

## 增液湯 물추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 Nitric Oxide 및 Cytokine에 미치는 영향

안선준<sup>1</sup>, 이종록<sup>1</sup>, 김상찬<sup>1,2</sup>, 지선영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 한의과대학, <sup>2</sup>한방신약개발연구팀(BK21)

### ABSTRACT

## Inhibitory Effect of Jeungaektang Water Extract on Nitric Oxide and Cytokine Production in Lipopolysaccharide - activated RAW 264.7 Cells

Sun-June Ahn<sup>1</sup>, Jong Rok Lee<sup>1</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2</sup>, Seon-Young Jee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Oriental Medicine, <sup>2</sup>Development Team for The New Drug of Oriental Medicine (BK21 program)  
Daegu Haany University, Daegu 706-080, Republic of Korea

Jeungaektang (JAT) is the herbal formula, has the effect of moistening the dryness by activating lung *Qi* and by nourishing *Yin*, has being used for dryness syndromes. Generally the herbal formulae for moistening dryness are used for exogenous or endogenous dryness syndromes. JAT has been clinically used for the treatment of endogenous dryness syndromes. It is composed of *Scrophulariae Radix*, *Rehmanniae Radix* and *Liriopsis Tuber*. Recent studies showed that JAT has a protective effect against  $CCl_4$ -induced hepatotoxicity and anti-inflammatory effects against ear swelling of mouse induced by *Crotonis Fructus*.

However, the effect of JAT on the immunological activity was rarely studied. Therefore, this study

- 
- 교신저자 : 지선영
  - 대구광역시 수성동 상동 165번지 대구한의대학교
  - Tel : 053-770-2130 Fax: 053-768-6340 E-mail : jeesy@dhu.ac.kr
  - 접수 : 2007/ 4/ 25 수정 : 2007/ 6/ 26 채택 : 2007/ 6/ 27

evaluated the effects of JAT the regulatory mechanism of nitric oxide (NO) and cytokines in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. After the treatment of JAT water extract, cell viability was measured by MTT assay, NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were determined by immunoblot analysis, and levels of cytokine were analyzed by sandwich immunoassays.

Results provided evidence that JAT inhibited the production of nitrite and nitrate (0.1~1.0 mg/ml), iNOS (0.1~1.0 mg/ml), interleukin-1 $\beta$  (0.1~1.0 mg/ml) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (0.1~1.0 mg/ml) in RAW 264.7 cells activated with LPS. Furthermore, JAT inhibited the expression of COX-2 expression and production of prostaglandin E2 (0.1~1.0 mg/ml).

These findings suggest that JAT can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

**Key words** : Jeungaektang (JAT), iNOS, COX-2, LPS, cytokine

## 1. 서 론

增液湯은 溫病條辨의 卷二 中焦篇에 기재된 方劑로서 玄蔘, 麥門冬, 生地黃으로 구성되어 있다. 滋陰清熱, 潤燥通便하는 효능이 있어 陽明溫病에 津液不足으로 大便이 乾結하거나, 口渴하고, 舌質은 紅色을 띠고 건조하며, 脈狀이 沈하고 無力한 증상을 치료한다<sup>1)</sup>. 근래에는 口服劑, 注射劑로 만들어 口腔潰瘍 및 咽喉炎, 脣炎, 鼻炎, 敗血症 등에 응용되기도 한다<sup>2,3)</sup>.

增液湯은 排便作用의 증가 및 排便量의 증가를 유도하며, 효모균 (yeast fungus)에 의한 rat의 발열에 대하여 현저한 해열작용을 가지며, CCl<sub>4</sub>로 유발된 간손상에 대하여 간장보호하는 효과를 가지며, 과두로 유발된 mouse의 귀부종에 대하여 유의한 항염증효과가 있음이 보고되어 있다<sup>2)</sup>. 이처럼 증액탕은 온병조변에서는 陽明溫病에 津液不足

으로 大便乾結하거나, 口渴한 것을 치료하기 위하여 立方되었으나, 점차 염증성질환의 치료로 그 치료범위가 확대되고 있다.

대식세포는 자연면역 뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 reactive oxygen species (ROS) 와 interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 IL-6와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 nitric oxide (NO)는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>4-9)</sup>.

Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 macrophage cell모델은 여러 물질의 항염증효과를 평가하는 데에 널리 이용된다. LPS는

Gram-negative bacteria 외막의 주요 성분으로서, septic shock을 유도하고, NO, TNF- $\alpha$ , interleukin, prostanoid, leukotriene 등의 염증매개물질의 생산을 자극한다<sup>10-12</sup>). 이러한 염증반응은 bacteria의 제거에 유리하게 작용하지만, 통제 범위를 넘어선 과도한 염증반응은 TNF- $\alpha$ , IL-1 및 IL-6 등의 염증매개 cytokine을 다량 생산하게 되고, 이러한 염증매개물질들은 조직손상이나, 장기의 부전을 유발한다<sup>13</sup>).

따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 靑黛<sup>14</sup>), 苦楝皮<sup>15</sup>), 香附子<sup>16,17</sup>), 當歸<sup>18</sup>) 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서, 본 연구는 열수추출된 증액탕 (JAT)이 NO production, inducible nitric oxide synthase (iNOS), phospho-Inhibitory  $\kappa$ Ba (p-I $\kappa$ Ba), cyclooxygenase - 2 (COX-2)발현, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 사이토카인의 발현 및 prostaglandin E2 (PGE2)에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 추출물의 제조

증액탕 (JAT: Wolsung, Daegu, Korea) 약재 300g을 물 4L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000 $\times$ g에서 3분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 0.2 $\mu$ m filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. JAT의 수율은 8.83%였으며 실험에서 JAT는 EMEM (Eagle's minimum essential medium)에 녹여 사용하였다. 증액탕의 구성은 table 1과 같다.

Table 1. The composition of JAT used in this study.

藥材名	생약명	용량(g)
玄 參	Scrophulariae Radix	2.63
麥門冬	Liripis Tuber	2.63
生地黃	Rehmanniae Radix	1.88
總 量		4.51

### 2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

### 3. 시 약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)와 LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, iNOS, COX-2, p-I $\kappa$ Ba, I $\kappa$ Ba의 Antibody는 BD Bioscience (USA), Cayman (USA), Zymed (USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (USA)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$  와 IL-1 $\beta$ 의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며, PGE2의 ELISA Kit는 RnD Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

RAW 264.7 cells을 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 분주한 다음 JAT를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1 - 3.0

mg/ml의 농도로 JAT를 처치하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처치한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100×/(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

### 5. NO생성량 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 µl와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100 µl를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

### 6. Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis 시켰다. Cell lysates를 10,000×g로 10분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti p-IκBa, IκBa의 antibody를 사용하여 p-IκBa, IκBa protein

을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. 각 protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

### 7. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells (1×10<sup>6</sup>/ml)을 분주하고 JAT를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF-α와 IL-1β는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다. 흡광도는 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 측정하였다.

### 8. PGE<sub>2</sub>의 측정

JAT를 농도별로 처치하고, 1시간 후에 LPS를 처치한 후, 배양된 배지를 E-tube에 모아서 ELISA Kit (RnD Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용한 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였다. PGE<sub>2</sub>와 link된 acetylcholinesterase가 도포되어 있는 plate에 standard와 배양 배지를 첨가하여 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 18시간 후에 standard solution과 배지를 제거하고 Kit에 포함되어 있는 wash buffer로 5회 반복 세척하였다. 200 ul의 substrate reagent를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, stop solution을 첨가하여 반응을 종결시켰다. PGE<sub>2</sub>의 함량은 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve에 준하여 결정하였다.

9. 통계적 검증

실험 결과는 mean±S.D로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

III. 결 과

1. JAT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 NO production에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에서 JAT의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 JAT를 0.1, 0.3, 1.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. NO의 양은 LPS를 처리하지 않은 control에 대한 비율로 나타내었다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성있게 증가하였으며, JAT를 0.1, 0.3, 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 유의성있게 NO의 생성을 억제하였다. 특히 1.0 mg/ml의 농도에서는 LPS로 유도된 NO를 control 수준으로 억제하였다 (Fig. 1).

