마우스 대식세포(RAW 264.7 cell)에 대한 小陷胸湯의 항염증효과

김재은[1,2] · 윤현정[1,3] · 최달영[2]* · 박선동[1,3]

1 : 동국대학교 한의과대학 심혈관계질환 천연물연구개발센터, 2 : 병리학교실, 3 : 방제학교실

Anti-inflammatory Effect of Sohamhyung-tang in RAW 264.7 Cells

Jai Eun Kim[1,2], Hyun Jeong Yun[1,3], Dall Yeong Choi[2]*, Sun Dong Park[1,3]

1 : Cardiovascular Medical Research Center, 2 : Department of Pathology,
3 : Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Inflammation is a double-edge sword, functioning as a response against external stimuli, but excessive inflammation can lead to a harmful result. Inflammation is important in the development of vascular diseases, such as atherosclerosis and restenosis. Sohamhyung-tang(SHHT) is one of major herbal prescriptions from "Sanghanron", treating congested heat in thorax. It can be seen as an origin of several prescriptions for Hyungbi(胸痺, thoracic congestion), with its major component Trichosanthes semen. This study was done to determine whether SHHT reduces the production of nitrite, index of NO, and pro-inflammatory cytokines in Lipopolysaccharide(LPS)-induced RAW 264.7 cells. The results show that SHHT inhibited LPS-induced production of NO and PGE2, and iNOS and COX-2 expression, meaning SHHT has a significant anti-inflammatory effect. Based on these results, we suggest that SHTT can be used for prevention and treatment of diseases which starts from chronic inflammatory reactions.

Key words : atherosclerosis, Sohamhyung-tang(SHHT), nanti-inflammatory effects, cytokines, LPS, RAW

서 론

염증반응은 생체 또는 조직에 물리적 작용, 화학적 자극, 세균 감염 등 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상을 수복 재생하려는 기전이다. 그러나 지속적인 염증반응은 오히려 점막손상을 촉진하고 심지어 암 같은 질환을 유발하기도 한다. 대식세포는 면역 항상성 유지에 관여하며, 염증반응시에 nitric oxide(NO)와 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin (IL-6) 등의 cytokines를 생산하여 초기 감염 방어에 중요한 역할을 한다[1]. 그러나 과다한 활성에 의해 이들의 생산이 과잉으로 일어나면 오히려 염증을 심화하고 인체에 유해한 방향으로 진행될 수 있어 이러한 염증의 제어가 만성적인 염증으로 인한 질환 및 앨러지 질환의 예방 및 치료에 유의하게 작용할 수 있다고 사료된다.

소함흉탕(SHHT)은 상한론이 출전(138조)[2]인 처방으로, 傷寒表證을 誤下하여 사열이 내함한 소결흉증이 적응증으로 주요 임상증상은 심하부의 동통이다. 임상을 통해 응용범위가 확대되어 痰熱이 心下에 內結한 증후에 淸熱滌痰, 寬胸散結의 치법의 방제로서 사용된다[3]. 소함흉탕은 반하(Pinelliae tuber), 황련(Coptidis Rhizoma), 과루인(Trichosanthis semen)의 3味의 약재로 구성되어 있다. 이들 약재 각각에 대한 기존의 연구 보고 및 문헌으로는 우선 과루인의 항염증 효과에 대해 박 등[4]의 연구결과가 있다. 황련 및 황련의 주성분 berberine의 항암효과에 대해서는 상당한 연구결과가 발표되어 있다[5]. 또한 Wang 등[6], 정 등[7], Park 등[8]이 다양한 세포 및 동물을 대상으로 항염증 효능를 보고하였다.

소함흉탕이 담열로 인한 고지혈증에 대하여 total cholesterol, trigylceride, phospholipid, free fatty acid, HDL-cholesterol, LDL-cholesterl의 함량변화 및 혈압, 체중에 유효한 효과를 얻었다는 보고[9]가 있는데, 고지혈증으로 인해 동맥경화증, 허혈성심질환, 췌장염 등의 발생빈도가 높아지고 특히 동맥경화증의 위험인자로 중요한 의미를 갖는 것을 생각해볼 때 동맥경화에도 예방 및 치료효과가 있을 것으로 사료된다.

