

어성초 추출물이 지질다당질과 인터페론감마로 활성화된 Raw 264.7 Cells에서의 항염증 효과

¹중앙대학교 의과대학 피부과학교실, ²(주)바이오랜드 생명과학연구소

조완익¹ · 김현규¹ · 박주희¹ · 박귀영¹ · 임윤영¹ · 김영희² · 김기호² · 김형미¹ · 이갑석¹ · 김범준¹ · 서성준¹
김명남¹ · 홍창권¹

Anti-Inflammatory Effect of *Houttuynia Cordata* Thunb in Activated Raw 264.7 Cells Activated with Lipopolysaccharide and Interferon Gamma

Wan Ik Cho¹, Hyun Kyu Kim¹, Juhee Park¹, Kui Young Park¹, Yoon Young Lim¹, Young Heui Kim², Ki Ho Kim², Hyung Mi Kim¹, Kapsok Li¹, Beom Joon Kim¹, Seong Jun Seo¹, Myeung Nam Kim¹ and Chang Kwun Hong¹

¹Department of Dermatology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, ²R&D Center, Bioland, Cheonan, Korea

Background: *Houttuynia cordata* has long been used in traditional oriental medicine for the treatment of inflammatory disease. In the present study, we investigated the anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* extracts on Raw 264.7 cells, which is activated with lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ).

Methods: We treated LPS-and IFN- γ -activated murine macrophage Raw 264.7 cells with extracts of *Houttuynia cordata* and measured the production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂), and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, and pro-inflammatory cytokines (Interleukin [IL]-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, tumor necrosis factor- α , regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) in activated Raw 264.7 cells after treatment with *Houttuynia cordata* extracts.

Results: NO formation by activated Raw 264.7 cells was reduced in response to *Houttuynia Cordata* in a dose-dependent manner. Formation of PGE₂, a final product of the COX pathway was reduced by *Houttuynia cordata* extracts and reduction in COX-2 expression was proportional to the reduction in PGE₂. The expression of proteins, iNOS and COX-2 decreased with increasing concentration of *Houttuynia cordata* extracts. The related pro-inflammatory cytokines did not decrease in the cells treated with *Houttuynia cordata* extracts.

Conclusion: *Houttuynia Cordata* extracts suppressed the production of NO and PGE₂ and decreased the expression of iNOS and COX-2. It has potential for the treatment of inflammatory diseases. Further studies are needed to elucidate the effects of *Houttuynia Cordata* extracts on the production of inflammatory cytokines. (**Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2012;32:43-50**)

Key words: Cyclooxygenase-2; *Houttuynia cordata*; Inducible nitric oxide synthase

서 론

어성초(*Houttuynia Cordata* Thunb)는 우리나라에서는 삼백초과(Saururaceae)에 속한 다년생 본초인 약모밀의 개화기 지상부를 말하며 앞에서 생선 비린내가 나기 때문에 붙여진 이름

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008231)의 지원에 의해 이루어진 것임.

책임저자 : 김범준, 서울시 동작구 흑석동 224-1

중앙대학교병원 피부과, 우: 156-755

Tel: 02) 6299-1525, Fax: 02) 823-1049

E-mail: beomjoon@unitel.co.kr

투고일: 2011년 2월 7일, 심사일: 2012년 2월 6일

게재확정일: 2012년 2월 10일

Copyright © 2012 The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology

이다. 어성초에는 decanoyl acetaldehyde, methyl-nonyl ketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde, capric acid, linalool, camphene, d-limonene, α -pinene 등이 함유되어 있다.^{1,2)} 현재까지의 연구에 의하면 어성초의 추출물은 항균작용, 항바이러스작용, 항염증작용 및 항알레르기작용, 항산화작용 등이 있음이 밝혀졌다. 또한 임상적으로 한의학에서는 기관지염, 폐렴, 편도선염 등의 호흡기 염증성 질환 및 만성 피부질환에 사용되고, 이뇨, 소염 등의 목적으로 사용되기도 한다.³⁻⁶⁾

대식세포는 외부 자극에 의한 염증반응에서 종양괴사인자 알파(tumor necrosis factor- α), 인터루킨-6, 인터루킨-1베타와 같은 염증성 시토카인의 발현이 유도되고, 유발가능 산화질소합성효소(inducible nitric oxide synthase)와 시클로옥시게나아제-2(cyclooxygenase-2)에 영향을 받는 유전자의 발현을 자극

하여 산화질소 및 프로스타글란딘 E₂ (prostaglandin E₂) 등의 염증인자를 생성한다.⁷⁻¹¹⁾

일반적으로 유발가능 산화질소합성효소에 의해 생성된 산화질소는 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다. 그러나 과도하게 생성된 산화질소는 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생성을 촉진하여 염증을 악화시킨다.^{12,13)} 또 다른 염증인자인 프로스타글란딘 E₂는 통증과 발열에 주로 관여하는 염증 매개체로서 염증반응과 면역 반응에 관여하며, 혈관신생을 촉진하는 등 암 발생에도 관여하고 있다. 이러한 역할을 가진 프로스타글란딘 E₂는 염증반응이 시작되면서 생성되는 시클로옥시게나아제-2에 의해 발현된다.¹⁴⁾

