

# 가감보중익기탕의 LPS 유도 염증성 매개물에 대한 억제 효과

장선일 · 김형진 · 김용준 · 배현옥<sup>1</sup> · 정헌택 · 정옥삼<sup>2</sup> · 김윤철 · 윤용갑<sup>3\*</sup>

임류노피아 부설연구소, 1: 원광대학교 의약자원연구센터, 2: 원광대학교 약학대학 생약학교실, 3: 원광대학교 한의과대학 방제학교실

## Kagam-bojungikgitang Inhibits LPS-induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages

Seon Il Jang, Hyung Jin Kim, Young Jun Kim, Hyun Ock Pae<sup>1</sup>,  
Hun Taeg Chung, Ok Sam Jeong<sup>2</sup>, Youn Chul Kim, Yong Gab Yun<sup>3\*</sup>

*Immunopia Research Laboratory of Molecular and Cellular Immunology, 1: Medical Resources Research Center, Wonkwang University, 2: College of Pharmacy, Wonkwang University, 3: Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University*

Kagam-bojungikgitang is the water extracts prepared from Ginseng Radix, Astragali Radix, Angelicae gigantis Radix, Astractylodis Rhizoma alba, Aurantii nobilis Pericarpium, Glycyrrhizae Radix, Artemisiae iwayomogii Herba, and Scutellariae Radix. This is a modified prescription of Bojungikgitang, which has been used for the treatment of indigestion, and immunological disease in oriental countries. In this study, the effects of Kagam-bojungikgitang and Bojungikgitang on the production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) were examined using RAW 264.7 macrophages activated with lipopolysaccharide (LPS). Both prescriptions dose-dependently reduced the release of PGE<sub>2</sub> and expression of COX-2 caused by stimulation of LPS without cytotoxic effect. Kagam-bojungikgitang's inhibitory effects were better than Bojungikgitang in PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression. Moreover, Kagam-bojungikgitang also attenuated markedly the production of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and IL-6 than Bojungikgitang in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. These results suggest that Kagam-bojungikgitang decreases PGE<sub>2</sub> and pro-inflammatory cytokine production in macrophages and these properties may contribute to the anti-inflammatory activity of Kagam-bojungikgitang.

Key words : Kagam-bojungikgitang, prostaglandin E<sub>2</sub>, pro-inflammatory cytokine, cyclooxygenase-2

### 서 론

補中益氣湯은 한국, 중국, 일본을 비롯한 동양권에서 중기하함(中氣下陷)의 병리 및 비위질환(脾胃疾患)에 광범위하게 활용되어 왔다. 특히, 심신피로, 위하수, 자궁출혈, 탈항, 만성장염, 폐결핵, 녹막염을 비롯한 암 등 치료에도 광범위하게 補中益氣湯이 활용되어 왔다<sup>1-5</sup>. 최근에 補中益氣湯에 대한 효능 연구는 항암효과<sup>6</sup>, 면역 및 항알러지 효과<sup>7</sup>, 항스트레스효과<sup>8</sup>, 허약증 개선 효과, 근육흥분효과 등의 보고가 있고<sup>9-10</sup>, 항암 및 감상선에 대한 효과 등이 활발히 연구되고 있다. 최근에는 다양하고 광범위한 생명과학적 방법론을 이용함으로써 한의학적 원리들이 입증되어 나아가고 있는 실정이다. 특히, 천연물로부터 염증성 매개물질로 알려진 nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), cyclooxygenase-2

(COX-2)와 pro-inflammatory cytokines 등을 억제시킬 수 있는 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 전개되고 있다. 최근 저자들도 인진호(*Artemisia capillaris*)로부터 scoparone과 땃쑥(*Artemisia feddei*) 유래 scopoletin을 분리하여 PGE<sub>2</sub>을 비롯한 pro-inflammatory cytokine의 생성을 억제하는 효과를 발견하고 그 결과물을 보고한 바 있고<sup>11-12</sup> 황금(*Scutellaria baicalensis*) 유래 baicalin이 acetaminophen으로 유발된 간독성을 보호하는데 뛰어난 효과가 있음을 보고한 바 있다<sup>13</sup>. 또한 補中益氣湯을 이용하여 가온·가압에 의한 가용성 추출물을 얻은 다음 동결 건조한 후 분말화 하고, 이 추출물을 이용하여 LPS+IFN- $\gamma$  또는 LPS 단독으로 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 분비되는 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 염증 매개물질을 효과적으로 억제하여 보고하였다<sup>14</sup>. 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