일본 임상계에서는 소함흉탕을 기관지염, 폐렴, 흉막염, 급만성위염, 담낭염, 자율신경실조증, 늑간신경통, 고혈압, 관상동맥경화증에 응용한다고 하며, 소함흉탕과 사역산을 합방하여 관상동맥경화증에 의한 협심통 치료에 효과를 보았다는 기록도 있다[10].

일본에서는 소함흉탕과 소시호탕을 사용해서 기관지천식을

* 교신저자 : 최달영, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학
· E-mail : cdydkom@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-5367
· 접수 : 2009/12/18 · 수정 : 2010/01/05 · 채택 : 2009/01/20

치료한 예[11], 소함흉탕이 유효한 효과를 보인 늑간신경통의 증례[12], 폐렴에 소함흉탕을 사용한 예[13], 부자갱미탕합소함흉탕으로 흉수저류를 치료한 예[14] 등이 보고되어 있다.

동맥경화 질환은 대표적인 만성염증성 질환으로, 이러한 동맥경화의 예방효과를 알아보기 위하여 본 실험을 진행하였다. 본 연구에서는 소함흉탕의 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스의 대식세포인 RAW264.7에 소함흉탕을 전처리한 후 2시간 후 LPS를 처리하여 염증을 유도하여 소함흉탕이 세포의 염증 유도를 얼마나 효과적으로 억제할 수 있는지 관찰하였다. 억제의 지표로서는 세포가 방출하는 NO, PGE2 생성량과 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2) 발현 정도 및 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-6(IL-6), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 생성량 등을 알아본바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

반하 100 g, 황련 40 g, 과루인 60 g, 2 litre의 100% methanol로 3회에 걸쳐 반복 추출하고, 여과 후 농축 및 동결건조하여 분말을 얻었다. 분말은 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

Table 1. Constituents of SHHT

약명	생약명	양(g)
과루인	*Trichosanthis semen*	60
반하	*Pinelliae tuber*	100
황련	*Coptidis Rhizoma*	40
total		200

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 HyClone(Utah, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 시약 중 Sodium Dodesyl Sulfate(SDS)는 Amresco (Ohio, USA)에서, Acrylamide, Bis는 Bio-Rad(CA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 1차 항체인 iNOS monoclonal antibody(mAb)는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서, β-actin mAb과 COX-2는 Cell Signaling Techonolgy (MA, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega(MA, USA)에서 구입하였다. 각종 cytokines 측정을 위한 ELISA kit는 Pierce Biotechnology (Rockford USA), Protein assay Reagent는 Bio-Rad(CA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% streptomycin-penicillin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

2) MTS assay

小陷胸湯의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2H-tetrazolium inner salt(MTS) assay[15] 방법으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 $1x10^4$/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약재를 농도별(0, 1, 5, 10, 30, 50, 100, 300, 500 ㎍/㎖)로 18시간 동안 처리하였다. well당 20 ㎕의 MTS solution을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약재가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 함께 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행하였다. 세포에 약재의 메탄올 추출물을 농도별로 처리하고 2시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18시간 후 세포배양액을 수거하여 cytokines 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후 cytokines으로 coating된 96 well plate에 50 ㎕씩 첨가하여 4℃에서 overnight 시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100 ㎕의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 ㎕의 streptavidine-HRP solution을 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ehtylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate (TMB) susbtrate를 100 ㎕씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 ㎕의 stop solution을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System[16]을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 약재 메탄올 추출물을 전처리하고 2시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액 50 ㎕와 동량의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium Nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

5) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리시간별로 세포를 ice-cold PBS로 3회 세척 후, RIPA buffer를 넣어 4℃에서 30분간 반응시키고, 12,000xg에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 수거하였다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리시킨 후 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이

membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer(5% non-fat milk in TBS solution)에서 2시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 처리하여 overnight 하였다. 0.1% Tween 20을 함유한 TBS-T 용액으로 40분간 세척한 다음 secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL detection 용액(Pierce Biotechnology)으로 반응시킨 후 X-ray film 상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bio-Rad의 Protein Assay Kit를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