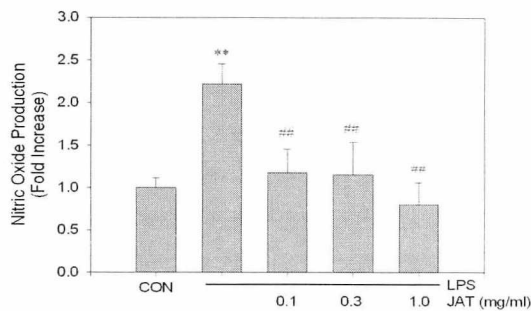


Fig. 1. Inhibition of NO production by JAT in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were treated with various concentrations of JAT dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 18 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the methods section. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P<0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P<0.01).

2. JAT가 RAW 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향

JAT가 0.1 및 0.3, 1.0mg/ml의 농도에서 18시간 배양된 후, LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, JAT의 세포독성으로 인한 세포 수의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, JAT의 농도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 JAT의 0.1, 0.3, 및 1.0mg/ml의 농도는 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2).

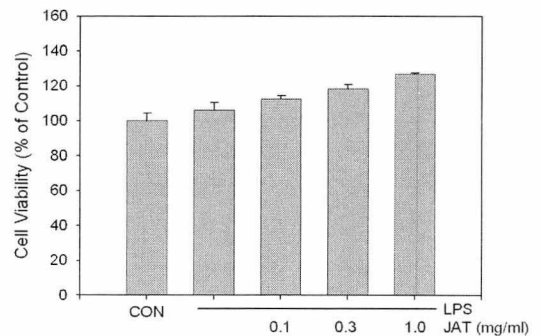


Fig. 2. The cell viability was measured by MTT assay.

Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments.

3. JAT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

NO 생성 억제에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질내 (total lysate)에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 JAT 0.1, 0.3 및 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었으며, JAT 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소하였다. TPA, LPS, TNF-α, ROI 등의 염증성 자극에 의해 NFκB의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin

synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다<sup>19,20)</sup>. 본 실험에서 LPS처치시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으며, LPS에 JAT 0.1, 0.3 및 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 양이 현저히 감소하였다 (Fig. 3).

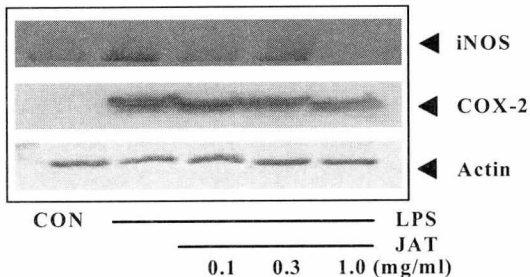


Fig. 3. Effect of JAT on the induction of iNOS and COX-2 by LPS.

The level of iNOS and COX-2 protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without JAT pretreatment (i.e. 1h before LPS). Actin is used as a loading control.

#### 4. JAT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 p-IκB 발현에 미치는 영향

일반적으로 안정화된 세포에서는 NFκB가 세포질에서 NFκB를 억제하고 있는 IκBa, IκBβ, IκBε, p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재한다. 그러나, LPS, Tat, Tax 등의 자극에 의해 NFκB 신호전달계가 활성화되면 IκB, p105, p100이 인산화되고, degradation되면서 NFκB가 핵으로 이동하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. NFκB를 억제하는 IκB protein의 종류는 IκBa, IκBβ, IκBε등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NFκB의 inhibitory protein은 IκBa이다<sup>21)</sup>. 본 실험에서 LPS는 p-IκBa의 발현을 증가시켰으며, JAT는 1.0 mg/ml에서 LPS에 의해 유도된 IκBa의 phosphorylation을 억제하였다. 한편 LPS처치에 의해 감소된 IκBa는 SCP의 전처치에 의해 감소가 억제됨을 나타내었다 (Fig. 4)

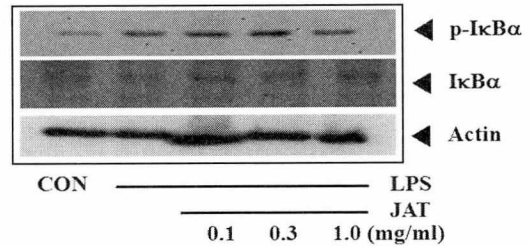


Fig. 4. Effect of JAT on the induction of p-IκBα and IκBα by LPS.

The levels of p-IκBα and IκBα protein were monitored 15min after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without JAT pretreatment (i.e. 1h before LPS). Actin is used as a loading control.

