

補中益氣湯의 Lipopolysaccharide와 Interferon- γ 에 의해 유도되는 염증성 매개물에 대한 억제 효과

장선일 · 김형진 · 김용준 · 배현옥¹⁾ · 정현택 · 윤용갑 · 정옥삼²⁾ · 김윤철
임류노피아 부설연구소, ¹⁾원광대학교 의약자원연구센터, ²⁾원광대학교 약학대학 생약학교실

Abstract

Bojungikgitang Inhibits LPS Plus Interferon- γ -induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages

Jang Seon Il, Kim Hyung-Jin, Kim Young-Jun, Pae Hyun-Ock¹⁾,

Chung Hun-Taeg, Yun Yong-Gab, Jeong Ok-Sam²⁾ and Kim Youn-Chul

Immunopia Research Laboratory of Molecular and Cellular Immunology, Iksan 570-749, Korea,

1)Medical Resources Research Center, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea,

2)College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Bojungikgitang is the water extracts prepared from Ginseng Radix, Astragali Radix, Angelicae gigantis Radix, Atractylodis Rhizoma alba, Aurantii nobilis Pericarpium, Glycyrrhizae Radix, Bupleuri Radix, Cimicifugae Rhizoma, which has been used for the treatment of indigestion, and immunological disease in oriental countries. In this study, the effects of Bojungikgitang on the productions of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂), and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were examined using RAW 264.7 macrophages activated with interferon- γ (IFN- γ) plus lipopolysaccharide (LPS). Bojungikgitang

교신저자: 김윤철

전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 약학대학 생약학교실

Tel: 063-850-6823 E-mail: yckim@wonkwang.ac.kr

접수 : 2003/5/24 수정 : 2003/5/30 채택 : 2003/6/23

* 본 연구는 중소기업청에서 주관하는 "2002년도 중소기업기술혁신개발사업(전략과제)"의 일환으로 수행되었음.

(10-400 $\mu\text{g/ml}$) *per se* had no cytotoxic effect in unstimulated macrophages, but this compound dose-dependently reduced the release of NO and PGE₂ caused by stimulation of LPS/IFN- γ . The levels of iNOS and COX-2 protein were markedly suppressed by the treatment with Bojungikgitang in a concentration dependent manner. Moreover, Bojungikgitang also attenuated the production of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. These results suggest that Bojungikgitang decreases the NO and PGE₂ production in macrophages by inhibiting iNOS and COX-2 expression and these properties may contribute to the anti-inflammatory activity of Bojungikgitang.

Key Words : Bojungikgitang, nitric oxide, prostaglandin E₂, inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2.

I. 서 론

補中益氣湯은 우리 나라를 비롯한 동양에서 비위질환(脾胃疾患)에 광범위하게 활용되어 왔다. 즉, 심신평로, 위하수, 자궁출혈, 탈항, 만성장염, 폐결핵 늑막염을 비롯한 압 등 치료에 광범위하게 補中益氣湯이 활용되어 왔다¹⁻⁴⁾. 최근에 補中益氣湯에 대한 효능 연구는 항암효과⁵⁾, 면역 및 항알러지 효과⁶⁾, 항스트레스효과⁷⁾, 허약증 개선 효과, 근육 흥분효과 등의 보고가 있고⁸⁻⁹⁾, 갑상선 항진 효과가 있어 활발히 연구되고 있다. 그러나 강력한 염증성 매개물질로 알려진 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 pro-inflammatory cytokines 등의 억제를 통한 항염증 작용에 대한 연구는 아직 없는 실정이다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부물질에 노출

되면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응에 원인이 되는 많은 인자를 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속시킨다¹⁰⁻¹¹⁾.

Nitric oxide(NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 lipopolysaccharide(LPS)와 interferon- γ (IFN- γ)로 자극될 때 inducible NOS(iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 많은 양의 NO는 염증반응 매개물질의 역할을 하게된다¹²⁻¹⁵⁾. 또한 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 β (IL- β), IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine과 cyclooxygenase-2(COX-2)와 같은 염증 매개물질을 과량 생산하게 된다. 이와 같이 염증 매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, PGE₂, COX-2 및 pro-inflammatory cytokines와

같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 중요한 도움이 될 것이다^{10-11, 12-15}.