염증반응에 관여하는 매개 물질은 많은 화학적 반응과 흡연, 음주, 대기오염 등 외적인 요인에 의해 생성되며, 이는 세포 내에서 분화, 성장, 생존, 노화에 영향을 준다. 따라서 최근 많은 연구자들에 의해 새로운 천연물의 항산화 및 항염증 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾

이에 저자들은 어성초 추출물의 염증성 질환에 대한 활용가능성을 확인하기 위하여 지질다당질(lipopolysaccharide)과 인터페론감마로 자극된 대식세포주인 Raw 264.7 cell에서 염증 지표인 산화질소 및 프로스타글란딘 E₂의 생성과 그 생성효소인 유발가능 산화질소합성효소, 시클로옥시게나아제-2의 단백질과 리보핵산 발현 및 종양괴사인자 알파, 인터루킨-1, 인터루킨-6 등의 염증성 시토카인 분비에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 어성초 추출물 제조 및 세포 배양

어성초는 어두운 곳에서 수분이 제거될 때까지 건조하였다. 건조된 어성초 잎과 줄기 100 g을 70% 에탄올을 이용하여 24시간 동안 두 번 추출하였다. 70% 에탄올로부터 추출된 추출물은 여과지를 이용하여 여과한 후 60°C에서 에탄올을 증발시켜 6% 수율로 추출물을 얻었다.

Raw 264.7 cell은 Penicillin/streptomycin 100 unit/mL와 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum)이 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium 배지(WelGENE Inc., Daegu, Korea)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다. Raw 264.7 cell을 1×10⁶/mL 농도로 24 well plate에 각각 분주하고 무혈청 배지로 교환한 후, 지질다당질 100 ng/mL, 인터페론감마 10 ng/mL (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA)와 어성초 추출물을 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL의

농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

2. 산화질소 생성 측정

배양액에서의 산화질소 생성은 산화질소의 산화물인 아질산의 측정을 통해 평가하였다. Griess 분석 방법을 이용하였는데, Raw 264.7 cell에 어성초 추출물을 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL 농도로 처리하고 96 well plate에 세포 배양 상등액과 Griess 시약(1% 설파닐아마이드, 5% 인산, 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine 혼합용액)을 1 : 1로 혼합하여 넣고 상온에서 5분 동안 반응시킨 후 ELISA microplate reader (SoftMax Pro5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 세포독성 측정

어성초 추출물의 세포에 대한 독성의 측정은 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 측정으로 분석하였다. 이는 MTT가 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의해 환원되어 포르마잔(formazan) 결정체로 전환되는 것을 측정하는 것으로, 시료를 농도별로 처리하고 세포 배양 24시간이 지난 후 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 아질산나트륨(Sodium nitrite), 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 포르마잔을 ELISA microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 프로스타글란딘 E₂ 및 염증성 시토카인 측정

대식세포에서 생성되는 프로스타글란딘 E₂의 양은 프로스타글란딘 E₂ ELISA kit (R&D system, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하고 항염증효과를 확인하였다. 프로스타글란딘 E₂ 표준물질은 0, 39, 78, 156, 312, 625, 1,250, 2,500 pg/mL를 이용하였고, 실험군과 대조군은 보정 완충제(calibration buffer)를 이용하여 1/3로 희석해서 사용하였다. 준비된 표준물질과 실험군, 대조군을 96 well plate에 150 µL씩 분주하고, 프로스타글란딘 E₂ 마우스 단세포군 항체를 50 µL씩 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 1시간 동안 반응 후, 프로스타글란딘 E₂ 접합체(conjugate) 50 µL를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 반응하고, 세척 완충제(wash buffer) 400 µL를 이용하여 4번 세척하였다. 기질용액(substrate solution) 200 µL를 첨가하여 빛을 차단하고 상온에서 30분 동안 반응하고 정지용액(stop solution) 50 µL를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

염증성 시토카인의 측정은 Beadlyte[®] mouse Multi-Cytokine Detection System (Millipore, St. Charles, MO, USA)을 이용한

Luminex 200 system (Luminex, Austin, TX, USA)을 통해서 확인하였다. MiraiBio[®] (MiraiBio, Alameda, CA, USA)의 MasterPlex CT[™]과 MasterPlex QT[™] 프로그램으로 median fluorescent intensity와 calculate 농도를 모아서 이용하였다. 측정된 시토카인은 인터루킨-1알파(6.9~5,000 pg/mL), 인터루킨-1베타(8.2~6,000 pg/mL), 인터루킨-4 (8.2~6,000 pg/mL), 인터루킨-6 (9.6~7,000 pg/mL), 인터루킨-10 (6.9~5,000 pg/mL), 인터루킨-12 (p40) (11~8,000 pg/mL), 종양괴사인자 알파(6.9~5,000 pg/mL), regulated on activation normal T-cell expressed and secreted, 4.1~3,000 pg/mL이다. 모든 시약과 프로토콜은 이 프로그램에서 제공되는 것으로 사용하였다. 회석배율 3으로 연속적으로 회석한 7가지의 표준물질을 이용하여 MasterPlex QT[™]에서 5-parameters로 표준곡선을 작성하였다.

