



## 운목향 70% 에탄올 추출물의 항염증 및 면역조절에 대한 효과

김민선\* · 김남석\* · 권진\*\* · 김하림\* · 이다영\* · 오미진\*\*\* · 김홍준\*\*\*\* · 이창현\*\*\*\* · 오찬호\*†  
\*우석대학교 식품생명공학과, \*\*한국복지대학교 의료보장구과, \*\*\*한국식품연구원, \*\*\*\*우석대학교 한의예과

### Anti-inflammatory and Immune Regulatory Effects of *Aucklandia lappa* Decne 70% Ethanol Extract

Min Sun Kim\*, Nam Seok Kim\*, Jin Kwon\*\*, Ha Rim Kim\*, Da Young Lee\*, Mi Jin Oh\*\*\*, Hong Jun Kim\*\*\*\*, Chang Hyun Lee\*\*\*\* and Chan Ho Oh\*†

\*Department of Food Biotechnology, Woosuk University, Wanju 55338, Korea.

\*\*Department of Prosthetics and Orthotics, Korea National University of Welfare, Pyeongtaek 17738, Korea.

\*\*\*Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea.

\*\*\*\*Department of Korean Medicine, Woosuk University, Wanju 55338, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** This present study was conducted to evaluate the anti-inflammatory and immune regulatory effects of *Aucklandia lappa* Decne (AL).

**Methods and Results:** We measured cytotoxicity, nitric oxide (NO) content, mRNA expression (iNOS, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ), protein expression (iNOS, COX-2, and I $\kappa$ B- $\alpha$ ) and phagocytic activity in RAW264.7 cells. Male BALB/c mice were fed 100 mg/kg AL (*Aucklandia lappa* Decne 70% ethanol extract) and 250 mg/kg AL for 4 weeks; thereafter, we observed B/T or CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation change, and expression patterns of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes by immunohistochemical staining in mouse splenocytes and/or thymocytes. To determine the experimental concentration of AL, cell viability was measured by MTT assay and tested at 12.5  $\mu$ g/ml or less. AL inhibited the levels of NO, lymphokine production (IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ), and mRNA (iNOS, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) and protein (iNOS, and COX-2) expression. Additionally, the levels of I $\kappa$ B- $\alpha$ , phagocytic activity, and splenic and thymic T lymphocytes, especially T<sub>H</sub> and T<sub>C</sub> cells were significantly increased in AL administered mice. The immuno-reactive density of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes was stronger in AL groups than in the normal group. AL stimulated NO, iNOS, and COX-2, and regulated IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and I $\kappa$ B- $\alpha$  in macrophages treated with LPS (lipopolysaccharide). In addition, AL increased the phagocytic activity of macrophages and the immunity of mouse T (T<sub>H</sub>, and T<sub>C</sub>) cells.

**Conclusions:** These results suggested that AL might show anti-inflammatory activity via the suppression of various inflammatory markers and immuno-regulatory activity.

**Key Words:** *Aucklandia lappa* Decne, Anti-inflammatory Activity, Nitric Oxide, Phagocytic Activity, Protein Expression

#### 서 언

운목향 (*Aucklandia lappa* Decne)은 목향의 이명으로서 국 화과에 속한 다년생 초본인 당목향, 청목향, 토목향 뿌리에서 기원하며 성미는 무독(無毒), 신고(辛苦), 온(溫)하고 작용 부위는 간(肝), 비(脾), 폐(肺)로 알려져 있으며 한의학에서

는 설사, 구토, 호흡기 질병 치료 등에 한약재로서 널리 사용되고 있다 (Jeon *et al.*, 2005). 운목향은 sesquiterpene 계통을 약 1-2% 함유하고 있고 sesquiterpene lactone계 화합물인 costunolide, dehydrocostuslactone, alantolactone, isoalantolactone, saussureolactone, polyene alcohols, lignan, alkaloid 및 tannin (Kang *et al.*, 1999) 등이 함유된 것으로 보고되고 있다.

†Corresponding author: (Phone) +82-63-290-1431 (E-mail) choh@ws.ac.kr

Received 2017 October 30 / 1st Revised 2017 December 7 / 2nd Revised 2018 January 9 / 3rd Revised 2018 January 16 / Accepted 2018 January 22

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Costunolide는 항염증 작용 (Pae *et al.*, 2007), iNOS의 생성 억제작용 (Matsuda *et al.*, 2003), dehydrocostuslactone은 CDK2 활성화저해 (Admas, 2001), 조직암의 세포증식억제 (Bocca *et al.*, 2004)를 유도함으로써 항암작용 등 약리작용이 있음이 보고되었다.

염증과 면역은 매우 깊은 관련이 있다. 염증은 감염 및 상처, 면역 등의 외부자극에 의해 유도되는 과정으로 신체 방어 기전 중 하나이며 손상 부위를 복구시키는 역할도 한다. 외부 자극이 가해지면 대식세포가 활성화되어 염증매개물질을 분비하고 세균이나 바이러스 등을 인지하여 탐식작용 (phagocytosis)을 일으켜 제거하는 면역의 과정에서 염증도 일어난다 (Yee *et al.*, 2000). 이러한 염증은 세균, 바이러스 등의 병원성 물질 등을 처리하여 손상된 세포를 회복하고 재생하는 보호기능으로 결코 나쁘지 않으며 염증성 질환의 치료에서 염증 반응의 제어는 대단히 중요하다 (Chao *et al.*, 2000).

Mukaida 등 (1996)은 염증의 외부 자극원 중의 하나인 lipopolysaccharide (LPS)는 macrophage와 같은 염증성 세포의 활성을 증대시키고 이로 인해 활성화된 macrophage는 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인을 증가시킨다고 하였다.

또한, Jang 등 (2016)은 염증반응이 일어나면 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 NO와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 prostaglandin E2 (PGE2) 등과 같은 염증매개물질을 생성하게 되는데 이러한 매개물들에 의해 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 transcription factor인 NF- $\kappa$ B가 활성을 띄게 되면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 proteasome에 의해 분해되어 핵 안으로 들어가 염증과 관련된 사이토카인 발현을 조절하여 염증을 유도하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

면역계는 각종 병원체 등 이물질로부터 생체 내부 환경을 방어하는 생체방어체계인 면역세포 중 특히 T세포는 helper T (CD4<sup>+</sup>), cytotoxic T (CD8<sup>+</sup>)세포로 구분되며 면역에서의 기억능력을 가지고 B세포에 관여하여 항체 생성에 도움을 줄 뿐만 아니라 세포성면역에 주된 역할을 하는데, Lucey 등 (1996)은 T<sub>H</sub>세포는 pro-inflammatory cytokine (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등)를 생산하는 T<sub>H1</sub> type과 anti-inflammatory cytokine (IL-4, IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  등)를 분비하는 T<sub>H2</sub> type으로 구분이 된다.

T<sub>H</sub>세포는 T<sub>H1</sub>과 T<sub>H2</sub>가 균형을 이룬 면역학적 항상성을 유지하여야 건강한 신체를 지속할 수 있으나 T<sub>H1</sub> type의 pro-inflammatory mediator의 기능이 T<sub>H2</sub> type의 anti-inflammatory mediator의 기능에 비해 상대적으로 강화되어 균형이 깨져 면역반응의 제어가 불가능하게 되면 염증성 질환이 발병하게 된다. 이렇듯 염증과 면역은 신체에서 매우 깊은 상관관계를 지니고 있다 (Holdsworth *et al.*, 1999).