#### 5. JAT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 TNF-α에 미치는 영향

TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>22)</sup>. 마크로파지와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>23)</sup>. 본 실험에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, JAT 0.3 및 1.0 mg/ml은 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

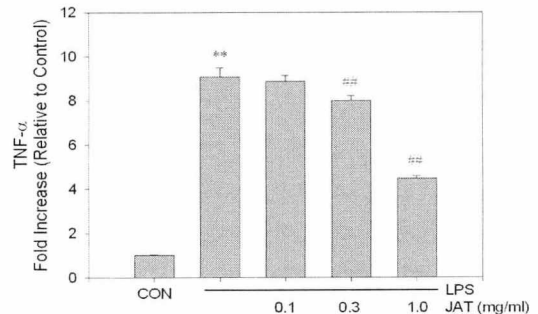


Fig. 5. The effect of JAT on LPS-inducible TNF-α production.

Production of TNF-α was measured in the medium of RAW264.7 cells cultured with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of JAT for 18 h. The amount of TNF-α was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01).

6. JAT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 IL-1β에 미치는 영향

IL-1β는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell 등에서 분비되며, TNF-α, IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1β는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>23)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, JAT 0.3 및 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1β를 농도 의존적으로 유의성있게 감소시켰다. (Fig. 6)

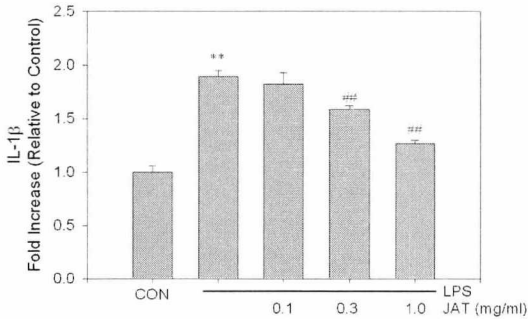


Fig. 6. The effect of JAT on LPS-inducible IL-1β production.

Production of IL-1β was measured in the medium of RAW264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of JAT for 12 h. The amount of IL-1β was measured by immunoassays as described in Section 2. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01).

7. JAT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 PGE2에 미치는 영향

발열, 염증 및 통증에 관여하는 prostaglandin (PG)은 COX에 의해 생성된다. 본 연구에서는 LPS에 의해 PGE2가 유의성있게 증가하였으며, JAT는 LPS로 증가된 PGE2를 농도 의존적으로 억제하였다. 특히 0.3과 1.0 mg/ml의 농도에서는 PGE2를 완벽히 억제하였다. 이는 JAT가 LPS에

의해 증가된 COX-2를 억제한 결과와 일치한다. (Fig. 7)

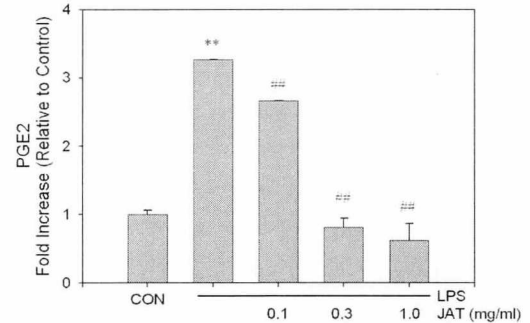


Fig. 7. Inhibition of LPS-activated PGE2 production by JAT.

RAW264.7 cells were cultured with LPS (1 mg/ml) in the presence or absence of JAT for 24 h to determine the level of PGE2. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE2. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (\*: significant as compared to control, \*\*P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01).

IV. 고찰

增液湯은 溫病條辨의 卷二 中焦篇에 기재된 方劑로서 “陽明溫病 無上焦證 數日不大便 當下之 若其人陰素虛 不可行承氣者 增液湯主之 服增液湯已周十二時觀之 若大便不下者 合調胃承氣湯和之”, “下後數日 熱不退 或退不盡 口燥咽乾 舌苔乾黑 或金黃色 脈沈而有力者 護胃承氣湯微和之 脈沈而弱者 增液湯主之”<sup>24)</sup>라 하여 주로 燥熱로 인한 便秘를 치료하는 方劑이다.

