer를 이용하여 1/3로 희석하여 사용하였다. 준비된 표준시료 (standard)와 실험군과 대조군을 96 well plate에 150 μ l씩 분주하고, PGE₂ mouse monoclonal antibody를 50 μ l씩 첨가하

여 상온에서 1시간 반응하였다. 1시간 반응 후, PGE₂ conjugate 50 µl를 첨가하여 상온에서 2시간 반응하였다. 세척완충제 (Wash buffer) 400 µl를 이용하여 4번 세척 후, substrate solution 200 µl를 첨가하여 빛을 차단하고 30분 반응하고, stop solution 50 µl를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot 분석

고삼 뿌리 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 위의 분석 과정을 통해 NO와 PGE₂의 생성 억제력을 측정하였고, 이렇게 생성 억제된 NO와 PGE₂의 억제 기전을 확인하기 위해 Western blot을 이용하여 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제 정도를 분석하였다. 고삼 뿌리 추출물을 농도 별로 처리한 실험군과 대조군을 24시간 배양 후 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, protease inhibitors (complete™, Roche, Mannheim, Germany), 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF과 10 mM EDTA를 함유하는 완충제를 사용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000 xg로 4°C에서 30분간 원심 분리하여 잔해 물질을 제거하였다. 정량한 단백질 10 µg을 10% SDS-PAGE에 전기 영동시킨 후 PVDF membrane으로 옮겼다. 차단처리 (blocking) 후 iNOS, COX-2에 대한 1차 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG를 반응시키고 ECL detection reagents (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

7. DPPH 방법을 이용한 고삼 뿌리 추출물의 자유기 (free radical) 소거 효과 측정

고삼 뿌리 추출물 자체의 자유기 (free radical)에 대한 소거 능력을 측정하기 위해 proton-radical scavenging에 의해 탈색되는 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH)를 이용하여 확인하였다. 96 well plate에 Bolis의 방법에 따라 0, 1,

5, 10, 25 µg/ml 농도의 고삼 뿌리 추출물 100 µl와, 0.3 mM DPPH 용액 100 µl를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader (SoftMax Pro5, Molecular Devices, USA)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 효과는 $[1 - (1, 5, 10, 25 \mu\text{g/ml} \text{ 농도 실험군의 DPPH 흡광도} / 0 \mu\text{g/ml} \text{ 농도 실험군의 DPPH 흡광도})] \times 100\%$ 로 표시하였다.

8. 고삼 뿌리 추출물의 대식세포 (Raw 264.7 cell)에서 항산화 효과 측정

고삼 뿌리 추출물의 대식세포인 Raw 264.7 cell 내에서 항산화 효과를 측정하기 위해 LPS와 IFN-γ로 활성화한 실험군과 대조군을 Cayman kit를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 표준 시료 (Standard)는 Trolox 0, 0.044, 0.088, 0.135, 0.18, 0.225, 0.330 µM의 농도를 이용하였고, 실험군과 대조군은 antioxidant assay buffer를 이용하여 1/3로 희석하여 사용하였다. 준비된 표준 시료 (standard)와 실험군과 대조군을 96 well plate에 10 µl씩 분주하고, metmyoglobin 10 µl와 chromogen 150 µl를 첨가하였다. 40 µl hydrogen peroxide working solution을 모든 well에 첨가한 후 상온에서 5분 동안 반응 후 microplate reader (SoftMax Pro5, Molecular Devices, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 $[1 - (1, 5, 10, 25 \mu\text{g/ml} \text{ 농도 실험군의 antioxidant activity} / 0 \mu\text{g/ml} \text{ 농도 실험군의 antioxidant activity})] \times 100\%$ 로 표시하였다

9. 통계적 검증

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험 결과는 각 항목에 따라 mean ± SD를 그래프로 표시하였다. 통계적 분석은 SPSS 12.0 K를 이용하여 paired t-test를 시행하였으며, p<0.05 미만의 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 고삼 뿌리 추출물의 NO 생성 억제

대조군에서 생성된 NO의 양이 매우 적은 것에 비해 실험군 중 LPS와 IFN- γ 로 활성화하고 시료를 첨가하지 않은 군 (시료 0 $\mu\text{g/ml}$)의 NO의 생성이 증가하였다 (Fig. 1). 하지만, 실험군 중 시료

를 첨가하지 않은 군에 비해 고삼 뿌리 추출물을 첨가한 군에서 시료의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성이 통계적으로 유의하게 저하되었다 ($p < 0.001$).