본 연구에서는 운목향에 대한 항염증 효과와 면역조절에 미치는 영향을 살펴보기 위해 항염증 관련 실험은 대식세포의 세포증식반응, LPS로 유도된 NO 생성 억제능, 염증 관련 lymphokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) 분비 억제능, RT-PCR 및 western blotting을 통한 mRNA 및 단백질 발현 등을 확인하였으며, 면역 관련 실험은 대식세포주 탐식활성능, *in vivo*에서 B·T림프구의 아집단 변화, 비장의 T세포에 존재하는 CD4<sup>+</sup>와 CD8<sup>+</sup> T cells의 면역조직화학적 염색법을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용된 운목향 (*Aucklandia lappa* Decne)은 울산 광명당 제약에서 구입하여 파쇄한 후 약리작용을 나타내는 유효 성분이 정유 성분을 함유하고 있어 70% 에탄올을 시료중량 10 배 양을 넣고 초음파 (Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)로 추출 (30 $^{\circ}$ C, 2 시간)하였다. 이 추출물을 감압 여과한 후 동결 건조한 분말 (AL)은 4 $^{\circ}$ C에서 보관, 동물실험 시에는 증류수로, 세포실험 시에는 phosphate buffered saline (PBS)로 녹여 사용하였다.

### 2. 세포주 및 실험동물

한국 세포주은행에서 분양받은 RAW264.7 세포주는 DMEM 배지 (+10% FBS)로 CO<sub>2</sub> 배양기 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 실험동물은 4 주령의 수컷 BALB/c 생쥐를 다물사이언스 (주)에서 구입·사육 (온도 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 습도 55 $\pm$ 10%, light/dark 12 시간)하였으며, 일주일간 적응시킨 후 고형사료와 물을 자유로이 섭취시키며 (동물실험승인번호: WS2016-004), 동물실험은 우석대학교 동물실험윤리위원회 (WSIACUC: Woosuk University Institutional Animal Care and Use Committees) 지침에 의해 수행하였다.

### 3. 세포생존율 (MTT assay)

RAW264.7 세포주 3  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well에 AL (3.125-50  $\mu$ g/ml)을 첨가하고 1 시간 배양 후 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 배양 (24 시간, 37 $^{\circ}$ C)하였다. 배양종료 4 시간 전에 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액 (5 mg/ml in PBS)을 20  $\mu$ l/well 처리, 4 시간 후 10% SDS (+0.01 N HCl) 100  $\mu$ l를 가하여 18 시간 빛을 차단하며 반응시켰다. Microplate reader (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, CA, USA)로 각 well 흡광도를 570 nm에서 측정하였다.

### 4. 대식세포의 NO 측정

RAW264.7 세포주 8  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well에 AL (3.125-12.5  $\mu$ g/ml)

을 1 시간 동안 처리한 후, LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리, 배양 (24 시간, 37°C)하였다. 배양 상층액과 griess reagent를 1:1의 비율로 혼합, 차광 (실온, 10 분) 후 microplate reader로 540 nm에서 측정하였고, 표준물질은 sodium nitrite를 사용하였다 (Adams and Hamilton, 1984).

### 5. RT (reverse transcription) PCR

RAW264.7 세포주 ( $3 \times 10^6$  cells/well)에 AL을 농도별로 첨가하여 1 시간 배양 후 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하여 배양 (24 시간)한 다음 total RNA를 RNAiso plus (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하여 분리하였다 (Peirson and Butler, 2007).

cDNA는 RNA to cDNA EcoDry Premix (Clontech Laboratories Inc., CA, USA)를 이용하여 합성하였으며, EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)를 사용하여 PCR 기기 (Dice, Takara Bio Inc., Otsu, Japan)에서 30 cycles동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 denaturation (94°C, 10 초)시킨 후, annealing (55 - 57.3°C, 30 초), extension (72°C, 30 초)시켰다. PCR product는 Loading STAR (DYNEBIO Inc., Seongnam, Korea)로 염색하여 1% agarose gel에서 전기영동하고 UV transilluminator (OPTIMA Inc., Tokyo, Japan)로 관찰하였다.

PCR에 사용된 primer (GenoTech Corp., Daejeon, Korea)는 다음과 같다; iNOS sense, 5'-CAG ATC GAG CCC TGG AAG AC-3'; iNOS anti-sense, 5'-CTG GTC CAT GCA GAC AAC CT-3'; IL-1 $\alpha$  sense, 5'-GCA GCC TTA TTT CGG GAG TC-3'; IL-1 $\alpha$  anti-sense, 5'-GGC TCC ACT AGG GTT TGC TC-3'; IL-1 $\beta$  sense, 5'-ACG GAC CCC AAA AGA TGA AG-3'; IL-1 $\beta$  anti-sense, 5'-TGA TAC TGC CTG CCT GAA GC-3'; TNF- $\alpha$  sense, 5'-TAG CCC ACG TCG TAG CAA AC-3'; TNF- $\alpha$  anti-sense, 5'-TCC CTT GAA GAG AAC CTG GG-3'.

### 6. Cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) 측정

IL-1 $\beta$  측정은 RAW264.7 세포주를 6 well plate에  $2 \times 10^6$  cells/well로 분주하고 AL을 농도별로 처리한 후 1 시간 뒤 LPS (lipopolysaccharide)를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리하였으며, 24 시간 배양 후 상층액 수거하여 sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 (Enavall and Perlmann, 1972) cytokine을 450 nm에서 흡광도 측정하였다. TNF- $\alpha$  측정은 IL-1 $\beta$  방법에 준하였다.

### 7. 단백질 분리 및 웨스턴 블로팅

RAW264.7 세포주를  $2 \times 10^6$  cells/well에 농도별 AL을 처리하여 1 시간 배양한 후, LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하고 24 시간

배양하였다. 각 세포를 취하여 RIPA buffer (+1% protease inhibitor cocktail) 500  $\mu\text{l}$ 로 lysis시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 15 분)하여 단백질을 추출하였으며, Bradford법 (Bradford, 1976)을 이용해 단백질 정량 후 well 당 25  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 7.5% acrylamide gel에 loading하여 SDS-PAGE를 시행하였다.

전기영동 후 단백질을 0.2  $\mu\text{m}$  PVDF membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)에 1 시간 transfer 한 다음 5% skim milk로 상온에서 1 시간 blocking하였다. 그 후 희석된 항체 (iNOS, COX-2, I $\kappa$ B- $\alpha$ )를 overnight 반응시켜, TBST (0.05% Tween 20 in TBS)로 세척 (4 회) 후 goat anti-rabbit (or mouse) IgG-HRP 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA)를 반응 (상온, 1 시간)시켰다. 이를 TBST로 세척 (4 회)한 후 membrane을 ECL (enhanced chemiluminescence)법을 이용해 화학 이미지 분석 시스템 (Fusion Solo S, Vilber Lourmat, Collegien, France)으로 분석하였다.

### 8. 탐식작용 활성 측정

RAW 264.7 세포를 96 well에  $5 \times 10^5$  cells/well으로 분주한 후 AL을 농도별 처리한 후, LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하고 24 시간 배양하여 탐식능을 측정하기 위해 zymosan입자를 흡소닌화 (FBS 사용)시켜 Cytoselect™ 96 well phagocytosis assay (zymosan substrate) kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 대식세포 탐식능을 microplate reader (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

### 9. 비장 및 흉선림프구 아집단 측정

5 주령의 BALB/c mouse에 AL 100 mg/kg (AL 100), AL 250 mg/kg (AL 250)을 4 주간 경구투여 하여 경추 탈구시킨 후 비장과 흉선을 적출하여 비장 및 흉선세포를 PBS에 부유시켜  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조정된 세포 부유액에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 1:30 dilution으로 이중 염색반응 (4°C, 30 분)시키고 flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) (excitation: 488 nm, emission: 525 nm/FITC, 575 nm/PE)를 이용하여 림프구 아집단을 측정하였다 (Shortman and Backson, 1974).