6) PGE2 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE2 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험하였다. 세포에 60 μg/ml의 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물을 전처리하고 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 PGE2 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 100 μl씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50 μl와 PGE2 conjugate 50 μl씩 첨가하여 4℃에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 μl씩 처리하여 5-20분간 반응시킨 후, 50 μl의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. 세포독성

마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 소함흉탕의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 실행하였다. 소함흉탕을 농도별로 18시간 처리한 결과, 세포의 생존율에는 거의 영향을 주지 않았다. 따라서 이후의 실험은 세포의 생존율에 영향을 주지 않는 200 ㎍/㎖의 농도까지 진행하였다. 이것은 소함흉탕이 보여주는 항염증효과가 세포생존율의 감소에 의한 것이 아니라 처방의 고유한 특성에 의한 것임을 보여준다.

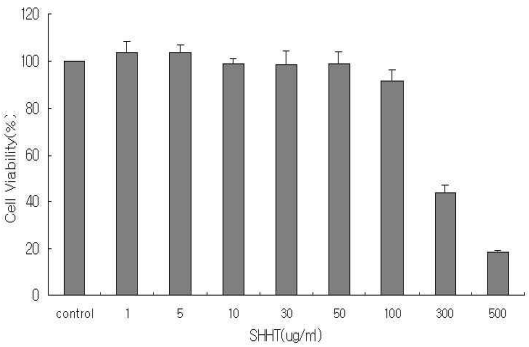

Fig. 1. Cytotoxicity of SHHT.

2. NO와 PGE2,

대표적인 만성염증성 질환의 하나인 동맥경화질환의 예방효과를 NO와 PGE2를 통해 알아보기 위하여 RAW264.7세포에 약제를 농도별로 전처리한 후 2시간 후 염증 유발에 주로 사용되는 LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 18시간 처리하였다. 이때 사용된 LPS의 농도는 이전 연구[17]에서 가장 효과적으로 염증을 유발한다고 인정된 100 ng/㎖을 사용하였다. 그 결과, NO의 경우, 소함흉탕의 농도 100 ㎍/㎖에서부터 50%가 넘는 감소효과를 보였고, 소함흉탕의 농도에 비례하여 NO의 생성량이 유의적인 감소를 보였다(Fig. 2). 또한 PGE2의 경우, 150 ㎍/㎖의 농도에서 두드러진 감소를 보였고, 200 ㎍/㎖의 농도에서는 20% 이하로 감소하였다(Fig. 2).

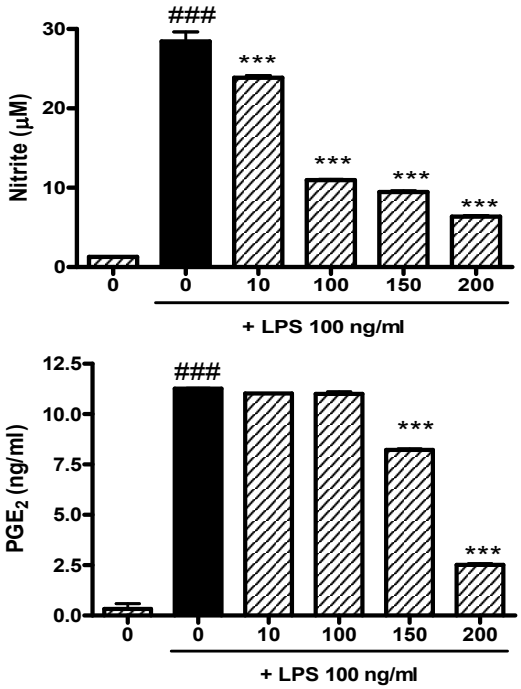

Fig. 2. Changes in NO and PGE2.