최근 천연물로부터 염증반응 억제 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 전개되고 있다¹⁶⁻²⁴. 본 연구에서는 고대로부터 활용되어온 補中益氣湯의 처방전을 이용하여 가온·가압에 의한 가용성 추출물을 얻은 다음 동결건조하여 분말화하고, 이 추출물을 이용하여 LPS와 IFN- γ 또는 LPS만으로 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 분비되는 NO, PGE₂와 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 補中益氣湯은 이들 염증 매개물질을 뚜렷하게 억제시키는 항염증 효과가 있어 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

DMEM과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco/BRL(Grand Island,NY. U.S.A)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO),

3-[4,5-dimethylthiazol-2-L]-2,5-dephenylte trazolium bromide(MTT), trypan blue, DAPI와 propidium iodide(PI)은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Anti-iNOS는 Santa Curz(California, U.S.A.)에서 구입하였다. Anti-COX-2는 BD bioscience(California, U.S.A.)에서 구입하였다. 또한 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂ assay kit은 R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.)사로부터 구입했다. 모든 용매는 분석 등급으로 Sigma와 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2. 補中益氣湯의 추출물 제조

실험에 사용한 補中益氣湯의 구성 약제와 그 양은 Table 1과 같고, 약제는 전북 익산시 소재 한약건재상에서 구입하였으며, 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 증거표본은 원광대학교 약학대학 표본실에 보관 중에 있다. 공기에 충분히 건조된 약제는 절단한 후 세절된 補中益氣湯 약제 300g을 증류수 (1 L)에 넣고 2시간 동안 가온·가압하여 추출한 다음 여과하고 여액을 동결건조하여 추출물 84g을 얻었다.

생약명	Crude drug name	Compositional amount (g)
인삼	Ginseng Radix	6.0
황기	Astragali Radix	8.0
당귀	Angelicae gigantis Radix	6.0
백출	Astractylodis Rhizoma alba	6.0
진피	Aurantii nobilis Pericarpium	6.0
감초	Glycyrrhizae Radix	2.0
시호	Bupleuri Radix	2.0
승마	Cimicifugae Rhizoma	2.0
Total amounts		38.0

3. RAW 264.7 세포주의 배양

補中益氣湯 추출물이 염증반응 매개물질의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 설치류의 대식세포 RAW 264.7을 사용하였다. RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection(ATCC TIB TIB-71, Rockville, MD)에서 구입하여, DMEM 배지로 1×10^6 세포/ml의 농도를 유지했고, 여기에 10%의 열에 비활성화된 우태아 혈청, 페니실린 G (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 μ g/ml) 및 L-글루타민 (2 mM)를 보충하여, 5% CO₂와 95%의 공기를 포함하는 가습 조건하에서 37°C 온도를 유지하여 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 補中益氣湯 추출물을 여러 가지 농도 (10-400 μ g/ml)로 2시간 전 처리하고 10 ng/ml의 LPS와 10 U/ml의 IFN- γ 또는 LPS (100 ng/ml) 단독으로 자극하여 염증 매개물질의 생성능력을 측정하였다.

4. MTT 분석

RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 한 MTT 분석법으로 측정했다. 요약하면 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서 1×10^6 cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 補中益氣湯 추출물을 처리하였다. 18시간동안 배양한 뒤 MTT를 최종농도가 100 μ g/ml이 되도록 처리하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH4.7)을 첨가함으로써 용해했다. Formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

5. 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-아지닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griss reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 540 nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 각각에 100 μ l씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토메타(MD, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

6. Western blot

補中益氣湯 추출물과 LPS (10 ng/ml) + IFN- γ (10 U/ml) 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블래드포드 방법에 따라 정량하고 50 μ g을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 TTBS로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 TBS로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1: 1,000) 또는 anti-COX-2 antibody (1: 1,000)를 주입하여 2 시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG(1 : 100)을 주입하고 1 시간

동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TTBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL 방법으로 발색시켰다.

7. PGE₂와 cytokine 측정

LPS로 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 補中益氣湯 추출물이 PGE₂와 pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6 assay kit(R&D System Inc., Minneapolis, U.S.A.)을 이용하여 ELISA법으로 정량하였다. 즉, 2시간동안 추출물(10-400 μ g/ml)을 전처리하고 6-18시간동안 LPS(100 ng/ml)로 자극한 후 R&D System에서 제공된 방법에 준하여 PGE₂, TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6 등을 측정하였다.

8. 통계 분석

각각의 실험들은 적어도 3번 이상 실행했다. 결과는 평균값 \pm 표준편차로 표현했다. 통계 분석은 Student's t-test를 이용했다.

III. 결 과

1. NO생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

본 연구는 LPS와 IFN- γ 가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 補中益氣湯 추출물의 농도에 따른 NO의 생산량에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 補中益氣湯 추출물의 농도가 50 μ g/ml에서 NO 생성이 유의성있게 감소되었고($p < 0.05$), 100-400 μ g/ml에서는 현저히 감소되었으며($p < 0.01$), 특히 400 μ g/ml의 농도에서는 NO 생성 억

제제로 알려진 N^GMMA 처리군과 비슷하게 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 補中益氣湯 추출물의 농도가 증가할수록 NO 생성이 현저히 억제되었다(Fig. 1-A). 또한 LPS와 IFN- γ 가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 iNOS의 발현을 조사한 결과 NO 생성 억제와 같이 補中益氣湯의 농도가 증가될수록 iNOS 발현이 현저히 억제되었다(Fig. 1-B).