5. 역전사-중합효소 연쇄반응

Raw 264.7 cell에 어성초 추출물을 1, 5, 10, 25, 50 μ g/mL 농도로 처리하고 용해 완충제(lysis buffer)를 이용하여 세포로부터 총 리보핵산을 준비하였다. 총 리보핵산은 흡광도 260 nm에서 정량하여 5 μ g 사용하여 상보성 데옥시리보핵산(cDNA)을 합성하였다. 상보성 데옥시리보핵산은 변성된(denaturation) 총 리보핵산(5 μ g)을 oilgo-dT, 역전사효소(reverse transcriptase), 염화마그네슘, 염화칼륨, 리보핵산 가수분해효소 억제제, 디옥시리보뉴클레오타이드가 포함되어 있는 완충제에 넣어서 총 20 μ L이 되도록 하고 42°C, 1시간 동안 배양하였다. 상보성 데옥시리보핵산은 특정 유전자에 대한 primer인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (sense: 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3', anti-sense: 5'-GGTCCCTCAGTGTAGCCCAAG-3'), 유발가능 산화질소합성효소(iNOS, sense: 5'-CATGGCTTGCCCCTGGAAGTTTCTCTTCAAAG-3', anti-sense: 5'-GCAGCATCCCCTCTGATGGTGCCATCG-3'), 시클로옥시게나아제-2 (sense: 5'-GGAGAGACTATCAAGATAGTGATC-3', anti-sense: 5'-A TGGT CAGTAGACTTTTACAGCTC-3')를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. Taq 데옥시리보핵산 중합효소(Takara Bio Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 총 30주기를 시행하였고, 각 주기는 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 30초로 구성하였다. 총 리보핵산의 양은 RNeasy Kit (Quiagen Co., Hilden, Germany)을 이용하여 준비하였고 260 nm에서의 흡광도를 통해 확인하였다.

6. Immunoblot analysis

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 ethylenediaminetetraacetic acid를 함유하는 완충제를 사용

하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000 Xg로 4°C에서 30분간 원심 분리하여 잔해 물질을 제거하였다. 정량한 단백질 10 μ g을 취하여 10% SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 폴리비닐리덴 불화물(polyvinylidene fluoride) 막으로 이동시켰다. 차단 후 유발가능 산화질소합성효소(BD biosciences, San Jose, CA, USA), 시클로옥시게나아제-2 (Santa Cruz biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 1차 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG를 반응시키고 증강 화학발광기법(Enhanced chemiluminescence) 검출 시약(Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, USA)을 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

7. 통계적 검증

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 mean $\pm$ standard deviation을 그래프로 표시하였고, ANOVA test를 통해 95% 수준($P < 0.05$)에서 통계적 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 산화질소 생성 감소

지질다당질과 인터페론감마로 유도된 Raw 264.7 cell에서 시료의 산화질소 생성을 확인하기 위하여 어성초 추출물을 1, 5, 10, 25, 50 μ g/mL의 농도로 세포에 처리하여 각 농도별로 생성되는 산화질소의 양을 24시간 반응하여 측정하였다. 세포에 지질다당질과 인터페론감마를 처리한 군에서는 대조군에 비교하여 산화질소의 생성이 증가하였으며, 어성초 추출물을 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 통계적으로 유의하게 산화질소 생성의 저하를 나타내었다(Fig. 1).

2. Raw 264.7 cell에 대한 세포독성

지질다당질과 인터페론감마로 유도된 Raw 264.7 cell에서 산화질소 생성의 감소가 시료의 세포독성으로 인한 것인지를 확인하기 위하여 어성초 추출물을 같은 농도로 처리하고 24시간 후 MTT assay로 세포 생존을 확인하였다. 실험 결과 실험군에서 첨가한 시료의 농도가 증가해도 대조군에 비해 세포의 생존에 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

3. 프로스타글란딘 E2 생성 저해능

대식세포에 의해 생성되는 프로스타글란딘 E2를 측정한 결과 대조군에 비교하여 지질다당질과 인터페론감마를 처리한 실험군 중 어성초 추출물을 첨가하지 않은 군에서 프로스타글란딘 E2의 생성이 증가되는 것을 확인하였다. 어성초 추출물을 농도별로 처리한 실험군 중 10 μ g/mL 이상의 농도에