### 10. 면역조직화학적 염색

면역 관련 인자들의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 절취한 비장은 일반적인 방법에 의하여 탈수와 투명화 과정을 거

처 파라핀 포매 후 paraffin 조직 절편을 (7 μm) 제작하여 면역조직화학염색 하였다.

비장에서 CD4, CD8의 발현을 관찰하기 위해 비장 조직 절편을 0.1 M phosphate buffer (PB)로 세척한 후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 1% normal goat serum과 0.3% Triton X-100을 1 시간 처리하였다. CD4 (1 : 100 dilution)와 CD8 (1 : 50 dilution) 항체 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 조직 절편에 떨어뜨린 후 실온에서 12 시간 반응 후 0.1 M PB로 실온에서 세척 (15 분, 2 회)하였다.

Biotinylated anti-rabbit (or goat or mouse) IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)는 1 : 200으로 희석하여 반응 (실온, 1 시간)시켰으며 다시 0.1 M PB로 수세 (15 분, 2 회)과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC (avidin biotin complex) 용액에 반응 (실온, 1 시간)시켰다. 다시 0.1 M PB로 수세 (15 분, 2 회)하고 나서 0.1 M PB에 3-3' diaminobenzidine를 녹인 용액에서 5 분간 반응시킨 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final 0.005%)를 첨가하여 5 분간 발색반응을 관찰하였다. 반응이 끝난 다음 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하여 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

11. 통계처리

본 실험에서 결과는 평균 ± 표준편차 (Mean ± SD)로 표시하였고, 통계처리는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) package를 이용하여 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 실시하였다. 유의성은 p < 0.05 수준에서 판단하였다.

결 과

1. 대식세포 (RAW264.7 세포주) 생존율에 미치는 효과

항염증 효과 확인을 위한 실험 적정 농도를 구하기 위해 먼저 Hansen 등 (1989)의 방법에 따라 RAW264.7 세포에 대한 세포독성을 MTT법을 이용하여 측정하였다.

RAW264.7 세포주에 운목향 (*Aucklandia lappa* Decne) 70% 에탄올 추출물 (AL)을 3.125 - 50 μg/ml의 농도로 처리 후 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 1에서 AL은 저농도에서 LPS (1 μg/ml)로 유도된 RAW264.7 세포주에서 세포독성이 나타나지 않았다. 12.5 μg/ml 농도 이하는 거의 같거나 약간 증가하는 것으로 큰 영향이 없었으며, 25 μg/ml 이상 농도에서부터는 유의적으로 세포독성이 있어 항염증 효과 관련 실험은 LPS로 유도된 RAW264.7 세포주에서 AL 추출물의 세포 독성이 없는 12.5 μg/ml 이하의 농도 (Lee and Kim, 2015)로 진행하였다.

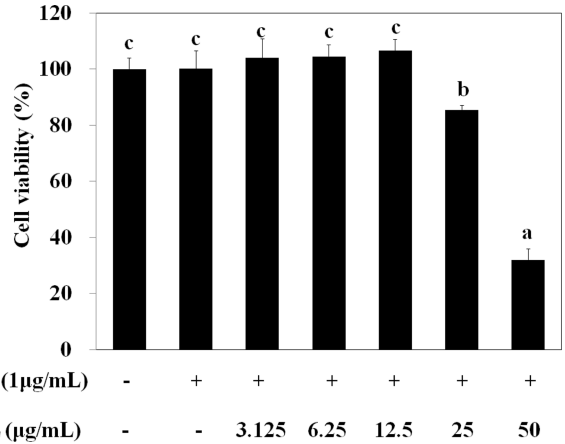


Fig. 1. Effect of AL on the cell viability in cultured RAW264.7 cells. AL (3.125 - 50 μg/ml) were treated with cultured RAW264.7 cells, and incubated for 24 hours. The cells assayed by MTT method. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (p < 0.05).

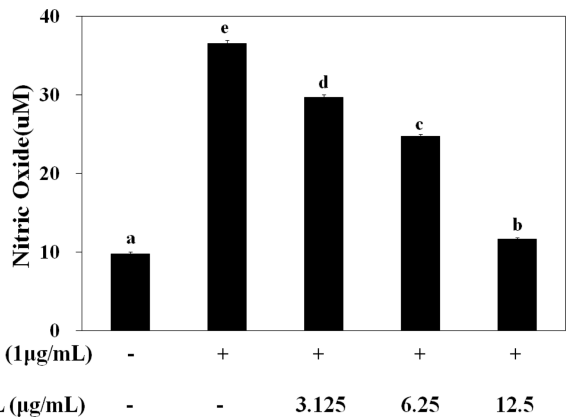


Fig. 2. Effect of AL on the nitric oxide production in RAW264.7 cells. Cells were pre-incubated for 1 hour with AL at 3.125 - 12.5 μg/ml and then stimulated for 24 hours with 1 μg/ml of LPS. The 24 hours conditioned media were collected for NO assay. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (p < 0.05).

2. NO 생성 억제에 미치는 효과

Endotoxin의 일종인 LPS를 대식세포주인 RAW264.7 세포에 가하면 전염증성 사이토카인이 증가하여 NO, PGE2 등의 염증 매개물질의 분비가 증가한다 (Kim et al., 2014). 또한 생체 내의 free radical에 의한 세포 손상은 염증과 밀접한 관계가 있다 (Jin et al., 2010).

LPS로 유도된 RAW264.7 cell에서 NO 생성은 AL추출물에 의해 생성억제가 되는지를 살펴보기 위하여 AL추출물을



3.125 - 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후 NO 생성 억제 효과를 확인하였다 (Fig. 2).

LPS 처리되지 않은 정상군 (normal)에 비해 LPS 처리된 대조군 (control)에서 2.7 배 많은 NO를 생성하였다. AL 각 농도별로 29.7, 24.7, 11.6  $\mu\text{M}$ 의 NO 생성을 나타내어 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. Soe 등 (2009)은 NO가 감염부위의 활성화된 대식세포에서 면역조절, 혈관확장, 신경전달 등의 역할이 있다고 보고하였다. 따라서 AL에 의한 NO 생성 억제능은 항염증작용에 조절 역할을 할 수 있다고 사료된다.

### 3. 염증 관련 cytokines (iNOS, IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ 및 TNF- $\alpha$ ) mRNA 발현 효과

Shih 등 (2010)은 염증 매개물질인 NO는 iNOS로부터 만들어져 염증반응을 촉진하고, Ryu 등 (2003)은 LPS에 의해 자극되어 활성화된 iNOS가 NO를 생성하여 염증반응 매개 역할을 하는 것으로 보고하였다. 또한 LPS 자극에 활성화된 대식세포는 염증 매개 물질인 IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, TNF- $\alpha$  등의 전염증성 사이토카인을 생산한다 (Horwood *et al.*, 2006).

따라서 본 실험에서는 LPS로 자극된 대식세포주인 RAW264.7 세포에 AL을 가하여 염증관련 사이토카인 (iNOS, IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ )의 mRNA 발현을 확인하였다 (Fig. 3). iNOS mRNA 발현에서 LPS 자극을 시킨 대조군은 정상군에 비하여 발현량이 약 10 배 증가되었고 AL을 처리함에 따라 농도 의존적으로 발현이 억제되었다 [Fig. 3(A)].