2. PGE₂ 생성 및 COX-2 발현에 미치는 영향

LPS와 IFN- γ 또는 LPS 단독으로 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 補中益氣湯 추출물의 농도에 따른 PGE₂ 생성 및 COX-2 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 補中益氣湯 추출물의 농도가 100 μ g/ml에서 PGE₂ 생성이 유의성있게 감소되었고($p < 0.05$), 200-400 μ g/ml에서는 현저히 감소되었으며($p < 0.01$), 추출물의 농도가 증가할수록 PGE₂ 생성이 현저히 억제되었다(Fig. 2-A). 또한 LPS와 IFN- γ 가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 COX-2의 발현을 조사한 결과 PGE₂ 생성 억제와 같이 補中益氣湯의 농도가 증가될수록 COX-2 발현이 현저히 억제되었다(Fig. 2-B).

3. Pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향

LPS 단독으로 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 補中益氣湯 추출물의 농도에 따른 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 補中益氣湯 추출물의 농도가 100 μ g/ml에서 TNF- α 생성이 유의성있게 감소되었고($p < 0.01$), 추출물의 농도가 증가할수록 현저히 감소되었다(Fig. 3-a). IL-1 β 와 IL-6의 경우 추출물의

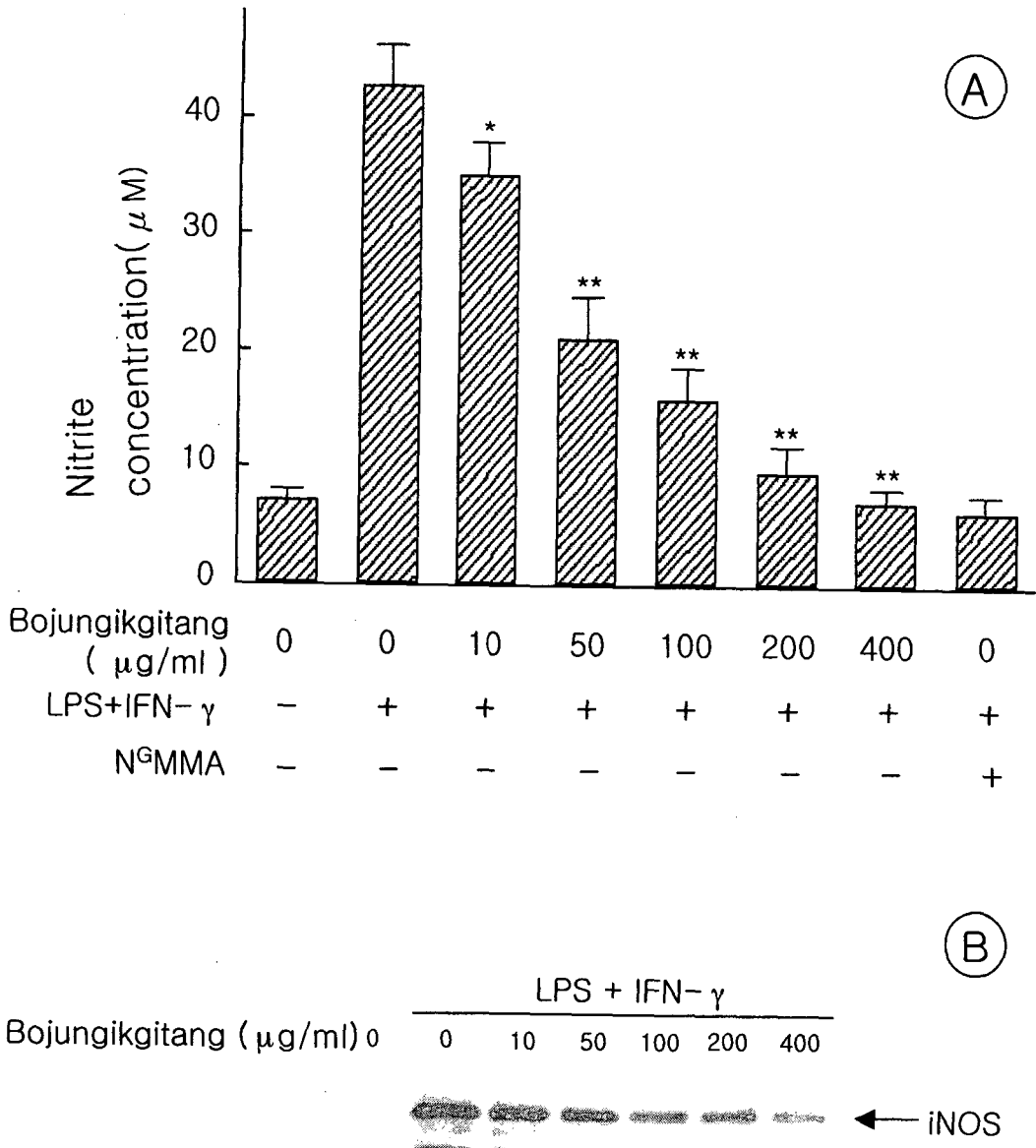


Fig. 1. Effects of Bojungikgitang on IFN- γ /LPS-induced NO production and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with or without IFN- γ (10 U/ml) plus LPS (100 ng/ml) for 18h (NO) or 6h (iNOS) in the presence or absence of scoparone at indicated concentrations. Nitrite accumulation production (A) and iNOS expression (B) in the culture medium or cells were determined as described in Materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. * P <0.05 or ** p <0.01 indicates significant differences from the IFN- α /LPS treated group.