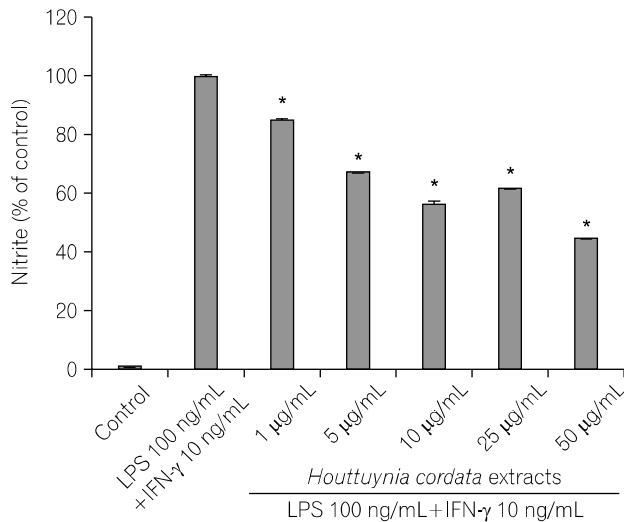


Fig. 1. Inhibitory effect of *Houttuynia Cordata* extracts at different concentrations for production of Nitric oxide. The values represent mean±standard deviation of three independent experiments (* $P < 0.001$). LPS = lipopolysaccharide; IFN- γ = interferon- γ .

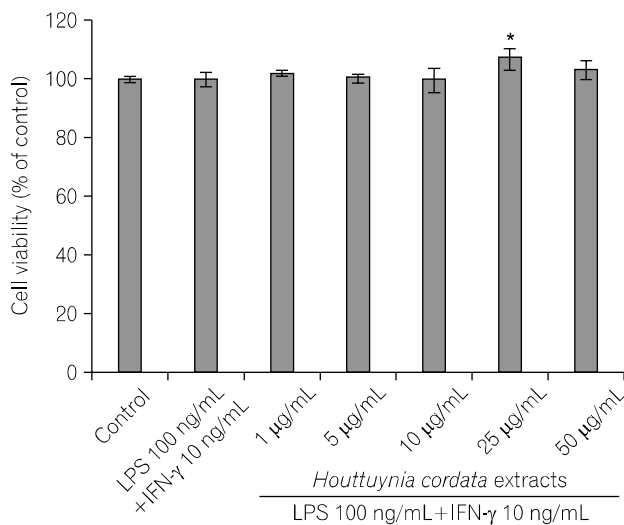


Fig. 2. The cell viability of *Houttuynia Cordata* extracts at different concentrations. Values represent mean±standard deviation of three independent experiments (* $P < 0.05$). LPS = lipopolysaccharide; IFN- γ = interferon- γ .

서 통계적으로 유의하게 프로스타글란딘 E2가 저하되었다 (Fig. 3).

4. 염증성 시토카인의 생성 저해능

대조군에 비교하여 지질다당질과 인터페론감마를 처리한 군에서는 인터루킨-1알파, 인터루킨-1베타, 인터루킨-6, 인터루킨-10, RANTES, 종양괴사인자 알파의 생성이 유의하게 증가하였고, 인터루킨-4, 인터루킨-12의 변화는 통계적 유의성

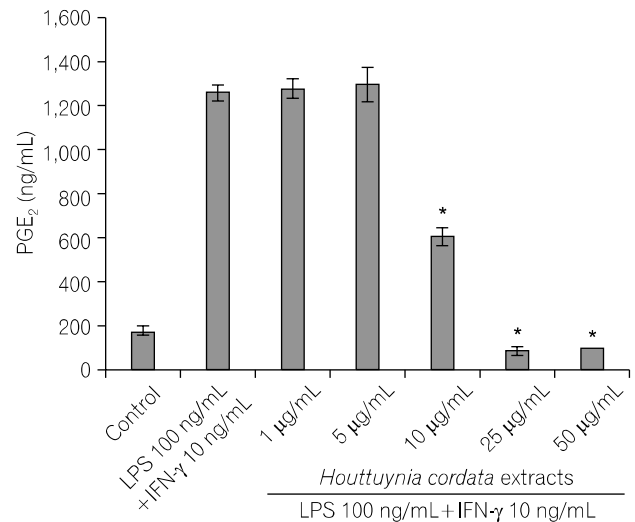


Fig. 3. Inhibitory effect of *Houttuynia Cordata* extracts at different concentrations for synthesis of PGE₂. The experiment was performed as described in the manufacturer's instruction and conducted three times (* $P < 0.001$). PGE₂ = prostaglandin E₂; LPS = lipopolysaccharide; IFN- γ = interferon- γ .