3. iNOS, COX-2

염증에 관여하는 NO는 주로 iNOS에서, PGE2는 주로 COX-2에 의해 생성된다. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 소함흉탕이 미치는 영향을 알아보았다. 소함흉탕의 항염증활성을 알아보기 위해 RAW264.7세포에 여러 농도별로 소함흉탕을 처리한 후, 2시간 후 100 ng/㎖의 LPS를 처리하여 염증을 유도하였다. 18시간 후 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 Western blotting을 통해 알아보았다. 그 결과, control에서는 유도되지 않았던 COX-2와 iNOS가 LPS 처리에 의해 유도되었고, 그 유도된 COX-2와 iNOS를 소함흉탕 처리에 의해 농도의존적으로 감소시킨 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

4. Cytokines (IL-6, TNF-α)

염증성 사이토카인은 염증의 지표로서 의미가 크다. 따라서 RAW 264.7세포에서 소함흉탕이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보기로 하였다. RAW 264.7세포에 소함흉탕을 농도별로 처리하고 2시간 후 100 ng/㎖의 LPS를 처리한 후 18시간이 지난 후 수거하여 사이토카인 농도를 조사

하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 IL-6는 10 ㎍/㎖의 저농도의 소함흉탕 처리에 의해서도 38%가량 감소하였고, 그 보다 높은 농도에서는 1/3에 가까운 정도로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 한편 TNF-α는 LPS 처리에 의해 유도되었고, 소함흉탕의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 최고농도인 200 ㎍/㎖의 소함흉탕 처리 시, 생성된 TNF-α는 LPS 유도된 그룹에 비해 28%로 확연히 감소하였다(Fig. 4).

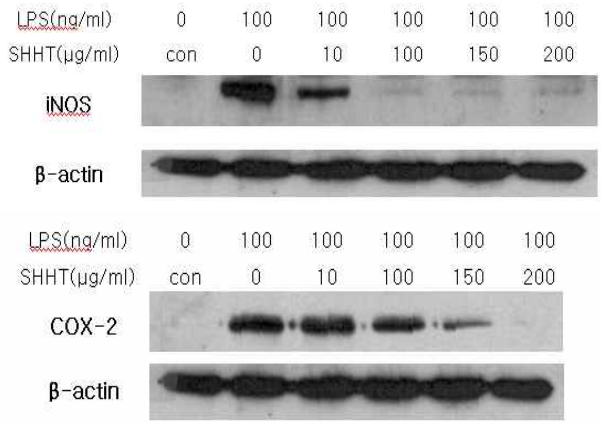

Fig. 3. Changes in iNOS and COX-2 expression.

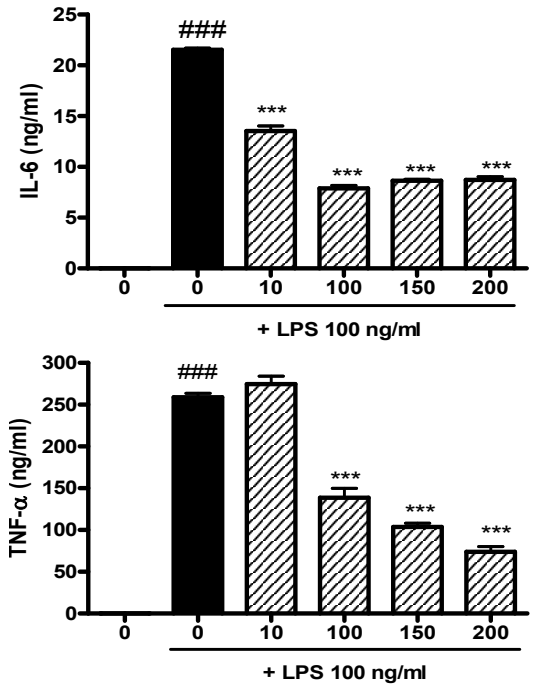

Fig. 4. Changes in Inflammatory cytokines(IL-6, TNF-α).

5. NF-κB signal (pIκBα)

LPS로 NF-κB의 억제성 인자인 IκB-α의 phosphorylation을 유도한 후, 소함흉탕을 농도별로 처리하여 그 phosphorylation의 저해 정도를 조사하였다. 결과(Fig. 5)와 같이 소함흉탕의 농도에 의존적으로 Phospho-IκB-α의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

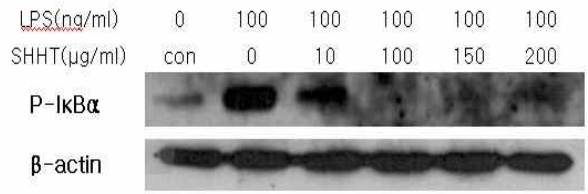

Fig. 5. Changes in P-IκBα expression by SHHT treatment.