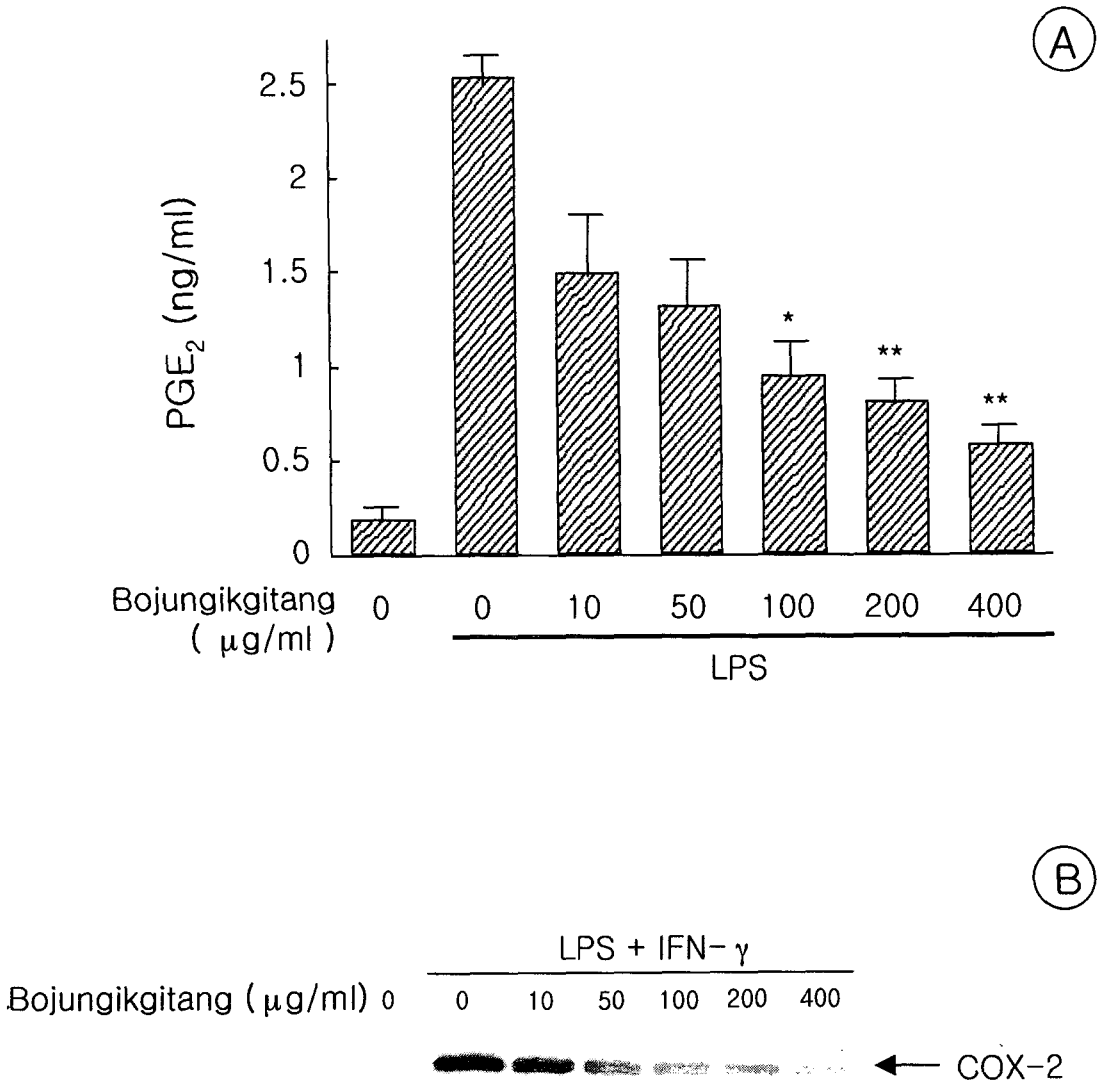
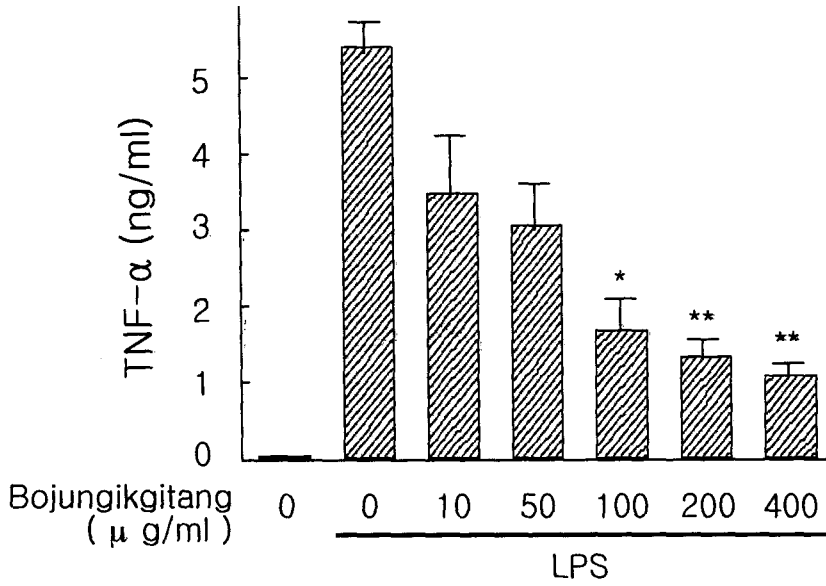
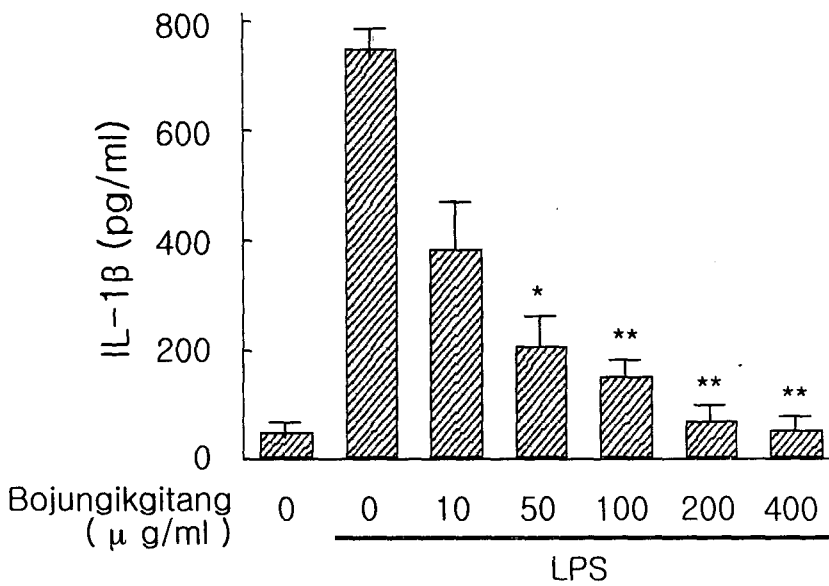


Fig. 2. Effects of scoparone on IFN- γ /LPS-induced PGE₂ production (A) and COX-2 expression (B) in RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with or without IFN- γ (10 U/ml) plus LPS (100 ng/ml) for in the presence or absence of scoparone at indicated concentrations. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods. *P<0.05 or **p<0.01 indicates significant differences from the IFN- γ /LPS treated group.