2. 고삼 뿌리 추출물을 처리한 Raw 264.7 cell의 세포 생존 확인

실험군에서 NO 생성의 감소 (Fig. 1)가 고삼

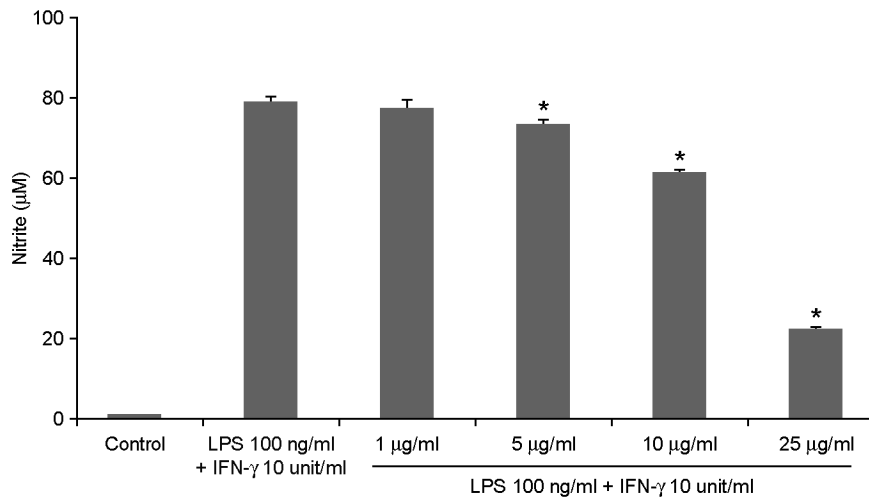


Fig. 1. Inhibitory effect of *Sophora flavescens* root extracts at different concentrations for production of nitric oxide (NO). The level of nitrite in Raw 264.7 cells activated with LPS and IFN- γ was decreased as dose-dependent pattern with *Sophora flavescens* root extracts ($p=0.94$ at the concentration 1 $\mu\text{g/ml}$, $*p < 0.01$).

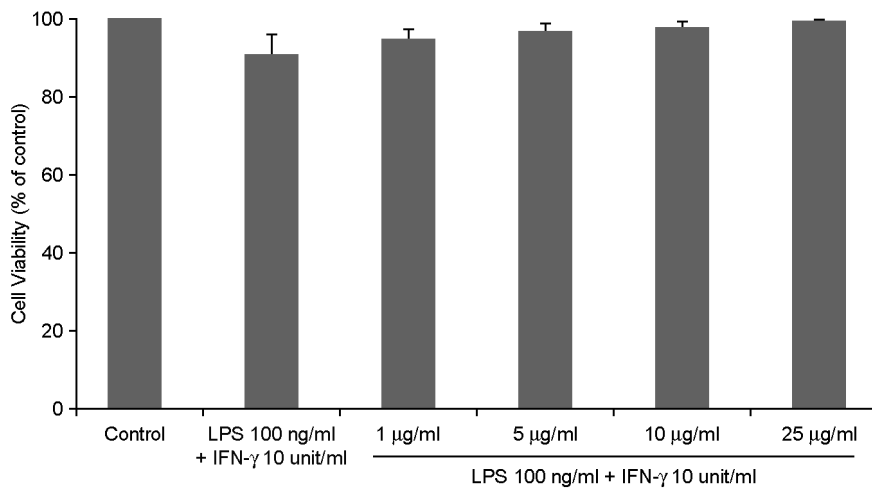


Fig. 2. The cell viability of Raw 264.7 cells with *Sophora flavescens* root extracts at different concentrations. There was no difference between control group and the group with *Sophora flavescens* root extract at the concentration 1, 5, 10, 25 $\mu\text{g/ml}$.