\* 교신저자 : 윤용갑, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학  
· E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6834  
· 접수 : 2003/03/30 · 수정 : 2003/04/23 · 채택 : 2003/05/28

되는 많은 인자를 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속시킨다. 대식세포는 그람-음성 세균에 함유되어 있는 lipopolysacchride (LPS)로 자극될 때 cyclooxygenase-2의 발현으로 염증성 매개물질인 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 과량 생성하게 된다<sup>15-18</sup>. Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은 양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다<sup>16</sup>. 또한 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ , interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생성하여 더욱더 염증반응을 가속화함으로써 각종 염증성 질환을 유발한다<sup>11-12,17</sup>. 따라서 COX-2의 발현을 억제하고, PGE<sub>2</sub> 및 pro-inflammatory cytokine 등과 같은 염증성 매개물질의 생성을 강하게 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 중요한 도움이 될 것이다. 따라서 보다 강력한 염증 매개물질을 억제할 수 있는 한약제재를 개발하기 위해서 기존 補中益氣湯의 구성약물중 升麻와 柴胡를 대신하여 한인진(*Artemisiae iwayomogii*)과 黃芩(*Scutellaria baicalenensis*)을 가미하여 加減補中益氣湯을 제조하고 그 추출물이 LPS로 자극된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 생성하는 염증성 매개물질을 억제하는데, 기존의 補中益氣湯 보다 효과가 뛰어나 그 결과를 보고하고자 한다.

## 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-dephenyltetrazolium bromide(MTT), trypan blue, DAPI와 propidium iodide(PI)은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Anti-COX-2는 Santa Cruz(California, U.S.A)에서 구입하였다. 또한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub> assay kit은 R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.)사로부터 구입했다. 모든 용매는 분석 등급으로 Sigma와 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

Table 1. Prescription of Kagam-bojungikgi-tang and Bojungikgi-tang

생약명	Crude drug name	Compositional amount(g)	
		Kagam-bojungikgitang	Bojungikgitang
인삼	Ginseng Radix	6.0	6.0
황기	Astragali Radix	8.0	8.0
당귀	Angelicae gigantis Radix	6.0	6.0
백출	Astractylodis Rhizoma alba	6.0	6.0
진피	Aurantii nobilis Pericarpium	6.0	6.0
감초	Glycyrrhizae Radix	2.0	2.0
시호	Buplerui Radix	-	2.0
승마	Cimicifugae Rhizoma	-	2.0
한인진	Artemisiae iwayomogii	2.0	-
황금	Herba Scutellariae Radix	2.0	-
Total amounts		38.0	38.0

### 2. 加減補中益氣湯과 補中益氣湯의 추출물 제조

실험에 사용한 加減補中益氣湯과 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 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 약제를 각각 300g씩 증류수 (1 L)에 넣고 2시간 동안 가운·가압하여 추출한 다음 여과하고 여액을 동결건조하여 추출물 84g을 얻었다.

### 3. RAW 264.7 세포주의 배양

加減補中益氣湯과 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  $1 \times 10^6$  세포/ml의 농도를 유지했고, 여기에 10%의 열에 비활성화된 우태아 혈청, 페니실린 G (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100  $\mu$ g/ml) 및 L-글루타민 (2 mM)을 보충하여, 5% CO<sub>2</sub>와 95%의 공기를 포함하는 가슴 조건하에서 37 $^{\circ}$ C 온도를 유지하여 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물을 여러 가지 농도 (10-400  $\mu$ g/ml)로 2시간 전 처리하고, 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  $1 \times 10^6$  cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물을 처리하였다. 18시간동안 배양한 뒤 MTT를 최종농도가 100  $\mu$ g/ml 이 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. Western blot

加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물, 그리고 LPS (100 ng/ml)가 처리된 세포들을 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50  $\mu$ 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 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 TTBS로 3회 세척하고 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 ECL방법으로 발색시켰다.

6. PGE<sub>2</sub>와 cytokine 측정

LPS로 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물이 PGE<sub>2</sub>와 pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 assay kit(R&D System Inc., Minneapolis, U.S.A.)을 이용하여 ELISA법으로 정량하였다. 즉, 2시간동안 추출물(10-400  $\mu$ g/ml)을 전처리하고 6-18시간동안 LPS(100 ng/ml)로 자극한 후 R&D System에서 제공된 방법에 준하여 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 및 IL-6 등을 측정하였다.