增液湯은 玄蔘, 麥門冬, 生地黃으로 구성되어, 滋陰清熱, 潤燥通便하는 효능을 가지며, 陽明溫病으로 津液이 부족하여 大便이 乾結하거나, 口渴하고, 舌質은 紅色을 띠고 건조하며, 脈狀이 沈하고 無力한 증상을 치료한다.<sup>1)</sup> 근래에는 口服劑, 注射劑로 만들어 口腔潰瘍<sup>25)</sup> 및 바이러스성 감기<sup>26)</sup>, 咽



喉炎, 脣炎, 鼻炎, 手術後熱病等の 陰傷症, 月經過多, 高脂質血症, 流行性出血熱, B형뇌염, 당뇨병, 齒痛, 갑상선기능항진증, 胃炎, 고혈압, 敗血症 등에 응용되기도 한다.<sup>2,3)</sup>

增液湯에 대한 연구는 주로 중국을 중심으로 이루어져 왔으며, 우리나라에서는 증액탕에 대한 임상적 증례보고 및 실험적 연구는 매우 미흡한 실정이다. 이전의 연구에 따르면, 增液湯은 뚜렷한 排便作用의 증가 및 排便量의 증가를 유도하였으며, 番瀉葉을 투여한 泄瀉後의 脫水에 대하여 體內水分의 保留효과를 나타내었으며, 효모균에 의한 rat의 발열에 대하여 현저한 해열작용을 가지며, CCl<sub>4</sub>로 유발된 간손상에 대하여 보호효과를 가지며, 파두로 유발된 mouse의 귀부종에 대하여 유의한 항염증효과가 있음이 보고되어 있다<sup>2)</sup>. 이처럼 증액탕은 온병조변에서는 陽明溫病에 津液不足으로 大便乾結하거나, 口渴한 것을 치료하기 위하여 立方되었으나, 점차 염증성질환의 치료로 그 치료범위가 확대되고 있다.

이와 같은 증액탕은 燥熱로 인한 便秘를 치료하는 외에도 염증성 질환에 응용하고 있지만, 이를 지지할 만한 구체적 연구는 매우 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 열수추출된 增液湯(JAT)이 LPS로 activated된 RAW 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하였다.

iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>14,15,27-29)</sup>. 따라서 NO 생성 저해제는 septic

shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. RAW 264.7 cell에서 JAT의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 JAT를 0.1-1.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 유의성있게 증가하였으며, JAT를 0.1, 0.3, 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 유의성있게 NO의 생성을 억제하였다. iNOS 단백질 역시 LPS 처리시에는 강하게 유도되었으나, JAT 1.0mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 현저히 감소하였다.

한편, COX-2는 prooxidant나 염증성자극에 의해 MEKK-1, NF $\kappa$ B의 활성화를 경유하여 생성되고, prostaglandin 합성을 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다<sup>19,20)</sup>. 또 monocyte에서의 COX-2발현은 염증매개인자인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가한다<sup>30)</sup>. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료의 target molecule이 되고 있다<sup>22)</sup>. 본 실험에서 LPS처리시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으며, LPS에 JAT 0.3과 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 양이 현저히 감소하였다.

iNOS나 COX-2의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NF $\kappa$ B, AP-1, C/EBP등이 있으며<sup>22)</sup>, 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NF $\kappa$ B이다<sup>31)</sup>. NF $\kappa$ B는 virus나 bacteria 감염시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF- $\alpha$ 유전자의 발현에 관련된다<sup>22)</sup>. Resting cell에서 NF $\kappa$ B는 cytoplasm에서 inhibitory molecule인 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS의 자극에 의해 NF $\kappa$ B signaling cascade가 활성화되면 I $\kappa$ B가 degradation되면서 NF $\kappa$ B가 핵으로 이동하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. I $\kappa$ B protein의 종류는 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ 등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍



부한 것은 I $\kappa$ B $\alpha$ 이다<sup>21)</sup>. 본 실험에서는 I $\kappa$ B $\alpha$  및 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 phosphorylated form을 측정하였다. JAT 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현을 억제하였다. 이러한 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 경향성과 일치되게 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현은 LPS처치시 감소하는 경향을 나타내었으며, JAT는 LPS에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현감소를 억제하였다. 이러한 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ 의 결과는 JAT가 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2를 억제하는 기전에, NF $\kappa$ B의 핵으로의 이동이 JAT에 의해 억제됨을 간접적으로 시사하는 것이라 할 수 있다.