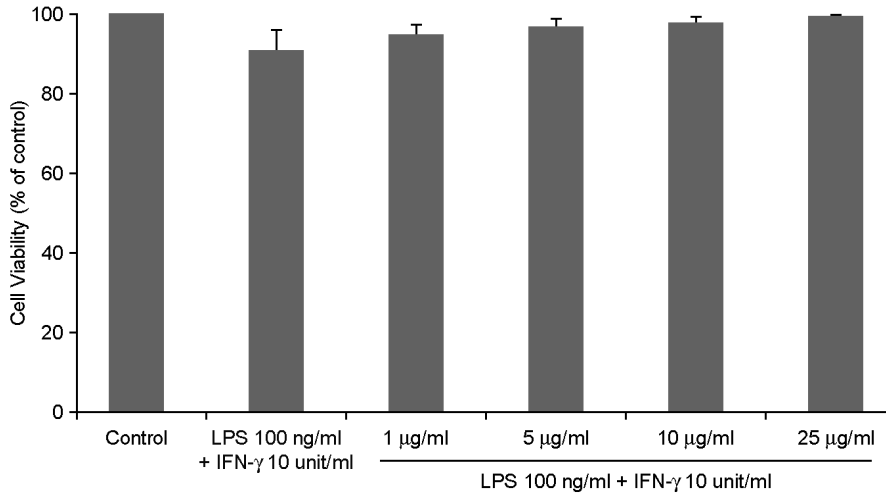


Fig. 3. Inhibitory effect of *Sophora flavescens* root extracts at different concentrations for synthesis of prostaglandin E₂ (PGE₂). The levels of PGE₂ in Raw 264.7 cells activated with LPS and IFN-γ were decreased as dose-dependent pattern with *Sophora flavescens* root extracts. (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$)

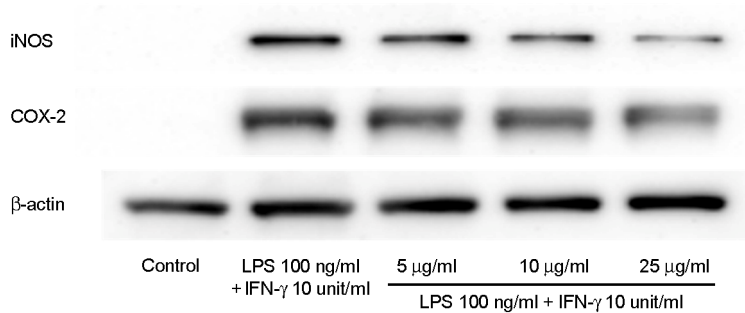


Fig. 4. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in Raw 264.7 cells activated with LPS and IFN-γ. The expression of two proteins was decreased along with the elevated concentration of *Sophora flavescens* root extracts.

뿌리 추출물에 의한 세포의 사멸에 의한 것인지를 확인하기 위해 대조군과 실험군을 24시간 배양 후 시행한 MTT 분석 결과 Fig. 2와 같이 실험군에서 첨가한 시료의 농도가 증가해도 대조군에 비해 세포의 생존에 차이를 보이지 않았다.

3. 고삼 뿌리 추출물의 PGE₂ 생성 억제

대식세포에 의해 생성되는 PGE₂를 측정된 결과 대조군에 비교하여 실험군 중 고삼 뿌리 추출물을 첨가하지 않은 군 (시료 0 μg/ml)에서 PGE₂의 생성이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 하지만, 실험군에서 시료를 처리하지 않은 군에 비해, 첨가한 시료의 농도가 증가함에 따라 통계적으로 유의하게 PGE₂의 생성이 감소되었

다 ($p < 0.01$).

4. 고삼 뿌리 추출물의 NO와 PGE₂ 생성 감소 기전의 확인

고삼 뿌리 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 NO와 PGE₂의 생성 억제를 확인하였고, 이 결과와 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제와의 관련성을 확인하기 위하여 Western blot을 이용하여 두 단백질의 발현 정도를 비교하였다. 실험 결과 활성화가 이루어지지 않은 대조군은 iNOS와 COX-2의 발현이 보이지 않았으나 실험군 중 시료를 첨가하지 않은 군 (시료 0 μg/ml)에서 iNOS와 COX-2의 발현이 관찰되었다 (Fig. 4). 실험군에서 첨가한 시료의 농도가 증가할수록 NO