7. 통계 분석

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

결 과

1. PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향

LPS(100 ng/ml)로 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물의 농도에 따른 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 加減補中益氣湯 추출물의 농도가 50  $\mu$ g/ml에서 PGE<sub>2</sub> 생성이 유의성 있게 감소되었고(p<0.05), 100-400  $\mu$ g/ml에서는 현저히 감소되었으며(p<0.01), 추출물의 농도가 증가할수록 PGE<sub>2</sub> 생성이 현저히 억제되었다(Fig. 1). 補中益氣湯의 경우 추출물의 농도가 100  $\mu$ g/ml에서 PGE<sub>2</sub> 생성이 유의성 있게 감소되었고(p<0.05), 100-400  $\mu$ g/ml에서는 현저히 감소되었으며(p<0.01), 추출물의 농도가 증가할수록 PGE<sub>2</sub> 생성이 현저히 억제되었다. 이상의 결과는 加減補中益氣湯이 補中益氣湯 보다 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과가 우수하였다.

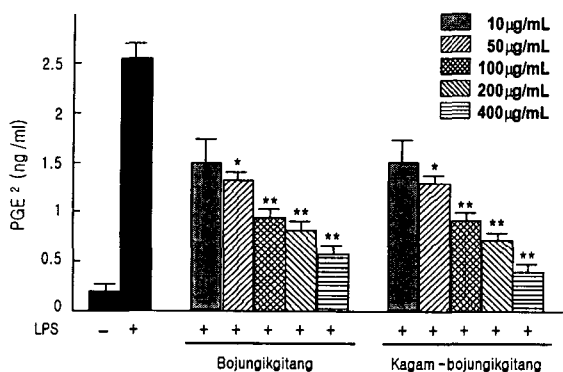


Fig. 1. Effects of Kagam-bojungkigtang on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with or without LPS (100 ng/ml) for in the presence or absence of Kagam-bojungkigtang or Bojungkigtang at indicated concentrations. PGE<sub>2</sub> assay was carried out as described in Materials and methods. \*P<0.05 or \*\*p<0.01 indicates significant differences from the LPS treated group.

2. COX-2 발현에 미치는 영향

LPS(100 ng/ml)로 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물의 농도에 따른 COX-2 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 COX-1의 발현은 본 연

구에서 사용된 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물의 농도에 관계없이 일정하게 발현되었으나, inducible COX-2의 경우 加減補中益氣湯은 50  $\mu$ g/ml에서, 補中益氣湯은 100  $\mu$ g/ml에서 유의성 있게 발현이 감소되었고(p<0.05), 200-400  $\mu$ g/ml에서는 2가지 탕제의 추출물이 유사하게 현저히 감소되었으며(p<0.01), 추출물의 농도가 증가할수록 COX-2 생성이 현저히 억제되었다(Fig. 2).

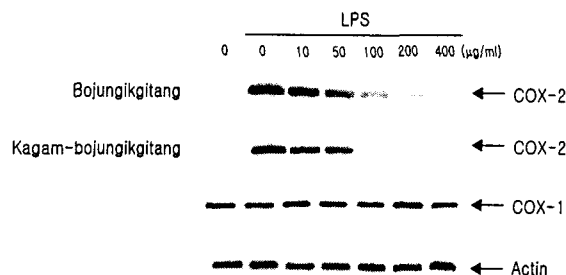


Fig. 2. Effects of Kagam-bojungkigtang on LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with or without LPS (100 ng/ml) for in the presence or absence of Kagam-bojungkigtang or Bojungkigtang at indicated concentrations. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

3. Pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향

LPS(100 ng/ml)로 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물의 농도에 따른 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 加減補中益氣湯 50  $\mu$ g/ml에서, 補中益氣湯이 100  $\mu$ g/ml에서 유의성 있게 발현이 감소되었고(p<0.05), 농도 의존적으로 감소되었으며(p<0.01), 加減補中益氣湯이 억제 효과가 우수하였다.(Fig. 3-A, C) IL-1 $\beta$ 의 경우, 補中益氣湯이 50  $\mu$ g/ml에서, 加減補中益氣湯이 100  $\mu$ g/ml에서 유의성(p<0.05)있게 발현이 감소되어 補中益氣湯이 加減補中益氣湯보다 그 효과가 좋았으나, 각 추출물의 농도가 200  $\mu$ g/ml 이상에서는 그 효과가 유사하였다(Fig. 3-B).