IL-1 $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  mRNA 발현에서 IL-1 $\alpha$ 는 LPS 자극을 시킨 대조군에서 LPS 자극을 시키지 않은 정상군에 비하여 발현량이 약 9.6 배 증가되었고 AL을 처리함에 따라 농도 의존적으로 발현이 억제되었다. IL-1 $\beta$ 에서 LPS 자극을 시킨 대조군은 LPS 자극을 시키지 않은 정상군에 비하여 발현량이 약 2.4 배 증가되었고 AL을 처리함에 따라 농도 의존적으로 발현이 억제되었다 [Fig. 3(B)].

TNF- $\alpha$  mRNA 발현에서 LPS 자극을 시킨 대조군은 LPS 자극을 시키지 않은 정상군에 비하여 발현량이 약 1.5 배 증가되었고 AL을 처리함에 따라 농도 의존적으로 발현이 억제되었다 [Fig. 3(C)].

### 4. 염증관련 cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) 분비 억제 효과

위의 염증 관련 cytokines (iNOS, IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ )의 mRNA 발현양상을 확인 (Fig. 3)한 후, 실제 생성된 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 분비량을 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)법으로 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

LPS 처리된 RAW264.7 세포에서 AL에 의한 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  억제 효과를 확인한 결과 IL-1 $\beta$ 의 경우 LPS 처리된 대조군이 359.65  $\text{pg/ml}$ 로 정상군에 비해 약 1.2 배 높은 IL-1 $\beta$ 를

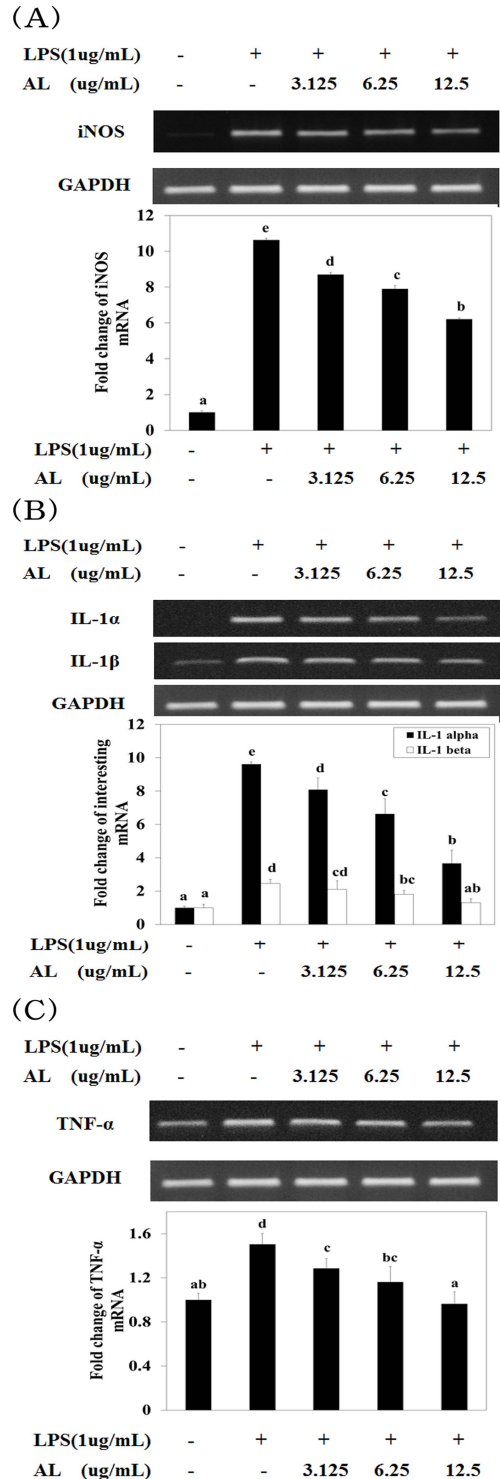
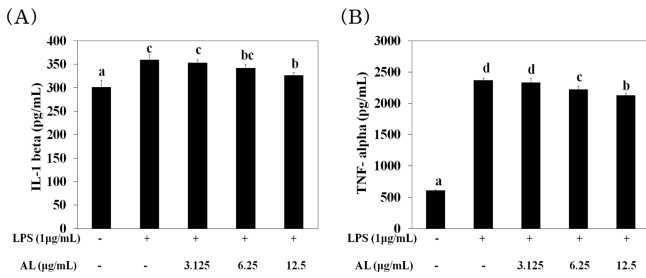


Fig. 3. Effect of AL on iNOS (A), IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  (B), TNF- $\alpha$  (C) gene expression by LPS treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hour with AL at 3.125 - 12.5  $\mu\text{g/ml}$  and then stimulated for 24 hours with 1  $\mu\text{g/ml}$  of LPS. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4. Effect of AL on the IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) production by RAW264.7 cells.** Cells were pre-incubated for 1 hour with AL at 3.125 - 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and then stimulated for 24 hours with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of LPS. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ( $p < 0.05$ ).

생성하였으며 AL 처리군 각각 352.89, 342.14, 326.51  $\text{pg}/\text{mL}$ 로 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 [Fig. 4(A)].

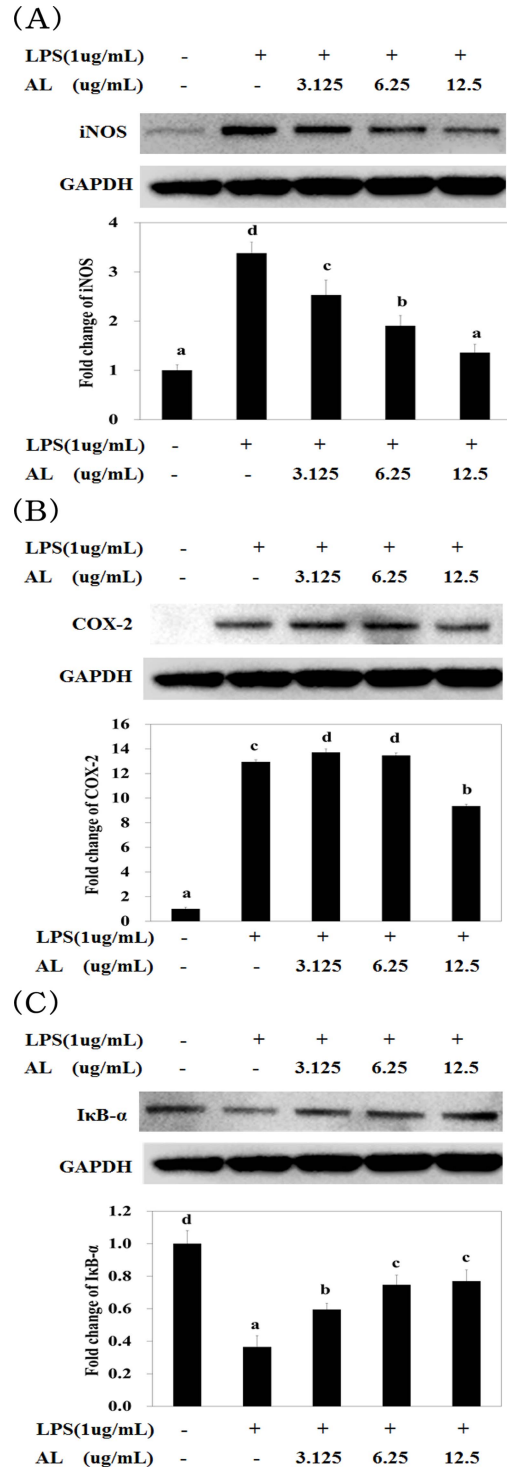
TNF- $\alpha$ 의 경우 LPS 처리된 대조군이 2,372.79  $\text{pg}/\text{mL}$ 로 정상군에 비해 TNF- $\alpha$ 의 생성을 약 3.8 배 증가시켰으며 AL 처리군에서는 각각 2,336.2, 2,222.12, 2,129.82  $\text{pg}/\text{mL}$ 로 대조군에 비해 농도 의존적으로 낮아짐을 확인하였다 [Fig. 4(B)].