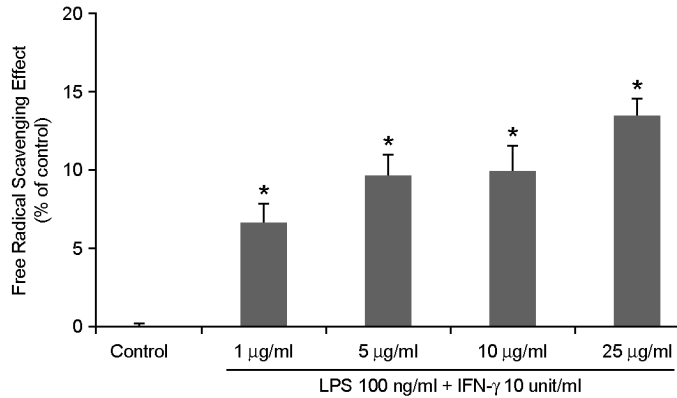


Fig. 5. The antioxidant effect of *Sophora flavescens* root extracts. *Sophora flavescens* root extracts was shown the characteristics of antioxidant. ($p < 0.001$ at the all tested concentration)

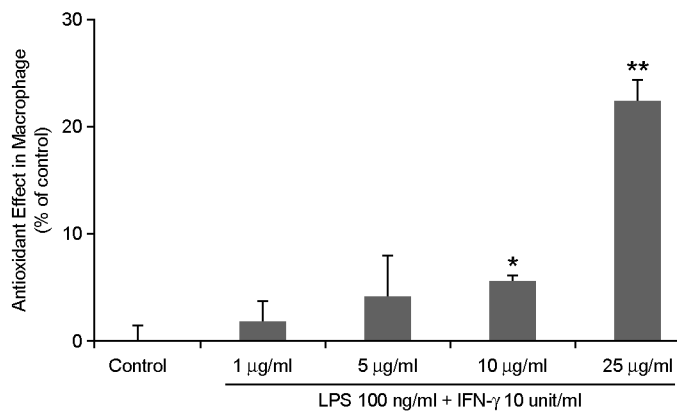


Fig. 6. The antioxidant effect of *Sophora flavescens* root extracts in Raw 264.7 cells. The *Sophora flavescens* root extract have antioxidant effect in Raw 264.7 cells activated with LPS and IFN- γ at the 10, 25 $\mu\text{g/ml}$ concentration. ($p = 0.01$, $**p < 0.001$)

와 PGE₂의 생성 억제와 같은 양상으로 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

5. 고삼 뿌리 추출물의 자유기 (free radical) 소거 효과

고삼 뿌리 추출물 자체의 항산화 물질로서 효과를 확인하기 위해 DPPH 분석을 시행하였다. DPPH는 안정한 자유기로 항산화 기전 중 proton-radical scavenger에 의해 발색되어 시료 자체의 자유기 소거 효과를 관찰할 수 있다. 실험군 중 시료를 첨가하지 않은 군 (시료 0 $\mu\text{g/ml}$)에 비해 시료를 처리한 군에서 시료의 농도가 증가함에 따라 자유기의 소거 효과가 증가하는 것으로 나타났다 ($p < 0.001$, Fig. 5).

6. Raw 264.7 cell 내에서 *Sophora flavescens*의 항산화 효과

시료의 대식세포에서 항산화 효과는 시료의 농도가 낮은 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군과 비교하여 통계적인 차이가 없었다 (Fig. 6). 그러나 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.01$), 25 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$)의 농도에서는 항산화 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 시료 자체가 가지고 있는 자유기 (free radical) 소거 효과의 결과와 유사한 양상을 보였다.

고 찰

대식세포 (macrophage)는 TNF- α , IL-6, COX-2, iNOS 등과 같은 염증을 유발하는 사이토카인 (proinflammatory cytokine)과 단백질을 생성하여

여러 염증성 질환에서 매우 중요한 역할을 한다¹⁴. 본 연구는 그람 (Gram) 음성 박테리아의 외벽에 존재하는 LPS (lipopolysaccharide)와 IFN- γ 로 활성화 시킨 Raw 264.7 cell 모델을 이용하여 고삼 뿌리 추출물의 항염증 효과와 항산화 효과를 확인하였다.