을 보이지 않았다. 인터루킨-1알파의 경우에는 10, 25 μ g/mL의 어성초 추출물을 처리하였을 때 지질다당질과 인터페론감마로 유도된 인터루킨-1알파가 유의하게 감소되었다. 그러나 인터루킨-1베타, 인터루킨-6, 인터루킨-10, RANTES, 종양괴사인자 알파의 경우에는 유도된 시토카인의 감소가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

5. 유발가능 산화질소합성효소 및 시클로옥시게나아제-2의 리보핵산과 단백질 발현 저해

지질다당질과 인터페론감마를 처리하고 시료를 농도 별로 처리한 실험군에서 유발가능 산화질소합성효소와 시클로옥시게나아제-2의 리보핵산의 발현은 어성초 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하였다(Fig. 5A). 유발가능 산화질소합성효소와 시클로옥시게나아제-2의 단백질 발현은 지질다당질과 인터페론감마 처리 시에는 그 양이 증가되었으나, 어성초 추출물을 농도별로 처리한 실험군에서 그 양이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5B). 이는 지질다당질과 인터페론감마를 처리하였을 때 프로스타글란딘 E2의 생성이 감소된 결과와 일치함을 확인할 수 있다.

고 찰

본 연구는 어성초로 추출물이 지질다당질과 인터페론감마로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표들에