고 찰

세포손상을 일으키는 자극은 생체에서 염증이라는 반응을 일으키는데, 세포손상 원인을 제거하거나 희석하기 위한 방어기전으로서 혈관을 가진 결합조직에서 볼 수 있는 복합적 반응이다. 염증은 손상된 조직을 수복하는 유복한 방어반응이지만, 때로는 생체에 오히려 해로운 결과를 초래하기도 한다[18].

생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의해 손상을 받은 후 이에 대한 반응을 일으켜 손상을 최소화하고 손상부위를 원상으로 회복하려는 방향의 일련의 국소적 반응이 일어나는데, 이 초기의 조직반응을 염증이라 한다[19].

염증에는 많은 매개물질이 관여하는데, 크게 혈관활성아민, 혈장단백분해효소, 보체계, 키닌계, 응고계, 아라키돈산 대사물(e.g. PGE2), 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase), 지방산화효소, 혈소판 활성인자, cytokines와 chemokines, 산화질소, lysosomal enzymes, free radicals 등이 있다. 이들 매개물질 중에서 prostaglandin E2(PGE2), leukotrienne 등을 비롯한 arachidonic acid 대사물은 혈관확장과 발열, 동통 등의 광범위한 작용을 나타낸다. 특히 대식세포에서 cytokines, TNF-α, LPS등의 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 NF-κB를 활성화시킨 결과 iNOS, COX-2를 발현시켜 과량의 NO와 PGE2를 생성하여 염증을 일으킨다. 따라서 이 대사과정을 억제하는 약물이 항염증약으로 개발되어 사용되고 있다. 이러한 염증반응을 조절할 수 있다면, 염증이 개재된 많은 질병의 치료와 예방에 효과적으로 사용할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구는 항염증활성이 있을 것으로 예상되는 한약 처방을 골라 실험을 하였다.

그람음성 세균의 세포외막 성분인 Lipopolysaccharides (LPS)는 macrophage에서 면역기능을 조절하는 여러 분자(TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, arachidonic acid 대산산물)를 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 전염증성 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입에 효과적으로 방어하도록 도와준다[20]. LPS의 자극을 받은 대식세포에서 방출하는 대량의 cytokines, TNF-α, superoxide, 또는 NO와 같은 전염증성분자들은 정상적인 세포기능을 파괴할 수 있으므로 LPS로 자극된 대식세포의 면역작용을 억제할 수 있는 약물의 발견은 치료에 매우 중요하다. 또한 염증매개물질의 형성은 phospholipase A2에 의해 arachidonic acid가 prostagladin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어진다. 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E2 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase와 cyclooxygenase에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내방어기능, 신호전달기능, 신

경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할을 하지만 염증상태에서 iNOS가 NO를 과잉생성하면 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 활성할 뿐 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시킨다고 알려져 있다[21].

LPS자극에 의해 현저하게 영향받는 대식세포 신호전달 분자로는 serine/threonine kinase로서 세포외 신호를 핵내로 전달하는 MAPK가 있다. LPS에 의해 활성화되는 MAPKinase로는 ERK1/2, p38, JNK 등이 있고, LPS에 의해 분비된 TNF-α에 의해 NF-κB 유전자가 활성화되어 NO 및 superoxide anion 등 free radicals이 생성된다[22].

Nitric Oxide(NO)는 혈관계에서는 혈관내피세포에서 분비되어 인접 근세포에 영향을 주어 혈관이완 및 혈류를 조절하는 signalling molecule로서 작용하며 면역계에 있어서는 활성화된 대식세포나 중성구 등에 의해 생성되어 외부에서 침입한 미생물이나 내부에서 발생한 종양세포의 사멸에 영향을 주는 immune defence molecule로서 인식되고 있다[23]. 이렇듯 염증반응은 생체 또는 조직에 물리적 작용, 화학적 자극, 세균 감염 등 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상을 수복 재생하려는 기전이다. 그러나 지속적인 염증반응은 오히려 점막손상을 촉진하고 심지어 암 같은 질환을 유발하기도 한다. 대식세포는 면역 항상성 유지에 관여하며, 염증반응시에 nitric oxide(NO)와 cytokines를 생산하여 초기 감염 방어에 중요한 역할을 한다[24].