LPS에 의한 대식세포의 활성화 과정은 toll-like receptor (TLR)에 의해 매개되며 전사 인자 (transcription factor)인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)을 활성화 시키는 경로를 통해 이루어진다^{15,16}. LPS는 그람 음성균의 세포 외벽에 존재하며 core region과 O-polysaccharide region으로 이루어진 polysaccharide region과 lipid A로 알려진 lipid region으로 구성되어 있다. LPS의 lipid A가 그람 음성균의 병태생리학에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. LPS의 lipid A에 의해 대식세포 표면에 있는 TLR-4가 자극되면 세포질 내의 Toll/IL-1R (TIR) domain으로 신호가 전달된다. 이렇게 대식세포 내로 전달된 신호는 MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88)와 연결을 유도하고 IRAK4 (IL-1R-associated kinase 4)를 신호 전달 경로로 유도한다. 이 IRAK-4는 IRAK1을 인산화 (phosphorylation)시키고 TRAF6 (tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6)도 신호 전달 체계로 합류된다. 인산화된 IRAK1과 TRAF6는 신호수용체 (receptor complex)에서 분리되어 세포막에서 다른 기전을 거쳐 다시 세포질에서 TAK1 (transforming-growth-factor- β -activated kinase)을 활성화 시킨다. 활성화된 TAK1은 MAP (mitogen-activated protein) kinase와 IKK (inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex) 복합체를 인산화시켜 I κ B와 NF- κ B를 분해를 유도한다. 분리된 NF- κ B는 대식세포의 핵으로 이동하여 염증과 관련된 유전자의 발현을 유도하여 여러 사이토카인과 단백질을 생성한다¹⁵. 따라서 이러한 염증 반응 과정 중 생성된 물질들의 억제 효과를 통해 항염증 효과를 확인할 수 있다. 본 연구에서는 대식세포에서 염증 반응의 결과로 생성되는 NO와 PGE₂의 생성 정도를

확인하였으며 두 물질의 생성 경로인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 비교하였다. 고삼 뿌리 추출물의 항염증 효과 중 본 연구에서는 대식세포주 (macrophage cell line)를 이용하여, 기존에 시행되어 왔던 피부각질세포나 섬유아세포 등을 중심으로 이루어져왔던 연구들에 비해 더욱 광범위한 영역으로 활용될 수 있을 것으로 기대한다. 고삼 뿌리 추출물을 상처에 발라서 효능이 확인하였던 기존의 한의학 보다 좀 더 진보된 형태인 혈구 내 성분이 대식세포주에서 항염증 효과를 확인하였기 때문에 바르는 형태 이외에도 경구 복용제나 주사제로서의 활용 가능성이 있을 것으로 추정된다. 그러나 경구 복용제나 건강기능식품, 주사제 등으로 활용되기 위해서는 각 분획에 따른 유효 성분의 추가적으로 연구가 이루어져야 한다.

본 연구에서는 고삼 뿌리 추출물의 항염증 효과 이외에도 항산화 효과를 검증하기 위해 대식세포에서 NO의 생성이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 1). L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 부산물로 생성되는 NO는 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 물질로 다양한 자극에 의해 여러 종류의 세포에서 합성된다. 정상적으로 혈관 확장, 신경 전달 체제, 항균 물질, 면역조절 등의 생체 내에서 긍정적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다¹⁷. 하지만 병원체 등에 의해 과도하게 증가된 NO는 세포의 파괴 및 염증 반응을 유발한다. NOS는 현재 세 종류가 밝혀져 있다. 혈관내피세포 (vascular endothelial cell)에서 발현되는 endothelial NOS (eNOS), 신경세포 (neuronal cell)에서 발현되는 neuronal NOS (nNOS)는 정상적인 세포 항상성 유지를 위해 소량의 NO를 생성하여 혈관 확장 (vasodilation), 혈소판의 응집 (platelet aggregation) 억제, 신경 신호 전달 (neuronal signal transduction) 등에 관여한다¹⁸. inducible NOS (iNOS)는 염증과 관련되어 LPS와 같은 세균의 내독소나 여러 가지 사이토카인에 의해 유도되어 병태생리학적 역할을 하는 NO를 생성하며 iNOS의 발현은 앞에서 설명한 세포