따라서 염증의 자극원인 LPS는 대식세포와 같은 염증성 세포의 활성을 증가시키고 활성화된 대식세포는 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인을 증가 시킨다 (Mukaida *et al.*, 1996). TNF- $\alpha$ 는 LPS 자극시의 주요 신호전달분자로서 염증성 병변과정에서 증가되며 대식세포에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 만성 염증과 관련이 있다 (Delgado *et al.*, 2003)는 보고와 같이 LPS 처리된 RAW264.7 세포에서의 증가된 사이토카인 (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )은 AL을 가하여 농도 의존적으로 억제시킴으로써 항염증 작용에 관여하고 있음을 확인하였다.

### 5. 염증관련 단백질 (iNOS, COX-2, I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 발현 효과

염증반응이 일어나면 iNOS에 의해 NO를 생성하는 것처럼 COX-2가 활성화하면 PGE2 등과 같은 염증 매개물질을 생성하며 (Seibert *et al.*, 1994), COX-2는 대식세포와 같은 염증 세포에서 상처, 감염 등 외부의 자극에 의해 유도되며 종양 생성에 관여하고 염증 상태로 만드는 과정에서 중추적인 역할을 한다 (Needleman and Isakson, 1997). 그러므로 COX-2를 억제하는 물질은 부작용을 최소화 시킨 항염증 제제로 사용될 수 있다 (Kurumbail *et al.*, 2001). 이런 매개물질들은 사이토카인, 케모카인, 성장인자의 합성을 조절하는 transcription factor인 NF- $\kappa$ B가 활성을 띄게 하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 proteasome에 의해 분해되어 핵 안으로 들어가 염증과 관련된 사이토카인 발현을 조절하여 염증을 유도하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2007).

염증반응 시 발현되는 단백질인 iNOS, COX-2, I $\kappa$ B- $\alpha$  발현



**Fig. 5. Effect of AL on the expression of iNOS (A), COX-2 (B), I $\kappa$ B- $\alpha$  (C) by LPS treated RAW264.7 cells.** RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hour with AL at concentrations ranging from 3.125 to 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and then stimulated for 24 hours with 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of LPS. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ( $p < 0.05$ ).

을 웨스턴 블로팅하여 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. iNOS에서 LPS로 유도된 대조군은 정상군에 비하여 발현량이 약 3 배 증가되었고 AL을 처리함에 따라 농도 의존적으로 발현이 억제되는 것을 확인하였다 [Fig. 5(A)].

COX-2에서 LPS로 유도된 대조군은 정상군에 비하여 발현량이 약 12 배 증가되었으며, AL 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 까지는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 발현이 억제되는 것을 확인하였다 [Fig. 5(B)]. 대식세포 (RAW264.7 세포주) 생존율에 미치는 결과는 세포독성이 없는 12.5  $\mu\text{g/ml}$  농도까지만 실험이 진행되어서 억제 효과가 농도 의존적이지 않고 특정농도에서만 억제 효과가 관찰되는 기작에 대해서는 구체적인 검증이 필요할 것으로 사료된다.

I $\kappa$ B- $\alpha$ 에서 LPS로 유도된 대조군은 정상군에 비해 약 3 배 정도 감소하였으며, AL을 처리함에 따라 농도 의존적으로 발현이 증가되었음을 확인하였다 [Fig. 5(C)].

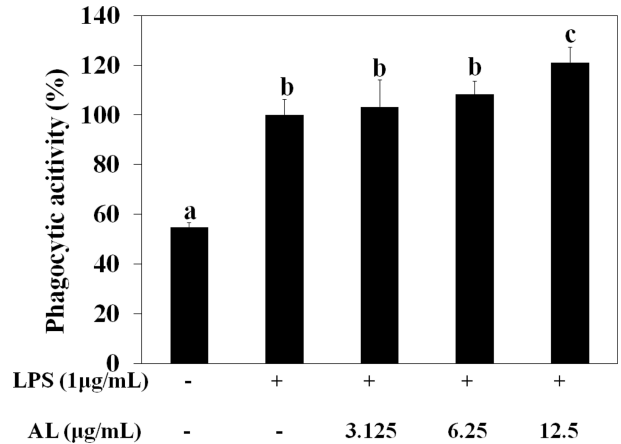
LPS는 NF- $\kappa$ B를 활성화하여 전염증성 사이토카인을 분비한다. AL의 NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS로 자극한 대식세포에 AL을 처리하고 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해 정도를 실험하였다. 세포질에서 자극이 없는 상태에서는 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B는 결합하여 존재한다. 활성화 시킬 수 있는 자극이 가해지면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 분해되고 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 다양한 사이토카인을 생성함으로써 NF- $\kappa$ B 활성화는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해에 의존하게 된다 (Kim *et al.*, 2007). Fig. 5(C)와 같이 AL은 LPS에 의한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제 (즉 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제)하여 COX-2 및 iNOS 발현을 억제함으로써 PGE2와 NO의 생성이 억제되어 항염증 효과를 나타낸다 (Kim *et al.*, 2003)는 보고와 매우 유사한 결과임을 확인하였다.

### 6. 대식세포주의 탐식활성에 미치는 효과

염증매개물질 및 염증관련 사이토카인의 과잉 생산은 과도한 면역반응을 야기함으로써 면역질환 (Dinarello, 2018) 및 인체질환에 영향을 끼친다고 볼 수 있으므로 염증 매개분자를 억제하는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다 (Calixto *et al.*, 2004).

본 연구에서는 면역반응에 관련된 물질과 세포 중 대식세포 기원의 RAW264.7에 zymosan particle을 사용하여 대식세포가 식작용을 쉽게 할 수 있도록 오폭소닌화 후 대식세포주 탐식능에 대한 AL의 영향을 측정하였다.

대식세포주인 RAW264.7를 사용하여 zymosan입자를 오폭소닌화시켜 탐식능을 측정된 결과 zymosan만을 처리한 대조군을 100%로 비교하였을 때 정상군이 54.81%로서 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다. AL 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 까지는 대조군과 큰 차이가 없었으며 12.5  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서 121.08%로 대조군에 비해 탐식 활성이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 6). 이로써



**Fig. 6. Effect of AL on the phagocytosis in RAW264.7 cells.** AL (3.125 - 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) were treated with cultured RAW264.7 cells, and incubated for 24 hours. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ( $p < 0.05$ ).

AL은 선천적 면역에 관여하는 대식세포의 탐식 활성을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다.

### 7. 면역세포 아집단에 미치는 효과

탐식 활성능 측정에 이어 면역세포로 가장 중요한 역할을 하는 T림프구와 B림프구 활성화에 대해 연구를 진행하였다. 체액성 면역에는 B림프구가 항체를 분비하여 감염된 세균을 제거하는 기능을 보여주며 세포성 면역은 흉선에서 유래한 T림프구가 항원을 인지하여 림포카인을 분비하거나 직접 감염된 세포를 죽인다 (Leon and Ardavin, 2008)는 보고가 있다. 또한, T림프구는 백혈구의 일종으로서 주로 면역이나 알레르기 와 관련이 있으며 세포성 면역을 담당하는 세포이다 (Clerici and Shearer, 1994).