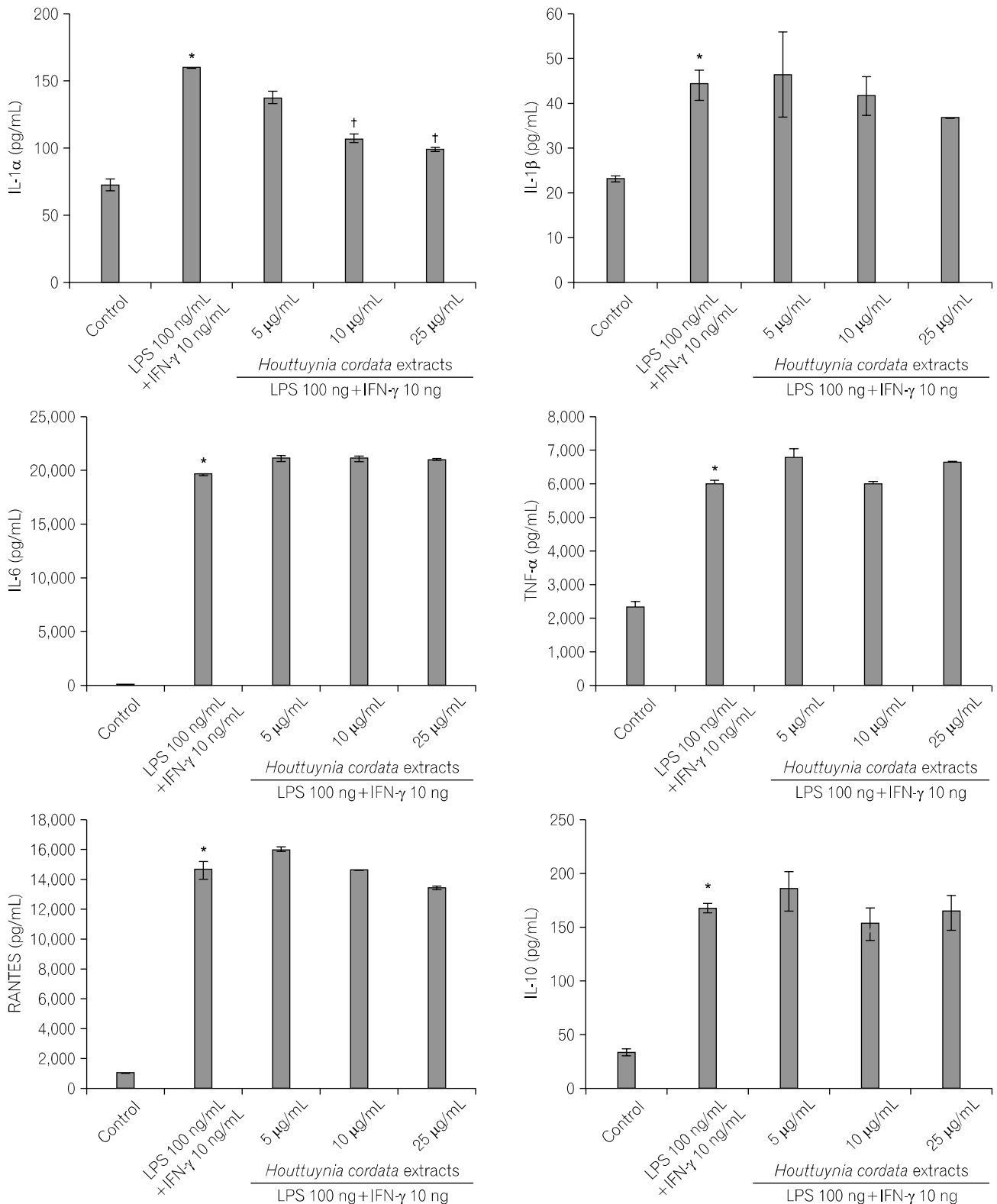


Fig. 4. Inhibitory effect of *Houttuynia Cordata* extracts at different concentrations on the LPS induced production of pro-inflammatory cytokines including IL-1 α , IL1 β , IL-6 and TNF- α . Values represent mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments (*significant as compared to control, $P < 0.05$; [†]significant as compared to LPS with IFN- γ alone, $P < 0.05$). IL = interleukin; TNF- α = tumor necrosis factor- α ; RANTES = regulated on activation normal T-cell expressed and secreted; LPS = lipopolysaccharide; IFN- γ = interferon- γ .

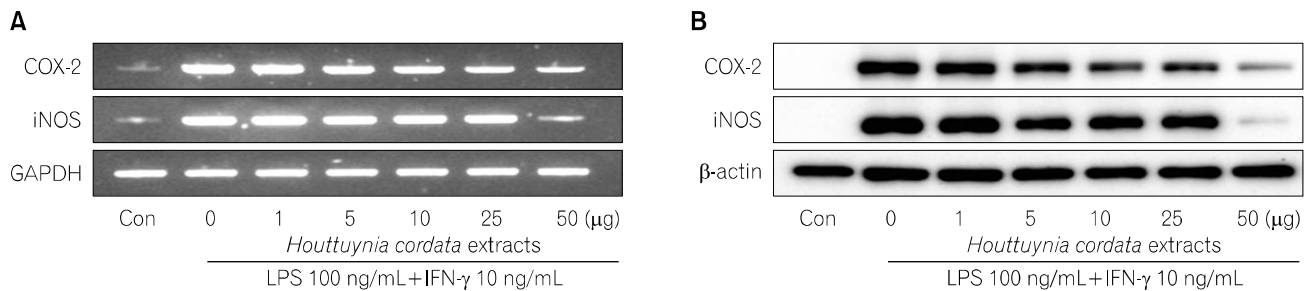


Fig. 5. Inhibitory effect of *Houttuynia Cordata* extracts on the LPS-induced iNOS and COX-2 RNA and protein expressions in Raw 264.7 cells. (A) The expression of iNOS RNA and COX-2 RNA was decreased with the elevation of *Houttuynia Cordata* extracts concentration. (B) The expression of iNOS and COX-2 proteins was decreased along with the elevated concentration of *Houttuynia Cordata* extracts. COX-2 = cyclooxygenase-2; iNOS = inducible nitric oxide synthase; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; con = control; LPS = lipopolysaccharide; IFN- γ = interferon- γ .

미치는 영향을 평가하여 어성초 추출물의 항염증효과와 면역체계에 미치는 영향을 알아보았다.

다양한 염증성 질환에서 스테로이드와 비스테로이드성 항염증제는 주된 치료제로 사용되어 왔다. 특히 스테로이드 제제는 좋은 항염증 효과에도 불구하고 만성적인 염증성 질환에서 부작용 발생의 가능성으로 인해 장기간의 사용이 제한적이다. 최근 이러한 제제를 대체할 수 있는 성분을 개발하기 위하여 천연물로부터 유효 성분을 얻으려는 노력들이 시도되고 있다. 녹차, 고삼, 모려, 어성초 등 다양한 천연물이 연구되고 있다. 본 연구에 사용된 어성초의 추출물은 항균작용, 항염증작용, 항산화작용 및 항알레르기작용 등에 대하여 연구된 바 있고 어성초의 퀘세틴(querctetin)이 항염효과를 나타내는 주된 유효성분으로 알려져 있다.^{3-6,19,20} 기존에 보고된 항염증작용에 대한 연구는 동물 모델에 염증반응을 일으켜 어성초 추출물을 주사하여 염증의 호전 정도를 관찰하여 항염효과를 확인하였다. 반면에 본 연구에서는 염증을 유발하는 시토카인과 단백질을 생성하여 염증반응에서 중요한 역할을 하는 대식세포를 이용하여 염증매개 시토카인과 단백질을 직접적으로 확인하였다는 것이 기존의 연구와 차이점이다.

Raw 264.7 cell은 쥐의 대식세포로 지질다당질과 인터페론 감마에 의해 유발가능 산화질소합성효소 유전자가 특징적으로 활성화되어 유발가능 산화질소합성효소의 발현을 유도하는 특징을 갖는다.