내의 기전에 의해 iNOS 유전자에 의해 조절된다. iNOS는 LPS, IFN- γ , IL-1, TNF- α 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관 평활근세포, 내피세포, 간세포, 심근세포 등에서 오랜 시간 동안 많은 양의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다¹⁹. 특히 Raw 264.7 cell은 쥐의 대식세포 (macrophage)로 LPS와 IFN- γ 에 의해 iNOS 유전자가 특징적으로 활성화 되어 iNOS의 발현을 유도한다¹⁷. 본 연구에서는 고삼 뿌리 추출물에 의해 생성이 억제된 NO의 생성 억제 기전을 확인하기 위해 iNOS의 발현 정도를 비교하였다. 실험 결과 LPS와 IFN- γ 로 활성화한 Raw 264.7 cell에서 고삼 뿌리 추출물에 의해 iNOS의 발현이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 이 결과로 고삼 뿌리 추출물의 처리로 인해 NO의 생성 억제는 LPS와 IFN- γ 에 의해 자극된 대식세포에서 iNOS 유전자 발현에 의한 iNOS 단백질 발현 억제 기전을 통한 것을 확인할 수 있었다.

대식세포에서 염증 반응으로 생성되는 NO와 함께 염증성 사이토카인인 PGE₂를 측정하였다. 실험 결과에서 고삼 뿌리 추출물에 의해 PGE₂의 생성이 억제되어 항염증 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). PGE₂는 주로 비만세포 (mast cell)나 대식세포 (macrophage)에 의해 분비되어, 히스타민 (histamine), NO와 함께 부종, 통증, 혈관 투과성 증가 등의 염증 반응을 일으킨다²⁰. PGE₂는 cyclooxygenase (COX)에 의해 아라키돈산 (arachidonic acid)에서 생성된다. 현재 COX는 COX-1, COX-2 두 종류가 밝혀져 있으며, 두 단백질은 분리된 다른 유전자에 의해 발현된다. COX-1은 정상 생리학적인 역할을 하는 프로스타글란딘 (prostaglandin, PG)의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 반면에 COX-2는 정상 생리학적인 조건에서는 발현되지 않으며 암발생 촉진 물질 (tumor promoter), 성장 인자 (growth factor), 사이토카인 (cytokine), 유사 분열 촉진 물질 (mitogen)에 의해 빠르게 발현한다. COX-2 유전자는 염증과 관련있는 대식세포, 내피세포 (endothelial cell), 섬유아세포 (fibroblast)에서 발현

한다. COX-2 유전자의 전사 조절 (transcriptional regulation)은 앞에서 설명한 iNOS의 유전자 발현과 같이 NF- κ B 경로를 통해 조절된다. 따라서 COX-2 단백질 발현을 조절하는 것이 항염증 작용에 중요한 기전으로 COX-2 유전자 발현에 대한 자세한 경로에 대한 연구와 COX-2 발현을 조절할 수 있는 물질에 대한 연구가 이루어 지고 있다^{21,22}. 이번 실험 결과로 고삼 뿌리 추출물의 PGE₂의 생성 억제는 Raw 264.7 cell에서 COX-2 단백질의 발현 억제 기전을 통한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

고삼 뿌리 추출물의 항염증 효과와 더불어 항산화 효과를 확인한 결과 물질 자체의 항산화뿐 아니라 대식세포 내에서 항산화 효과를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5, 6). 세포의 항상성 유지를 위해 자유기 (free radical) 생성과 소거의 균형이 중요하다. 정상 세포에서 생성된 자유기는 세포 내에 존재하는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutamine reductase, vitamin C, vitamin E, uric acid, bilirubin과 같은 항산화 체계와 물질에 의해 균형을 조절한다^{8,9}. 하지만 염증 반응과 같은 원인에 의해 균형이 파괴되어 자유기의 생성이 많아지면 "oxidative stress"에 의해 세포 내의 DNA, 단백질, 지질 등의 손상이 유발되어 다양한 병리학 변화가 발생한다. Ludvigsson²³은 당뇨 환자가 정상에 비해 높은 "oxidative stress"를 보이며, 당뇨 합병증이 항산화 치료에 의해 호전되는 것을 보고하였다. 따라서 새로운 항산화 물질에 대한 여러 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 고삼 뿌리 추출물에 대한 항산화 효과를 실험하였다. 고삼 뿌리 추출물 자체의 자유기 소거 효과를 확인하기 위하여 DPPH 분석을 시행한 결과 추출물의 농도가 높을수록 자유기 소거 효과가 증가하는 결과를 보였다 (Fig. 5). 이 결과는 생체 외 (in vitro)에서 고삼 뿌리 추출물의 항산화 물질의 효과를 보여주고 있으며 생체 내 (in vivo)에서의 항산화 효과를 확인하기 위해 Raw 264.7 cell 내에서의 항산화 효과를 측정하였다. 그 결과 실험 농도 중 10