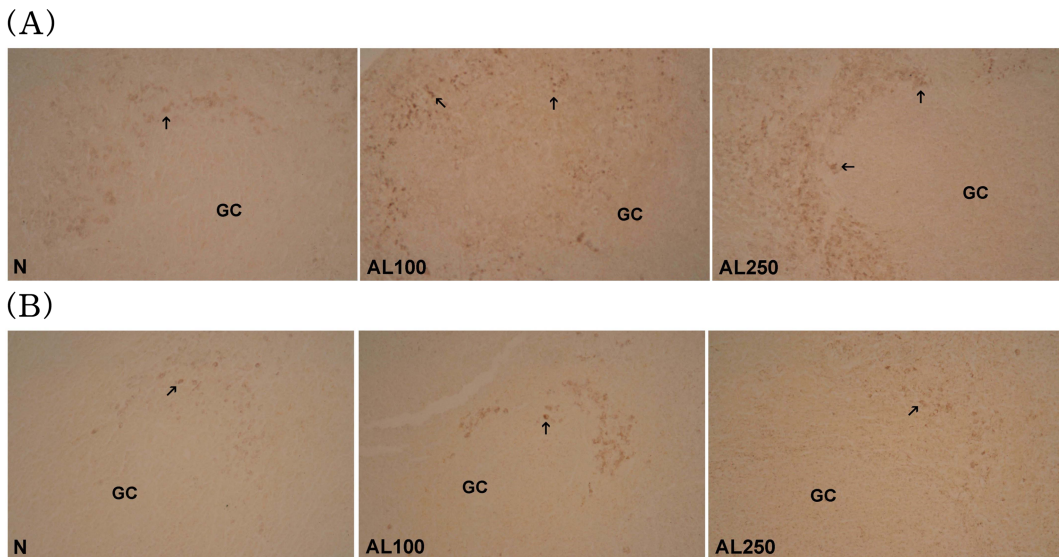
본 연구에서는 AL을 경구 투여하여 도움 T세포 ( $T_H$ )와 세포독성 T세포 ( $T_C$ )에 관하여 연구를 진행하였다. 비장 및 흉선의 면역세포 아집단 측정 결과, 비장의 B세포는 정상군 대비 AL 투여군에서 감소하였으나, T세포는 정상군에 비해 AL 100, AL 250에서 약 10% 증가하였다. T세포의  $T_H$ 세포에서 AL 100 군은 약 7%, AL 250 군은 약 12% 증가하였으며  $T_C$ 세포에서 AL 100 군은 약 16%, AL 250 군은 약 33% 증가하였다. 또한 흉선의  $T_H$ 세포에서 AL 투여군에서 증가하였으나 유의성은 없었으며  $T_C$ 세포에서 AL 100 군은 약 52%, AL 250 군은 약 81% 증가됨으로써 비장의 T세포와 흉선세포의  $T_C$ 가 정상군에 비해 유의성 있게 증가되었음을 확인할 수 있었다 (Table 1).

이는 AL을 경구 투여한 마우스의 비장과 흉선의 면역에 관

**Table 1.** Effects of AL on the lymphocytes subpopulation change in mouse splenocytes and thymocytes *in vivo*.

Treat	Cell type	Splenocytes (%)			Thymocytes (%)	
		B cells	T cells		T <sub>H</sub>	T <sub>C</sub>
			T <sub>H</sub>	T <sub>C</sub>		
Normal	37.3±3.4 <sup>b</sup>	14.8±1.0 <sup>a</sup>	24.8±1.2 <sup>a</sup>	10.2±1.2 <sup>a</sup>	12.3±1.0 <sup>NS</sup>	5.7±1.4 <sup>a</sup>
AL 100	32.6±2.4 <sup>a</sup>	16.0±0.6 <sup>ab</sup>	27.3±0.9 <sup>b</sup>	11.9±1.0 <sup>b</sup>	13.1±0.8 <sup>NS</sup>	8.7±0.9 <sup>b</sup>
AL 250	34.3±1.4 <sup>ab</sup>	16.6±0.6 <sup>b</sup>	27.4±0.6 <sup>b</sup>	13.6±0.5 <sup>c</sup>	14.5±0.5 <sup>NS</sup>	10.4±0.8 <sup>b</sup>

AL was administered *p.o.* once a day for 4 weeks (AL 100; 100 mg/kg/day, AL 250; 250 mg/kg/day *p.o.*), thereafter the cells were collected and the lymphocytes subpopulation was measured by flow cytometer staining with PE or FITC conjugated anti-B220/Thy1 or anti-CD4/CD8 monoclonal antibody. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. \*Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ( $p < 0.05$ ). NS; Not significantly.



**Fig. 7.** Photomicrograph showing CD4<sup>+</sup> (A), CD8<sup>+</sup> (B) immunoreactive lymphocytes in splenocytes of Balb/c mice. Immunohistochemical density of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in group AL100, AL 250 was strongly stained compared to normal group.

여하는 T세포 중 T<sub>H</sub>, T<sub>C</sub>세포가 증가하여 면역 조절에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

림프구의 활성을 증가시킴으로써 면역증강 활성화에 도움이 될 것이라고 사료된다.

**8. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 림프구의 면역조직화학적 변화**

Flow cytometer로 면역 관련 세포수를 측정된 후 상응하는 면역 관련 인자들의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 비장 T세포에 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>의 단클론 항체를 처리해서 면역조직화학적으로 염색하여 확인하였다.

비장에서의 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T세포의 염색반응은 정상군에 비하여 AL 투여군에서 더 강한 면역염색 반응을 나타내었다. 이 결과로 보아 AL의 투여가 비장의 T림프구 (T<sub>H</sub>/T<sub>C</sub> cells)의 활성을 증가시켜 비장 내에서 면역력 향상에 도움이 된 것으로 추측되며 (Fig. 7), 결론적으로 AL이 비장 및 흉선 세포의 T

**고 찰**

염증은 조직에 상처나 세균 감염 등의 물리적 작용이나 화학적 자극이 일어날 때 그 손상부위를 재생하려는 신체 방어 기전 (Lee *et al.*, 2000)이다. 그러나 지속적 또는 과도한 염증반응은 점막손상을 촉진하고 통증, 발열, 관절염, 암 등 각종 만성 질환의 원인이 되므로 염증 매개물질을 조절할 수 있는 방법은 염증 질환 치료에 매우 중요하다 (Cheon *et al.*, 2009).

Shih 등 (2010)은 염증 매개물질로 작용하는 NO 과생성은

L-arginine으로부터 iNOS에 의해 만들어지고 부종, 혈관 투과성 등 염증 반응을 촉진시키며, 염증 매개물질 생합성을 촉진, 염증 심화, 세포 매개성 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. NO를 생성하는 효소인 NOS 중 염증반응 시 유도되어 장시간 다량의 NO를 생성하는 iNOS는 대식세포에서 LPS의 자극에 의해 활성을 띄게 되며 활성화된 iNOS가 NO를 생성하여 염증반응에 매개 역할을 하게 된다 (Ryu *et al.*, 2003).

NO와 iNOS의 발현 증가와 염증반응 및 관련 조직 손상에 대한 보고 (Tezuka *et al.*, 2001)가 있으며, 이는 염증 매개물질 및 염증 관련 사이토카인의 과잉 생산은 과도한 면역반응을 야기함으로써 각종 인체질환에 영향을 미치므로 염증 매개물질을 억제하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 RAW264.7 세포주를 사용하여 AL의 염증성 매개물질 억제를 통한 항염증과 면역조절 효과를 평가하기 위해 세포 생존율을 확인하여 독성이 없는 12.5  $\mu\text{g/ml}$  이하로 AL을 처리한 결과 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하고 있음을 확인하였다 (Fig. 2).