산화질소는 산화질소합성효소(nitric oxide synthase)에 의해 L-arginin으로부터 생성되는 염증반응 조절인자 중 하나로, 중금속과 쉽게 반응하고 혈관확장, 신경전달체계, 항균물질, 면역조절 등의 생체 내 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 산화질소합성효소는 세포 내에서 2차 신호전달자로서 칼슘이나 칼모듈린(calmodulin)에 의존적인 형태인 구성 산화

질소합성효소와 칼슘에 비의존적으로 대식세포나 혈관내피 세포가 활성화되거나 지질다당질과 같은 세균의 내독소나 다양한 시토카인에 의해 유도되는 유발가능 산화질소합성효소가 있다. 유발가능 산화질소합성효소는 지질다당질, 인터페론감마, 인터루킨-1 및 종양괴사인자 알파 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포, 심근세포 등에서 다량의 산화질소를 생성한다.^{17,19)} 생체 내 고농도의 산화질소는 숙주세포의 파괴, 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 본 연구에서는 Raw 264.7 cell에서 어성초 추출물의 산화질소 생성 저해를 확인하기 위하여 1, 5, 10, 25, 50 μg/mL 농도로 세포에 처리하여 생성되는 산화질소의 양을 측정하였다. 지질다당질과 인터페론감마를 처리한 군에서는 대조군에 비교하여 산화질소 생성량이 증가하였으며, 어성초 추출물을 처리한 군에서는 유의하게 산화질소의 생성이 감소하였다. 또한 실험군에서 유발가능 산화질소합성효소의 발현은 어성초 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하였다.

시클로옥시게나아제는 중요한 생물학적 매개체인 프로스타글란딘, 프로스타사이클린(prostacyclin), 트롬복산(thromboxane) 등을 포함하는 프로스타노이드(prostanoid) 형성에 관여하는 효소이다. 시클로옥시게나아제는 시클로옥시게나아제-1과 시클로옥시게나아제-2로 분류된다. 시클로옥시게나아제-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용한다. 염증반응에 있어서 시클로옥시게나아제-2는 활성화된 대식세포에 발현되어 염증반응을 매개하는 프로스타글란딘 합성에 관여한다.^{21,22)} 다수의 염증억제 약품들의 작용기전은 프로스타글란딘 합성 억제를 나타내며 이는 시클로옥시게나아제-2의 생성 및 활성 억제에 의한 것이다.²³⁾ 프로스타글란딘 E2는 시클로옥시게나아제-2

에 의해 생성되며 주로 비만세포나 대식세포에 의해 분비되어 염증 부위의 부종, 통증, 감각 과민을 초래하는 히스타민, 산화질소 등과 더불어 혈관 투과성을 증가시킨다.¹⁴⁾ 본 연구에서는 지질다당질과 인터페론감마 자극에 의한 Raw 264.7 cell의 프로스타글란딘 E2 생성을 확인하였으며, 어성초 추출물을 처리 하였을 때 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 시료의 농도가 증가함에 따라 프로스타글란딘 E2의 생성이 통계적으로 유의 있게 감소하였다(Fig. 3). 또한 웨스턴블롯 검사를 시행하였으며 세포질 내에서의 시클로옥시게나아제-2 단백질 발현의 감소를 확인하였다(Fig. 5).

또한 본 연구에서는 염증반응에 관여하는 다양한 염증성 시토카인의 발현을 알아보았는데 지질다당질과 인터페론감마는 염증 매개성 시토카인의 수치를 유의하게 증가시켰으나 어성초 추출물을 처리하였을 때 인터루킨-1알파를 제외한 다른 시토카인의 생성 억제에 대한 효과는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과를 바탕으로 어성초 추출물의 인터루킨-1알파에 대한 선택적 억제가 항염증 효과의 기전 중 하나로 생각해 볼 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 어성초 추출물이 세포독성을 나타내지 않는 낮은 농도까지(25 $\mu\text{g/mL}$) 처리한 Raw 264.7 cell에서 시토카인 분석이 시행되었으므로, 세포독성을 나타내지 않는 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 고농도 어성초 추출물을 처리하였을 때 나타나는 항염증 효과에 대한 연구가 추가적으로 시행되어야 할 것으로 생각한다.

본 연구의 결과를 통하여 어성초 추출물이 지질다당질과 인터페론감마로 유도된 염증 모델에서 산화질소, 프로스타글란딘 E2 생성 및 유발가능 산화질소합성효소, 시클로옥시게나아제-2 단백질 발현을 저해함으로써 유의한 항염증 효과가 있음을 확인하였다. 최근에 보고된 한 연구에서 지질다당질에 의해 유도된 쥐의 복강의 대식세포를 이용하여 어성초 추출물의 시클로옥시게나아제-2 리보핵산 발현 억제와 항염증 효과를 확인한 바 있으나,²⁴⁾ 이에 추가적으로 프로스타글란딘 E2의 생성 억제와 유발가능 산화질소합성효소 리보핵산 발현 억제에 따른 산화질소의 형성 억제를 확인하였고, 염증성 시토카인의 변화도 평가하였다는 것이 이전 연구와 차이점이다. 그러나 염증반응과 관련된 사토카인의 억제 능력 검증에 있어서는 인터루킨-1알파 이외의 시토카인은 통계적으로 유의한 억제반응을 보이지 않아 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