µg/ml ($p=0.01$), 25 µg/ml ($p<0.001$)에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 항산화 효과가 증가하는 것으로 나타났다 (Fig 6). 이 결과는 고삼 뿌리 추출물이 물질 자체도 항산화 효과를 포함하고 있으며, 대식세포 내에서 반응하였을 때도 동일한 반응을 하는 것을 알 수 있었다. 대식세포 이외에도 각 염증 반응과 관련된 특정 기관에서의 항산화 효과를 각각 확인하지는 못 하였으나, 대식세포가 신체 내의 일반적인 염증 반응에 관련되어 있는 것을 고려할 때 고삼 뿌리 추출물이 다양한 기관에서 항산화 물질로서 효과를 보일 것으로 생각된다.

고삼에 대한 연구는 여러 분야에 있어서 활발히 이루어지고 있다. Jin 등¹은 고삼 뿌리의 플라보노이드를 이용하여 쥐의 관절염 모델에서 항염증 효과를 보고하였다. Park 등¹¹은 고삼의 항산화 효과와 NO 생성 억제가 쥐의 뇌허혈 모델에서 신경 보호 효과를 보였다고 하였다. 한의약과 민간요법에서 오랜 기간 사용된 고삼은 항균효과 (antibacterial)와 화상 (antipyrotic), 해열 (antipyretic), 부정맥 (antiarrhythmic), 천식 (antiasthmatic), 궤양 (antiulcerative), 간염치료 (anti-HBV), 항암 (antineoplastic) 효과가 있다고 알려져 있다¹⁰. 본 연구에서 고삼은 염증의 매개 물질인 NO와 PGE₂의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 보였고 대식세포에서 항산화 효과를 보이는 것을 확인하였다. 하지만 고삼에는 많은 종류의 알칼로이드 (alkaloid)와 플라보노이드 (flavonoid) 성분이 함유되어 있고 아직까지 각 성분별에 대한 효과가 자세히 연구되지 않았다. 현재 여러 연구에서 고삼의 다양한 효과에 대한 실험적인 연구가 보고되고 있어 앞으로 고삼에 대한 다양한 의학적인 활용이 가능할 것으로 생각된다.

일반적으로 상재하는 각종 세균이 분비하는 LPS로 인해 정상 세포 장벽은 끊임없이 공격을 받고 있으며, 장벽의 파괴로 다양한 염증 매개 물질이 생성되고, 활성산소 (oxygen radical)와 같은 자유기 (free radical)가 형성되어 조직의 손상

을 일으킨다. 연구의 결과로 고삼 뿌리 추출물에 의한 항염증 효과가 앞에서 설명한 염증 반응의 신호 전달 체계인 NF-κB 경로를 차단함으로써 iNOS와 COX-2의 발현의 조절을 통해 이루어지는 것을 확인할 수 있다. 이는 한의약이나 민간요법에서 여러 염증성 질환에서 경험적으로 사용되고 있는 고삼 뿌리 추출물의 항염증 효과를 실험적으로 확인했고, 새로운 항염증 작용 물질의 개발 가능성을 제시하여 앞으로 좀 더 자세하고 다양한 연구를 가능하게 할 수 있다. 이 연구에서는 고삼 뿌리 추출물 전체를 이용하였으나 추출물은 다양한 알칼로이드와 플라보노이드의 혼합물로 구성되어 각각의 물질에 대한 생리학적 효과를 확인해야 한다. 또한 항염증 효과의 기전이 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것을 확인하였으나 두 단백질의 발현을 조절하는 세포 내의 신호 전달 체계 중 어떤 과정에 관여하는 하는가는 추가적인 연구가 필요하다. 염증 관련 인자 중 NO와 PGE₂만을 분석하였으나 고삼 뿌리 추출물의 염증 반응과 관련된 다른 사이토카인에 대한 억제능력을 검증해야 한다. 또한 고삼 뿌리 추출물의 염증 억제에 대한 추가적인 효과를 확인하기 위해서는 염증 초기에 관여하는 Vascular endothelial growth factor (VEGF)와 thrombospondin (TSP)의 발현에 고삼 뿌리 추출물이 미치는 영향 등 다양한 연구가 필요하다.