또한 유전자와 단백질 발현 실험에서 NO와 iNOS와의 관련성은 LPS에 의해 증가된 iNOS가 AL처리에 의해 억제되었다. 이것은 LPS로 자극된 대식세포주에서 운목향 (*Aucklandia lappa* Decne)의 주성분과의 복합체가 iNOS 발현 억제, NO 생성 억제 (Matsuda *et al.*, 2003)를 한다는 보고와 같다.

LPS 자극에 활성화된 대식세포는 염증매개 물질인 IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, TNF- $\alpha$  등의 pro-inflammatory cytokine을 생산하게 된다 (Horwood *et al.*, 2006). IL-1의 경우는 염증반응 매개하는 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 두 가지가 있는데, 소량에서는 T, B세포를 활성화하며, 염증세포를 자극하지만 IL-1이 과량 만들어질 때 호르몬으로 작용되어 발열, 급성기 반응 (acute phase response) 등이 나타나고, TNF- $\alpha$ 는 주로 급성염증반응에 관여하며, 면역세포를 조절하고 LPS 반응의 주요 매개체로서 염증성 병변과정에서는 발현이 증가되는데 대식세포에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 만성염증에도 관련이 있다 (Delgado *et al.*, 2003).

RAW264.7 세포에서의 mRNA 발현 양상을 측정한 결과 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 는 AL을 처리함에 따라 농도 의존적으로 억제되었으며, ELISA법으로 확인 결과 AL은 RAW264.7에서 염증 매개물질인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 를 모두 억제하여 항염증에 관여하는 것으로 확인하였다 (Fig. 3, 4). 이 결과는 Pae 등 (2007)의 운목향 주성분 중 하나인 costunolide가 heme oxygenase-1로 자극된 RAW264.7에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성을 억제한다는 보고와 유사하였다.

COX는 arachidonic acid를 prostaglandin (PG)으로 전환하는 효소로서 COX-1과 COX-2로 나뉜다. Seibert 등 (1994)은 COX-2가 염증 매개물질인 PGE2 생성에 관여하는 물질로 대식세포와 같은 염증세포에서 상처, 감염 등 외부의 자극에 의

해 유도되며 PG합성을 증가시켜 종양의 세포사멸을 억제하고 종양생성에 관여하며 염증상태로 만드는 과정에서 중추적인 역할을 한다고 한다. 그러므로 COX-2를 억제하는 물질은 부작용을 최소화시킨 항염증제로 사용될 수 있다 (Kurumbail *et al.*, 2001). NF- $\kappa$ B는 염증반응, 면역체계 조절, 세포사, 세포증식 등에 관여하는 단백질군으로 사이토카인, 케모카인, 접합분자, 유도효소 등에 의해 조절되며 체내 거의 모든 생리반응에 연관된다 (Yamamoto and Gaynor, 2004).

NF- $\kappa$ B의 종류는 p50, p52, RelA (p65), RelB, c-Rel, v-Rel로, 이합체화 (dimerization), I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B)와의 상호작용 등의 기능을 수행한다 (Yamamoto and Gaynor, 2004). 염증반응에서의 NF- $\kappa$ B는 p50과 p65로 구성되어 전사인자로서 핵 안으로 들어가 iNOS, COX-2 등의 염증관련 매개물질 및 염증관련 cytokine을 합성한다 (Majdalawieh and Ro, 2010). NF- $\kappa$ B 단백질 이합체는 세포질 내에서 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하는 inhibitor NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 단백질과 결합하여 비활성 상태로 존재하게 되며, NF- $\kappa$ B 단백질에 존재하는 RHD에 의해 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B의 결합이 일어남으로써 NF- $\kappa$ B의 작용이 억제된다 (Majdalawieh and Ro, 2010). 그러나 LPS 등을 처리하면 I $\kappa$ B kinase (IKK)에 의해 I $\kappa$ B가 인산화 되어 분해가 되며 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 분리된 NF- $\kappa$ B는 핵 내로 이동하게 되고, 특정 gene의 I $\kappa$ B site에 결합하여 전사인자로서 작용하게 된다 (Mercurio *et al.*, 1993).

본 연구에서 LPS처리에 의해 증가된 COX-2 발현이 AL에 의해 감소되었으며, I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 LPS로 감소된 대조군에 비해 AL 처리에 따라 농도 의존적으로 증가하여 정상으로 회복됨을 확인하였다 [Fig. 5(C)]. 이 결과는 AL을 농도별로 처리하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 NF- $\kappa$ B와 결합하여 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동을 억제하기 위해 COX-2와 iNOS 발현을 억제함으로써 PGE2와 NO의 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다는 결과와 (Kim *et al.*, 2003) Zheng 등 (2016)의 보고한 바와 같이 costunolide과 dehydrocostuslactone은 에탄올로 유발된 위궤양에서 COX-2, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  등의 염증매개인자를 억제 조절한다는 결과와 유사하였다.

면역의 정의는 생체 내부 환경이 외부인자인 항원에 대해 방어하는 현상으로 체액성 면역는 B림프구가 항체를 분비하여 감염된 세균을 제거하는 기능을 보여주며 세포성 면역는 흉선에서 유래한 T림프구가 항원을 인지하여 림포카인을 분비하거나 직접 감염된 세포를 살해한다 (Leon and Ardavin, 2008). 또한 대식세포를 활성화시켜 식작용을 돕기도 한다. 따라서 면역조절 효과를 살펴보기 위해 대식세포 탐식능, 비장 및 흉선세포의 아집단 변화, 비장 조직 내 CD4, CD8의 면역조직화학염색을 수행하였다. 식작용이란 대식세포체가 이물 혹은 박테리아 등을 자기 체내에 받아들여서 이것을 분해, 무해화하는 작용을 말한다.



본 실험에서는 zymosan particle을 혈청을 사용하여 대식세포가 식작용을 쉽게 할 수 있도록 옅소닌화 후 대식세포 탐식능을 측정하였다. zymosan particle을 처리한 대조군에 비해 AL 처리군에서 농도 의존적으로 증가하였으며 대식세포가 AL을 처리함에 따라 강한 탐식능을 보여 자기방어를 하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 6). 이는 Choi 등 (2002) 보고에서 운목향 주성분 중 하나인 costunolide가 HL-60 cells에서 분화를 유도할 때 탐식작용과도 관련 있다는 결과와 유사하였다.

세포 면역에서 주된 역할을 하는 T세포 중 T<sub>H</sub>세포와 T<sub>C</sub>세포에 관하여 연구를 진행하였다. 이들은 세포 표면에 있는 단백질 분자에 의해 T<sub>H</sub>세포 (CD4<sup>+</sup>), T<sub>C</sub>세포 (CD8<sup>+</sup>)로 구분되는데, T<sub>H</sub>세포는 B세포가 분화하여 항원-항체 반응을 원활히 할 수 있게 도와주고 B세포의 작용을 촉진하는 세포이며, T<sub>C</sub>세포는 인체에 해로운 물질들을 직접 제거하고 체내의 암세포도 제거하는 역할을 한다 (Miceli and Parnes, 1993).