어성초에 대한 연구는 여러 분야에 있어서 활발히 이루어지고 있다. 하지만 많은 종류의 물질이 함유되어 있는 어성초의 각 성분에 대한 효과는 자세히 연구되지 않았다. 본 연구는 기존에 시행되어 왔던 섬유아세포나 암세포주를 중심으로 이루어져 왔던 연구들에^{6,25)} 비해 더 진보된 형태의 혈구 내 성분인 대식세포주에서 항염증 효과를 확인하였다. 이

는 한방이나 민간요법에서 여러 염증성 질환에서 경험적으로 사용되고 있는 어성초 추출물의 항염증 효과를 실험적으로 확인하였다는 것에 의의가 있으며, 향후 본 연구에서 사용한 대식세포뿐만 아니라 인체의 다양한 세포주에 대한 연구를 통해 어성초의 다양한 의학적인 활용 가능성을 모색할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구에서는 어성초 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 다양한 실험을 진행하였다. 실험결과 유효 농도인 1 $\mu\text{g/mL}$ 부터 50 $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포 독성을 보이지 않음을 생체 외(in vitro)에서 확인하였다. 또한 어성초 추출물 처리에 따른 유발가능 산화질소합성효소, 시클로옥시게나아제-2의 발현 감소와 함께 산화질소, 프로스타글란딘 E2의 생성이 억제되었다.

참 고 문 헌

- 1) Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2003;32:1053-8.
- 2) Chung CK, Ham SS, Lee SY, Oh DH, Choi SY, Kang IJ, et al. Effect of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rat fed high fat diet. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1999;28:205-11.
- 3) Choi YH, Kim EY, Park KY, Rhee SH, Lee WH. Antimutagenic effects of the juice and boiling water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1994;23:916-21.
- 4) Chou SC, Su CR, Ku YC, Wu TS. The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2009;57:1227-30.
- 5) Kim GS, Kim DH, Lim JJ, Lee JJ, Han DY, Lee WM, et al. Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen salmonella within the RAW 264.7 macrophage. Biol Pharm Bull. 2008;31:2012-7.
- 6) Lee JS, Kim IS, Kim JH, Kim JS, Kim DH, Yun CY. Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response. J Ethnopharmacol. 2008;117:34-40.
- 7) Kumar V, Abbas A, Fausto N. Pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders; p. 68-73.
- 8) Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. Transpl Int. 1994;7 Suppl 1:S647-9.
- 9) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991;43:

- 109-42.
- 10) Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol*. 2003;139:11-20.
- 11) Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 2003;37:355-61.
- 12) Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004;75:639-53.
- 13) Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*. 1999;20:1945-52.
- 14) Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE₂ pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour micro-environment. *Carcinogenesis*. 2009;30:377-86.
- 15) Harasstani OA, Moin S, Tham CL, Liew CY, Ismail N, Rajajendram R, et al. Flavonoid combinations cause synergistic inhibition of proinflammatory mediator secretion from lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Inflamm Res*. 2010;59:711-21.
- 16) Jung IH, Jo IJ, Park C, Choi YH, Park DI. Antiproliferative effect of *Houttuynia cordata* Thunb was associated with the inhibition of cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma cells. *Korean J Oriental Physiology and Pathology*. 2006;20:690-6.
- 17) Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:434-56.
- 18) Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, et al. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-dia-rylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem*. 1997;40:1347-65.
- 19) Kim HJ, Kim J, Kim SJ, Lee SH, Park YS, Park BK, et al. Anti-inflammatory effect of quercetin on picryl chloride-induced contact dermatitis in BALB/c mice. *Lab Anim Res*. 2010;26:7-13.
- 20) Lu HM, Liang YZ, Yi LZ, Wu XJ. Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. *J Ethnopharmacol*. 2006;104:245-9.
- 21) Prasit P, Riendeau D. Chapter 21. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 1997;32:211-220.
- 22) Lazer ES, Sorcek R, Cywin CL, Thome D, Possanza GJ, Graham AG, et al. Antiinflammatory 2-benzyl-4-sulfonyl-4H-isoquinoline-1,3-diones: novel inhibitors of COX-2. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8:1181-6.
- 23) Coruzzi G, Venturi N, Spaggiari S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Biomed*. 2007;78:96-110.
- 24) Li W, Zhou P, Zhang Y, He L. *Houttuynia cordata*, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*. 2011;133:922-7.
- 25) Tang YJ, Yang JS, Lin CF, Shyu WC, Tsuzuki M, Lu CC, et al. *Houttuynia cordata* Thunb extract induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2009;22:1051-6.