결 론

고삼 뿌리 추출물은 LPS와 IFN-γ로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 NO와 PGE₂의 생성 억제를 통해 항염증 효과를 보였으며, 이러한 NO와 PGE₂의 생성 억제는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통해 이루어졌다. 또한 고삼 뿌리 추출물은 물질 자체의 자유기 소거 효과를 가지고 있으며, 대식세포 내에서 항산화 효과를 증가시킨다.

REFERENCES

1. Jin HJ, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of the roots of *Sophora flavescens*. J Ethnopharmacol. 2010;127(3):589-595
2. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. Transpl. Int. 1994;7(Suppl 1):647-649
3. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991;43:109-142
4. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med 1998;25(4-5):434-456
5. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. Gut 2000;47(1):6-9
6. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanooids and tumor progression. Cancer Metastasis Rev 2007;26(3-4):525-534
7. Sarkar D, Saha P, Gamre S, Bhattacharjee S, Hariharan C, Ganguly S, et al. Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- κ B pathway. Int. Immunopharmacol 2008; 8(9):1264-1271
8. Chae SW, Kim JS, Kang KA, Bu HD, Lee Y, Hyun JW, et al. Antioxidant Activity of Jionoside D from *Clerodendron trichotomum*. Biol Pharm Bull 2004; 27(10):1504-1508
9. Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Choi JW, Jung JH, Park SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory effects of *Draconis Resina* in mouse macrophage cells. Kor J Herbology 2008;23(2):179-192
10. Liu XJ, Cao MA, Li WH, Shen CS, Yan SQ, Yuan CS. Alkaloids from *Sophora flavescens* Aiton. Fitoterapia 2010;(in press)
11. Park SJ, Nam KW, Lee HJ, Cho EY, Koo U, Mar W. Neuroprotective effects of an alkaloid free-ethyl acetate extract from the root of *Sophora flavescens* Ait. Against focal cerebral ischemia in rats. Phytomedicine 2009;16(11):1042-1051
12. Zhou H, Lutterodt H, Cheong Z, Yu LL. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* roots. J Agric Food Chem 2009;57(11):4580-4585
13. Hong MH, Lee JY, Jin DH, Go HY, Jang BH, Shin YC, et al. *Sophora flavescens* Aiton inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of the NF kappaB/IkappaB signal pathway in human mast cell line (HMC-1). Toxicol in Vitro 2009;23(2):251-258
14. Chae HS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Lee YS, Jang HJ, et al. 5-Hydroxytryptophan acts on the mitogen-activated protein kinase extracellular-signal regulated protein kinase pathway to modulate cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 cells. Biol Pharm Bull 2009;32(4):553-557
15. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Semin Immunol 2004;16:3-9
16. Mandrekar P, Szabo G. Signaling pathways in alcohol-induced liver inflammation. J Hepatol 2009;50(6): 1258-1266
17. Weisz A, 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;316:209-215
18. Min HY, Song SH, Lee B, Kim S, Lee SK. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by antofine and its analogues in RAW 264.7 macrophage cells. Chem Biodivers 2010;7(2):409-414
19. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of Nitric oxide: Insight into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanism of nitric oxide. Free Radic Biol 1998;25(4-5):434-456
20. Kim NK, Kim MH, Yoon CS, Choi SW. Studied on

- the Anti-inflammatory activity of Paulownia coreana uyeki leaf extract. J Soc Scientists Korea 2006; 32(4):241-247
21. Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. FEBS Lett 2004;569 (1-3):321-326
22. Kim RG, Shin KM, Kim YK, Jeong HJ, Ha JH, Choi JW, et al. Inhibition of methanol extract from the aerial parts of Saururus chinensis on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production from murine macrophage RAW 264.7 cells. Biol Pharm Bull 2003;26(4):481-486
23. Ludvigsson J. Intervention at diagnosis of type I diabetes using either antioxidants or photopheresis. Diabetes Metab Rev 1993;9(4):329-336
-