4. 세포생존율에 미치는 영향

LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 加減補中益氣湯과 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 LPS 처리군의 생존율은 약 80%로 감소하였으나, 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물을 10-400  $\mu$ g/ml의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 높아졌다. 특히 100  $\mu$ g/ml의 농도에서는 대조군과 비슷하게 세포 생존율이 향상되었고, 이들 약물의 효과는 유사하였다. 한편 LPS를 처리하지 않고, 이들 약물의 추출물을 10-400  $\mu$ g/ml 까지 처리했으나, PBS를 처리한 대조군(95-98%)과 유사하게 세포생존율을 보여 본 실험에서 사용된 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물은 세포독성이 없는 것을 확인하였다

고찰

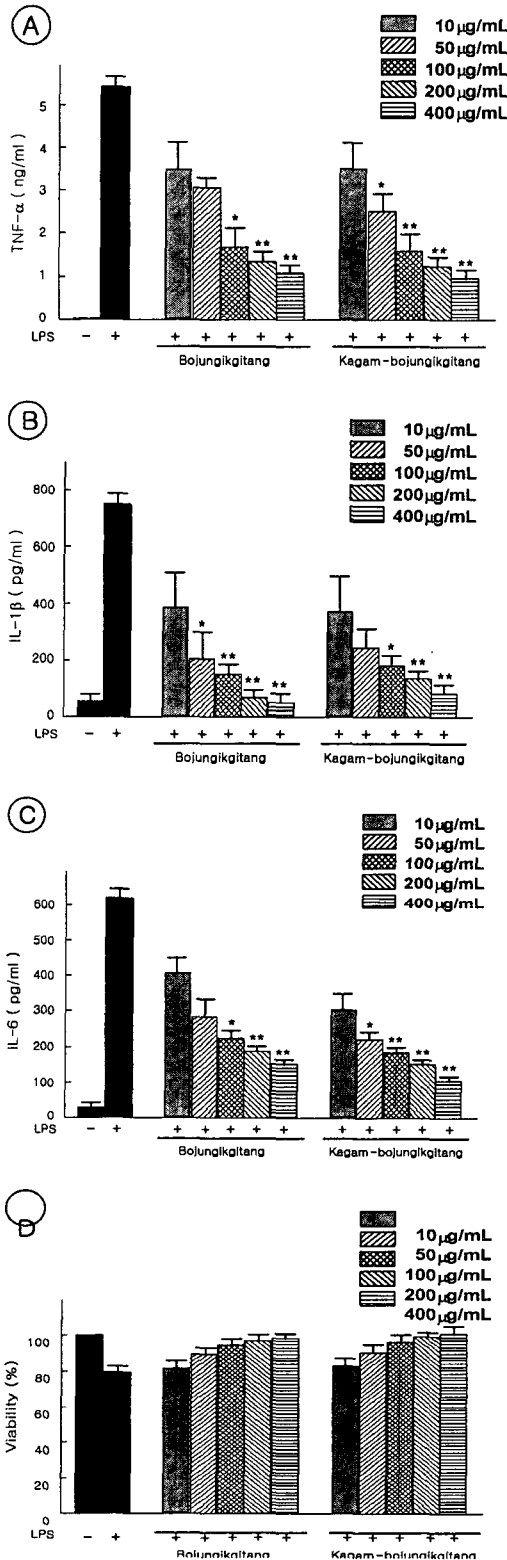


Fig. 3. Effects of Kagam-bojungkitang on LPS-induced cytokine production and cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with or without 100 ng/ml LPS for 6h (TNF-α and IL-6), 12h (IL-1β), and 24h (cytotoxicity) in the presence or absence of Kagam-bojungkitang or Bojungkitang at indicated concentrations. The productions of TNF-α (A), IL-1β (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 ± S.D. from three independent experiments. \*P<0.05 or \*\*p<0.01 indicates significant differences from the LPS treated group.