(A)



(B)



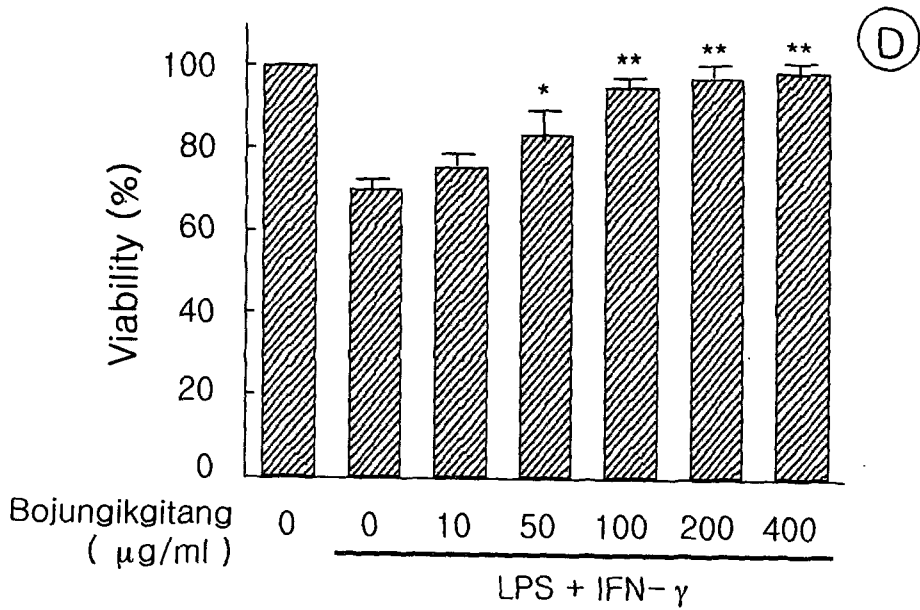
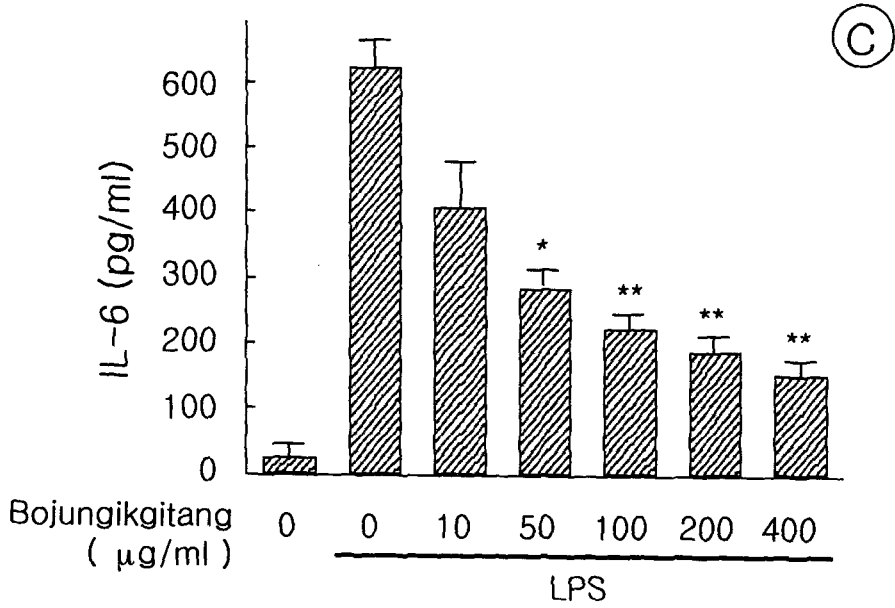


Fig. 3. Effects of Bojungkigatang on LPS-induced cytokine production and on IFN- γ /LPS induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with or without 100 ng/ml LPS for 6h (TNF- α and IL-6) or 12h (IL-1 β) or 10 U/ml IFN- γ plus 100 ng/ml LPS for 24h (cytotoxicity) in the presence or absence of scoparone at indicated concentrations. The productions of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) and the cell viability (D) in the macrophages were determined as described in Materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. *P<0.05 or **p<0.01 indicates significant differences from the IFN- γ /LPS treated group.

농도가 50 μ g/ml에서 유의성있게 감소되었으며(p<0.05), 이들 cytokine의 생성억제는 추출물의 농도가 증가될 수록 현저했다(Fig. 3-b, c).

4. 세포생존율에 미치는 영향

LPS와 IFN- γ 가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 補中益氣湯 추출물의 농도에 따른 세포 생존율을 MTT assay법에 준하여 조사한 결과 Fig. 3-d와 같다. 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS와 IFN- γ 처리군의 생존율은 약 70%로 감소하였으나, 補中益氣湯 추출물을 10-400 μ g/ml의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 높아졌다. 특히 100 μ g/ml의 농도에서는 대조군과 비슷하게 세포 생존율이 향상되었다. 한편 IFN- γ 와 LPS를 처리하지 않고 補中益氣湯 추출물을 10-400 μ g/ml 까지 처리했으나, PBS를 처리한 대조군(95-98%)과 유사하게 세포생존율을 보여 본 실험에서 사용된 補中益氣湯 추출물은 세포독성이 없다는 것을 확인하였다.