TNF- $\alpha$ 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>22)</sup>. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>23)</sup>. 본 실험에서 LPS는 TNF- $\alpha$ 의 양을 유의하게 증가시켰으며, JAT는 0.3, 1.0 mg/ml은 유의하게 감소시켰다. 한편, IL-1 $\beta$ 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 $\beta$ 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>23)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, JAT 0.3 및 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-1 $\beta$ 를 유의성있게 감소시켰다.

일반적으로 혈관확장, 발열, 염증 및 통증에 관여하는 것으로 알려진 prostaglandin (PG)의 생성은, 세포막의 인지질의 구성성분인 arachidonic acid가 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)와 다른 acyl hydrolases의 작용에 의해 조직의 인지질로부터 유리되어 cyclooxygenase (COX)에 의해 PG로 변환된다. PGE<sub>2</sub>는 통증자극에 대한 반응의 상승작용, 혈관확장, 발열, 염증세포의 활성을 유도한다<sup>32)</sup>. 본 연구에서는 JAT가 LPS로 증가된 COX-2의 발현을 억제한 것처럼, SCP는 LPS로 증가된 PGE<sub>2</sub>

를 유의하게 억제하였다.

이러한 연구결과는 JAT가 NF $\kappa$ B의 억제단백질 중의 하나인 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 phosphorylation을 억제하며, 그러한 결과로 NO, iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>를 감소시키는 것을 의미한다.

## V. 결 론

본 연구는 열수추출된 증액탕 (JAT)이 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 NO production, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase - 2 (COX-2)발현 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다. 增液湯물추출물은 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 를 억제하고, iNOS의 발현 및 NO의 생성량을 억제하였으며, COX-2는 일부 농도에서 발현을 억제하였다. 증액탕은 또한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등의 pro-inflammatory cytokine을 유의하게 억제하였으며, LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub>의 수준을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 증액탕이 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 NO 및 과량의 pro-inflammatory cytokine생성과 관련된 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Oriental Medicine R&D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (B050035).

## 참고문헌

1. 방제학교수 공편. 방제학, 서울, 영림사, p. 481, 1999.
2. 謝鳴 主編. 中醫方劑現代研究 (下卷), 北京, 學

- 苑出版社, p.1303-1312, 1997.
3. 李飛 主編. 方劑學, 北京, 人民衛生出版社, p.1555-1560, 2003.
  4. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.* 10, 8-15, 2000.
  5. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T : Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* 144, 1425-1431, 1990.
  6. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA : Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 24-32, 1996.
  7. Corbett JA, and Mac Daniel ML : Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* 181, 559-568, 1995.
  8. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL : TNF and IFN $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1  $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine.* 6, 399-406, 1994.
  9. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. *대한화학회지.* 39, 52-63, 1999.
  10. Hewett JA, Roth RA. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacol Rev.* 45, 382-411, 1993.
  11. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med.* 109, 150-158, 2000.
  12. Watson WH, Zhao Y, Chawla RK. S-adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for tumour necrosis factor alpha. *Biochem J.* 342, 21-25, 1999.
  13. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* 12, 186-192, 2004.
  14. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 28, 217-226, 2000.
  15. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 406, 301-309, 2000.
  16. Seo WG, Pae HO, Oh GS, KY Chai, Kwon TO, YG Yun, NY Kim, HT Chung. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 76, 59-64, 2001.
  17. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 17(3), 771-776, 2003.
  18. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지.* 10(2), 189-197, 2002.

19. Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* 40, 1091-1097, 2002.
20. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* 480-481, 243-268, 2001
21. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 159, 387-397, 2001.
22. 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- $\kappa$ B phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology.* 139, 11-20, 2003.
23. 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.* 37, 355-61, 2003.
24. 吳翰通 著, 丁彰炫 譯. 國譯 溫病條辨, 서울, 集文堂, p.202-209, 2003.
25. 黃泰康, 施誠 主編. 中藥方劑現代研究大典, 北京, 科學出版社, p.1703, 1996.
26. 趙學光, 增液湯加味治療小兒病毒性感冒50例治療觀察, *現代中醫.* 3, 23, 1990.
27. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 35, 21-28, 2000.
28. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 69, 625-635, 2001.
29. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 76, 119-123, 2001.
30. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 4, 116-123, 2004.
31. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 오미소독음이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 16(2), 921-927, 2002.
32. Cha YI, Solnica-Krezel L, DuBois RN. Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev Biol.* 289, 263-272, 2006.