補中益氣湯은 우리나라를 비롯한 동양에서 비위질환(脾胃疾患)에 광범위하게 활용되어 왔다. 특히, 심신피로, 위하수, 자궁출혈, 탈항, 만성장염, 폐결핵, 녹막염을 비롯한 암 등 치료에도 補中益氣湯을 사용하고 있다<sup>1-5)</sup>. 최근에 補中益氣湯에 대한 효능 연구는 항암효과<sup>6)</sup>, 면역 및 항알러지 효과<sup>7)</sup>, 항스트레스효과<sup>8)</sup>, 허약증 개선 효과, 근육 흥분효과 등의 보고가 있고<sup>9-10)</sup>, 감상선 항진 효과 등이 활발히 연구되고 있다. 특히 Tokura 등(1998)은 아토피성 피부질환 환자에 補中益氣湯을 지속적으로 경구투여한 결과 Th1 cytokine의 대표적인 IFN-γ의 생성이 대조군에 비해 현저히 증가되었으며, 재조합 IFN-γ를 투여한 실험군에서 보다 유의성 있게 IFN-γ의 생성을 증가시켜, 아토피성 피부질환과 같은 알러지성 질환의 치료에 중요하게 활용될 수 있을 것이라 보고한 바 있다. 최근 저자들은 인진초 (*Artemisia capillaris*)로부터 scoparone과 땃쑥(*Artemisia feddei*) 유래 scopoletin을 분리하여 PGE<sub>2</sub>를 비롯한 nitric oxide(NO), TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성과 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 COX-2의 발현을 억제하는 효과를 발견하고 그 결과물을 보고한 바 있고<sup>11-12)</sup>. 황금 (*Scutellaria baicalensis*) 유래 baicalin을 대상으로 acetaminophen으로 유발된 간독성을 보호하는데 뛰어난 효과가 있음을 보고한 바 있다<sup>13)</sup>. 또한 補中益氣湯 추출물의 처방전을 이용하여 가온·가압에 의한 가용성 추출물을 얻은 다음 동결건조 한 후 분말화하고, 이 추출물을 이용하여 LPS와 IFN-γ 또는 LPS만으로 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 분비되는 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 염증 매개물질을 효과적으로 억제하여 보고하였다<sup>14)</sup>.

이와 같이 저자들은 기존의 처방보다 강력한 항염증 제재를 발굴하고자 지금까지 연구한 결과물을 바탕으로 補中益氣湯 구성약물중 승마와 시호를 제거하고 한인진과 황금을 가미하여 加減補中益氣湯을 제조하고 동결건조하여 그 추출물이 LPS로 자극된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 생성하는 염증성 매개물질을 억제하는 효과를 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 가속시킨다<sup>15-18)</sup>. 염증성 매개물질로는 PGE<sub>2</sub>와 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등과 같은 pro-inflammatory cytokine이 잘 알려져 있다. 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 알려졌다<sup>16)</sup>. 따라서 본 연구에서는 COX-2의 발현을 immunoblot 방법으로 조사하였다. 그 결과 加減補中益氣湯과 補中益氣湯 추출물의 농도가 증가할수록 PGE<sub>2</sub>의 생성과 COX-2의 발현이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이들의 효과는 加減補中益氣湯이 補中益氣湯 보다 우수하였음을 시

사해주고 있다. 한편 加減補中益氣湯과 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 농도를 ELISA법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 加減補中益氣湯과 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 있다<sup>19-27)</sup>. 저자들은 이미 인진속으로부터 분리한 coumarin계열의 scopoletin 단일화합물이 염증 매개물질인 NO를 현저히 감소시킨다는 사실을 보고한 바 있다<sup>11)</sup>.

본 연구에서도 加減補中益氣湯 약제로부터 분리한 가용성 추출물질이 염증반응에 매우 중요한 매개물질인 PGE<sub>2</sub>뿐만 아니라 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 등과 같은 pro-inflammatory cytokine을 강력하게 억제시키는 결과를 얻었다. 따라서 加減補中益氣湯은 補中益氣湯과 같이 항염증 치료제로 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 그러나 앞으로 加減補中益氣湯의 약리기전과 약물동태는 면역세포 및 동물실험에서 더욱더 상세하게 확인해야 할 필요성이 있다.