IV. 고 찰

補中益氣湯은 우리나라를 비롯한 동양에서 비위질환(脾胃疾患)에 광범위하게 활용되어 왔다. 즉, 심신피로, 위하수, 자궁출혈, 탈항, 만성장염, 폐결핵 늑막염을 비롯한 암 등의 치료에 광범위하게 補中益氣湯이 활용되어 왔다¹⁻⁴⁾. 최근에 補中益氣湯에 대한 효능 연구는 항암효과⁵⁾, 면역 및 항알러지 효과⁶⁾, 항스트레스효과⁷⁾, 허약증 개선 효과, 근육 흥분효과 등의 보고가 있고⁸⁻⁹⁾, 갑상선 항진 효과가 있어 활발히 연구되고 있다. 특히 Tokura 등(1998)은 아토피성 피부질환 환자에 補中益氣湯을 지속적으로 경구투여한 결과 Th1 cytokine의 대표적인 IFN- γ 의 생성이 대조군에 비해 현저히 증가되었으며, 재조합 IFN- γ 를 투여한 실험군에서 보다 유의성 있게 IFN- γ 의 생성을 증가시켜, 아토피성 피부질환과 같은 알러지성 질환의 치료에 중요하게 활용될 수 있을 것이라 보고한 바 있다. 그러나 알러지성 질환을 포함한 관절염 등 각종 염증성 면역질환을 야기하는 염증성매개물에 대한 조사는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 補中益氣湯의 처방전을 활용하여 가운·가압에 의한

가용성 추출물을 얻은 다음 동결건조한 후 분말화하고, 이 추출물을 이용하여 LPS와 IFN- γ 또는 LPS만으로 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 분비되는 NO, PGE₂, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부물질에 노출되면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응에 원인이 되는 많은 인자들을 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속시킨다¹⁰⁻¹¹. 염증성 매개물질로는 NO, PGE₂와 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등과 같은 pro-inflammatory cytokine이 잘 알려져 있다.

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. 특히 LPS와 IFN- γ 로 대식세포를 자극하면 iNOS가 과량 발현되면서 많은 양의 NO를 생성하게 된다¹²⁻¹⁵. NO는 외부물질에 대한 개체 방어 작용에 중요한 생체 분자지만, 많은 양의 NO가 생산되면, 염증반응 매개물질로 작용하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등 pro-inflammatory cytokine 뿐만 아니라 PGE₂ 및 COX-2의 분비를 촉진하여 심각한 염증반응을 일으킨다. 따라서 본 연구에서는 補中益氣湯 추출물이 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 염증성 매개물질의 생성 및 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 추출물의 농도에 의존적으로 NO의 생산량이 현저히 감소되었으며, 그 원인은 iNOS 발현의 억제를 바탕으로 억제됨을 확

인할 수 있었다(Fig. 1)

또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다¹³. 그래서 본 연구에서도 NO 생산에 직접적으로 영향을 미치는 iNOS의 발현과 염증반응 매개물질로 알려진 COX-2의 발현을 immunoblot 방법으로 조사하였다. 그 결과 補中益氣湯 추출물의 농도가 증가할수록 PGE₂의 생성과 COX-2의 발현이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

한편 補中益氣湯 추출물이 pro-inflammatory cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 설치류 RAW 264.7 대식세포를 대상으로 여러 가지 다른 농도로 추출물을 2시간 전 처리한 후 LPS로 6-18시간 자극하여 배양액으로 방출된 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 농도를 ELISA법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 補中益氣湯 추출물의 농도가 증가할수록 이들 cytokine의 생성이 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다.

최근 인체 질환 치료에 적용할 수 있는 새로운 대상의 의약품소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있는데, 특히 천연물을 대상으로 그 연구가 진행되고 있다. 즉, 천연물 유래 flavonoid계열 중 genistin, bacalin, wogonin 등은 pro-inflammatory cytokine, NO 및 COX-2와 같은 염증 매개물질을 억제시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻²⁴. 저자들은 이미 인진속으로부터 분리한 coumarin계열의 scopoletin 단일화합물이 염증 매개물질인 NO를 현저히 감소시킨다

는 사실을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 補中益氣湯 조성약제로부터 분리한 가용성 추출물질이 염증반응에 매우 중요한 매개물질인 NO, COX-2, PGE₂뿐만 아니라 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등과 같은 pro-inflammatory cytokine을 효과적으로 억제시키는 결과를 얻었다. 따라서 補中益氣湯 추출물은 항염증 치료제로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