따라서 비장 및 흉선 림프구의 아집단 측정에서 비장의 T세포는 높은 농도를 투여함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, T<sub>H</sub>에서보다는 T<sub>C</sub>에서 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 흉선의 T세포 측정 결과 역시 T<sub>H</sub>, T<sub>C</sub> 모두 높아졌으나 T<sub>H</sub>보다는 T<sub>C</sub>에서 더 높아졌음을 확인 할 수 있었다 (Table 1). 비장의 T세포에 CD4, CD8의 면역조직화학염색 결과 AL투여군이 정상군 대비 CD4, CD8에 면역반응을 나타내어 모두 강하게 염색되어 비장세포의 T림프구의 활성을 증가시킴으로써 면역조절 효과를 보인다 (Fig. 7).

따라서 운목향 추출물이 일부 염증 매개물질을 억제하여 항염증 효과를 나타내어 염증성 질환의 치료에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되며 인체의 면역조절 활성화에도 효과가 있을 것으로 추정되나 특정 염증성질환 및 면역조절 활성화의 세밀한 기전에 대해서는 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

Adams DO and Hamilton TA. (1984). The cell biology of macrophage activation. Annual Review of Immunology. 2:283-318.

Admas PD. (2001). Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. Biochimica et Biophysica Acta. 1471:123-133.

Bocca C, Gabriel L, Bozzo F and Miglietta A. (2004). A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells. Chemo-Biological Interactions. 147:79-86.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254.

Calixto JB, Campos MM, Otuki MF and Santos ARS. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II: Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and

adhesion molecules. Planta Medica. 70:93-103.

Chao CY, Yeh SL, Lin MT and Chen WJ. (2000). Effects of parenteral infusion with fish-oil or safflower-oil emulsion on hepatic lipids, plasma amino acids, and inflammatory mediators in septic rats. Nutrition. 16:284-288.

Cheon MS, Yoon TS, Choi G, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Choo BK and Kim HK. (2009). Comparative study of extracts from Rhubarb on inflammatory activity in RAW264.7 cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:109-114.

Choi JH, Seo BR, Seo SH, Lee KT, Park JH, Park HJ, Choi JW, Itoh Y and Miyamoto KI. (2002). Costunolide induces differentiation of human leukemia HL-60 cells. Archives of Pharmacal Research. 25:480-484.

Clerici M. and Shearer GM. (1994). The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: New insights. Immunology Today. 15:575-581.

Delgado AV, Mcmanus AT and Chambers JP. (2003). Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. 37:355-361.

Dinarello CA. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunological Reviews. 281:8-27.

Enavall E and Perlmann P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa.3: Quantitation of specific antibodies of enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology. 109:129-135.

Hansen MB, Nielsen SE and Berg K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. Journal of Immunological Methods. 119:203-210.

Holdsworth SR, Kitching AR and Tipping PG. (1999). Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. Kidney International. 55:1198-1216.

Horwood NJ, Page TH, Mcdaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D and Foxwell BMJ. (2006). Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. The Journal of Immunology. 176:3635-3641.

Jang JH, Jung HK, Ko JH, Sim MO, Woo KW, Kim TM, Lee KH, Ahn BK, Cho HW, Cho JH and Jung WS. (2016). Anti-inflammatory effect of *Sedum takesimensis* Nakai water extract in RAW264.7 Cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 24:228-236.

Jeon YJ, Lee HS, Yeon SW, Ko JH, An KM, Yu SW, Kang JH, Hwang BY and Kim TY. (2005). Inhibitory effects of dehydrocostuslactone isolated from Saussureae radix on CDK2 activity. Korean Journal of Pharmacognosy. 36:97-101.

Jin JH, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW and Kim HP. (2010). Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. Journal of Ethnopharmacology. 127:589-595.

Kang SS, Kim JS, Chi HJ, Chang SY and Ha KW. (1999). Isolation and quantitative determination of costunolide from *Saussurea* root. Korean Journal of Pharmacognosy. 30:48-53.

Kim B, Kim JI, Kim HR and Byun DS. (2014). Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoii* on lipopolysaccharides-stimulated RAW264.7 cells. Korean

- Journal of Fisheries and Aquatic Science. 47:527-536.
- Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T and Yu R.** (2003). Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cellular Signalling*. 15:299-306.
- Kim DY, Jeong SW, Moon HC and Park SJ.** (2007). Water extract of flowers of magnolia denudata inhibits LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokines production in murine peritoneal macrophage by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 21:916-920.
- Kurumbail RG, Kiefer JR and Marnett LJ.** (2001). Cyclooxygenase enzymes: Catalysis and inhibition. *Current Opinion in Structural Biology*. 11:752-760.
- Lee SG and Kim MM.** (2015). Anti-inflammatory effect of scopoletin in RAW264.7 macrophages. *Journal of Life Science*. 25:1377-1383.
- Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI and Kim J.** (2007). Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2(COX-2) and inducible nitric oxide synthase(iNOS) gene expression by blocking NF- $\kappa$ B transactivation in LPS-activated RAW264.7 cells. *Molecules and Cells*. 23:398-404.
- Leon B and Ardavin C.** (2008). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunology and Cell Biology*. 86:320-324.
- Lucey DR, Clerici M and Shearer GM.** (1996). Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 9:532-562.
- Majdalawieh A and Ro HS.** (2010). Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  Function and NF- $\kappa$ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflammation*. 2010:823821. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/823821> (cited by 2017 Jan 6).
- Matsuda H, Toguchida I, Ninomiya K, Kageura T, Morikawa T and Yoshikawa M.** (2003). Effects of sesquiterpenes and amino acid-sesquiterpene conjugates from the roots of *Saussurea lappa* on inducible nitric oxide synthesis and heat shock protein in lipopolysaccharide activated macrophages. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 11:709-715.
- Mercurio F, Didonato JA, Rosette C and Karin M.** (1993). p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF- $\kappa$ B-mediated signal transduction. *Genes and Development*. 7:705-718.
- Miceli MC and Parnes JR.** (1993). The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*. 53:59-122.
- Mukaida N, Ishikawa Y, Lkeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K and Matsushima K.** (1996). Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: Biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF- $\kappa$ B and regulation of cytokine production/action through  $\beta_2$  integrin *in vivo*. *Journal of Leukocyte Biology*. 59:145-151.
- Needleman P and Isakson PC.** (1997). The discovery and function of COX-2. *The Journal of Rheumatology. Supplement*. 49:6-8.
- Pae HO, Jeong GS, Kim HS, Woo WH, Rhew HY, Kim HS, Sohn DH, Kim YC and Chung HT.** (2007). Costunolide inhibits production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. *Inflammation Research*. 56:520-526.
- Peirson SN and Butler JN.** (2007). RNA extraction from mammalian tissues. In Rosato E. (ed.), *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology*. Humana Press. New York, NY, USA. p.315-327.
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY and Kim YK.** (2003). Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytotherapy Research*. 17:485-489.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L and Isakson P.** (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:12013-12017.
- Shih ME, Cheng YD, Shen CR and Cherng JY.** (2010). A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *Journal of Natural Medicines*. 64:330-335.
- Shortman K and Backson H.** (1974). The differentiation of T lymphocytes. Part I: Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. *Cellular Immunology*. 12:230-246.
- Soe JS, Lee TH, Lee SM, Lee SE, Seong NS and Kim J.** (2009). Inhibitory effects of methanolic extracts of medicinal plants on nitric oxide production in activated macrophage RAW264.7 cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:173-178.
- Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K and Kadota S.** (2001). Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 77: 209-217.
- Yamamoto Y and Gaynor RB.** (2004). I $\kappa$ B kinases: Key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends in Biochemical Sciences*. 29:72-79.
- Yee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW and Jo SK.** (2000). Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extract in mouse macrophages. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 29:342-348.
- Zheng H, Chen Y, Zhang J, Wang L, Jin Z, Huang H, Man S and Gao W.** (2016). Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation. *Chemico-Biological Interactions*. 250:68-77.