## 결 론

본 연구에 활용한 加減補中益氣湯은 補中益氣湯 처방을 바탕으로 시호와 승마를 대신에 한인진과 황금을 가미하고, 그 약제는 人參, 黃芪, 當歸, 白朮, 陳皮, 甘草, 枳殼, 黃芩 등으로 조성한 후 기존의 처방전인 補中益氣湯과 항염증 효과를 비교하기 위해서 加減補中益氣湯과 補中益氣湯의 가용성 추출물을 이용하여 LPS로 자극된 설치류 RAW 264.7 대식세포를 대상으로 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 등의 생성과 COX-2의 발현을 조사하였다.

그 결과 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-6 생성 억제 효과는 加減補中益氣湯이 補中益氣湯 보다 우수하였다. 이러한 결과는 加減補中益氣湯 추출물이 항염증 효과를 포함한 지금까지 알려진 약리 효과가 있음을 설명해주고, 과량의 염증성 매개물 생성과 관련된 면역질환의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부의 벤처 및 중소기업기술개발지원 연구개발사업(01-PJ4-PG4-01VN01-0325)과 2002년도 원광대학교 교비 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 참고논문

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, p.279-282, 1990.  
 4. 尹用甲: 東醫方劑와 處方解說, p.299-318, 1998  
 5. 裘沛然: 中醫歷代名方集成, 上海, 上海辭書出版社, p.16-20, 1994.  
 6. 金秀鎮: 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 항종양효과와 Cyclophosphamide에 의한 부작용에 미치는 영향, 대전대학교대학원 석사학위논문, 1993.  
 7. 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.  
 8. 金泰輝: 補中益氣湯의 항스트레스효과에 대한 실험적 연구, 경희대학교대학원 석사학위논문, 1990.  
 9. 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.  
 10. 尹用甲: 補中益氣湯 및 加減方이 家兔의 적출자궁, 장 및 혈관 운동에 미치는 영향, 圓光大學校大學院 博士學位論文, 1988.  
 11. Jang S.I, Kim H.J, Kim Y.J, Chung H.T, Yun Y.G, Kang T.H, Kim Y.C.. Inhibition of LPS plus IFN- $\gamma$  induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophage by Scoparone. J Ethnopharmacol. 2003 (In press).  
 12. Kim H.J, Jang S.I, Kim Y.J, Chung H.T, Yun Y.G, Kang T.H, Kim Y.C.. Scopoletin from Artemisia feddei Inhibits COX-2 Expression and PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 production in RAW 264.7 Cell. Phytother Res. 2003 (In press).  
 13. Jang S.I, Kim H.J, Hwang K.M, Jekal S.J, Pae H.O, Choi B.M, Yun Y.G, Kwon T.O, Chung H.T.. Hepatoprotective effect of Bacalin, a major flavone from Scutellaria radix, on acetaminophen induced liver injury in mice. Immunopharm Immunot. 2003 (In press).  
 14. Jang S.I, Kim H.J, Kim Y.J, Pae H.O, Chung H.T, Yun Y.G, Jeong O.S, Kim Y.C.. Bojungkigatang Inhibits LPS plus IFN- $\gamma$  induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophage. 대한 한의학 방제학 교지. 2003  
 15. 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. 282: 1075-1079, 2001.  
 16. Needleman P., and Isakson P.C.. The discovery and function of COX-2. J Rheumatol. 1997 ; 24 Suppl 49: 6-8.  
 17. Brieva A., Guerrero A., Alonso-Lebrero J.L., and Pivel J.P.. Immunoferon, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF-alpha production and inflammatory responses. Int Immunopharmacol. 1: 1979-1987, 2001.  
 18. Wang Y., Vodovotz Y., Kim P.K., Zamora R., and Billiar T.R.. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. Ann N Y Acad Sci. 962: 415-422, 2002.  
 19. Schinella G. R., Tournier H. A., Prieto J. M., Rios J. L.,

- Buschiazzo H., Zaidenberg A.. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia*. 73: 569-575, 2002.
20. 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*. 79: 11-18, 2003.
21. 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*. 40: 395-399, 2003.
22. Wilasrusmee C., Siddiqui J., Bruch D., Wilasrusmee S., Kittur S., and Kittur D.S.. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am Surg*. 68: 860-864, 2002.
23. 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*. 65: 400-403, 1999.
24. 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*. 425: 153-157, 2001.
25. Nakagawa T., Yokozawa T.. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol*. 40: 1745-1750, 2002.
26. 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*. 76: 59-64, 2001.
27. 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-alpha, IL-1beta, and IL-6 productions and NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol*. 2: 1173-1181, 2002.