V. 결 론

補中益氣湯은 人參, 黃芪, 當歸, 白朮, 陳皮, 甘草, 柴胡, 升麻 등으로 조성된 동양의 전통 처방 약물로 소화기관질환을 비롯한 심신 피로회복, 체력증진 등에 활용되어왔다. 따라서 본 연구는 補中益氣湯의 가용성 추출물을 이용하여 LPS 또는 LPS+IFN- γ 로 자극된 설치류 RAW 264.7 대식세포를 대상으로 NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등의 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현을 조사하였다. 그 결과 補中益氣湯 추출물은 NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등의 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현을 중요하게 억제시켰다. 이러한 결과는 補中益氣湯 추출물이 항염증 효과를 포함한 지금까지 알려진 약리 효과가 있음을 설명해주고, 과량의 염증성 매개물 생성과 관련된 면역질환의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

참 고 논 문

1. 李東垣: 東垣醫集-內外傷辨惑論, 北京, 人民衛生出版社, p.18, 1993.
2. 李東垣: 東垣醫集-脾胃論, 北京, 人民衛生出版社, p.81, 1993.
3. 韓醫科大學方劑學教授: 方劑學, 서울, 永林社, pp.279-282, 1990.
4. 裘沛然: 中醫歷代名方集成, 上海, 上海辭書出版社, pp.16-20, 1994.
5. 金秀鎭: 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 항종양효과와 Cyclophospamide에 의한 부작용에 미치는 영향, 대전대학교대학원 석사학위논문, 1993.
6. 李承龍: 補中益氣湯 및 補中益氣湯 加味方이 흰쥐의 알레르기 천식에 미치는 영향, 東義大學校大學院 博士學位論文, 1999.
7. 金泰燁: 補中益氣湯의 항스트레스효과에 대한 실험적 연구, 경희대학교대학원 석사학위논문, 1990.
8. 安光武: 少陰人 補中益氣湯과 後世方 補中益氣湯이 陽虛病證에 미치는 影響, 경희대학교대학원 석사학위논문, 1995.
9. 尹用甲: 補中益氣湯 및 加減方이 家兔의 적출자궁, 장 및 혈관운동에 미치는 영향, 圓光大學校大學院 博士學位論文, 1988.
10. Miyasaka N., and Hirata Y.. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.* 1997; 61: 2073-2081.
11. Luster M.I, Simeonova P.P., Gallucci R.M., Bruccoleri A., Blazka M.E., and Yucesoy B.. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* 2001; 120: 317-321.
12. Chung H.T., Pae H.O., Choi B.M., Billiar T.R., and Kim Y.M.. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282: 1075-1079.
13. Needleman P., and Isakson P.C.. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol.* 1997 ; 24 Suppl 49: 6-8.
14. Brieva A., Guerrero A., Alonso-Lebrero J.L., and Pivel J.P.. Immunoferron, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF- α production and inflammatory responses. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1: 1979-1987.
15. Wang Y., Vodovotz Y., Kim P.K., Zamora R., and Billiar T.R.. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 962: 415-422.
16. Schinella G.R., Tournier H.A., Prieto J.M., Riios J.L., Buschiazzo H., and Zaidenberg A.. Inhibition of Trypanosoma cruzi growth by medical plant extracts. *Fitoterapia.* 2002 ; 73: 569-575.
17. Kang S.Y., Lee K.Y., Park M.J., Kim Y.C., Markelonis G.J., Oh T.H., and Kim Y.C.. Decursin from Angelica gigas mitigates amnesia induced by scopolamine in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2003; 79: 11-18.
18. Jing-Ping O.Y., Baohua W., Yongming L., Lei W., and Jingwei Y.. Effect of angelica on the expressional changes of cytokines in endothelial cells

- induced by hyperlipidemic serum. *Biorheology*. 2003; 40: 395-399.
19. Wilasrusmee C., Siddiqui J., Bruch D., Wilasrusmee S., Kittur S., and Kittur D.S.. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am Surg*. 2002; 68: 860-864.
 20. Kang T.H., Pae H.O., Jeong S.J., Yoo J.C., Choi B.M., Jun C.D., Chung H.T., Miyamoto T., Higuchi R., and Kim Y.C.. Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*. *Planta Med*. 1999; 65: 400-403.
 21. Park B.K., Heo M.Y., Park H., Kim H.P.. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Eur J Pharmacol*. 2001; 425: 153-157.
 22. Nakagawa T., Yokozawa T.. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol*. 2002; 40: 1745-1750.
 23. Seo W.G, Pae H.O., Oh G.S., Chai K.Y., Kwon T.O., Yun Y.G., Kim N.Y., Chung H.T.. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol*. 2001; 76: 59-64.
 24. An S.J., Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Jeong S., Jang S.I., Oh H., Kwon T.O., Song C.E., and Chung H.T.. Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 productions and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol*. 2002; 2: 1173-1181.