NO는 면역계에서 방어분자로서 중요한 역할을 하지만, 한꺼번에 다량이 방출되면 미생물과 종양세포 같은 목표대상 뿐 아니라 NO를 생성하는 세포 자신과 주위의 세포와 조직, 기관에 손상을 초래할 수도 있다고 보고되고 있다[25]. 생체에서 발생한 필요 이상의 NO를 억제할 수 있다면 많은 beneficial effect를 가져올 수 있다. 특히 면역반응의 부재현상보다는 오히려 과민하게 반응하는 면역계에 의해 유발되는 질병의 경우 더욱 그러하다. LPS와 같은 병인에 반응한 면역세포가 분비하는 tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1(IL-1) 등으로 자극된 내피세포나 탐식세포가 iNOS를 유도하고 이에 의한 NO의 과생성을 통해 혈관확장이 일어나 비가역적인 혈압강하를 초래하는 것으로 알려져 있다.

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장기간에 걸쳐 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상과 같은 생체에 유해한 작용을 나타내고, 염증매개물질의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것[26]으로 알려져있다. 또한 염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가되어 있음[27]이 보고되어 있다. NO는 NO 합성효소에 의해 L-arguinine으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하며, 농도에 따라 세포기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다.

TNF-α와 같은 pro-inflammatory cytokine은 정상조직에서 발현될 뿐 아니라, 병별과정에서 그 발현정도가 증가되며 암 촉진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다. TNF-α가 인간의 염증성 피부질환과 관련이 있음은 이미 많이 보고되어 있다. 또한 여러 염증질환과 알러지 현상에 TNF-α 항체를 처리하였을 때 증상이 완화되었다. 염증단계의 중추적 역할을 하고 있는 cytokine인 TNF-α와 IFN-γ의 발현을 저해하여 항염증 병과정을 조절할 수 있을 가능성이 있다.

위의 사이토카인, adhesion molecules, MMP등이 모두 염증에 관련된 인자들인데 이들 주요인자들은 염증성 질환의 발전에 핵심 중재 역할을 하는 전사인자 transcriptional nuclear factor kappa B(NF-κB)에 의해 제어를 받는다[28]. NF-κB는 평소에는 억제성 IκB 단백질들과 복합된 불활성 상태로 cytosol 내에 존재한다. IκB-α의 phosphorylation으로 인해 IκB-α는 분해가 일어나고, 활성화된 NF-κB의 방출과 nuclear translocation이 일어난다[29].

결 론

마우스 대식세포에서 소함흉탕의 항염증 효과에 대한 연구를 수행하여 다음의 결과를 얻었다.

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 소함흉탕의 독성효과를 조사한 후 생존율에 영향을 주지 않는 농도(200 ㎍/㎖)까지 실험을 진행하였다. 이는 소함흉탕의 항염증효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 약재의 고유한 특성임을 보여준다. RAW 264.7세포에 약재를 2시간 전처리한 후 100 ng/㎖의 LPS를 처리하여 염증을 유도하였다. 소함흉탕 처리에 의해 LPS로 유도되었어야할 NO, PGE2의 생성량 및 iNOS, COX-2의 발현이 크게 감소되었고, 또한 염증성 사이토카인도 유의적으로 감소하였다. 그리고 소함흉탕의 처리에 의해 phosphorylated IκB-α가 소함흉탕의 농도에 의존적으로 저해받았다.

이러한 실험 결과들로 볼 때, 소함흉탕은 세포에 유해한 영향을 미치지 않는 농도에서도 항염증 효과를 가지고 있음을 알 수 있다. 만성 염증성질환의 하나인 동맥경화를 비롯하여 고혈압, 암, 당뇨병 등 염증을 매개하여 생기는 많은 질환의 예방과 치료에 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 가능성을 고려할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호: R13-2005-013-01000-0).

참고문헌

1. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. The Journal of Immunology 144: 1425-1431, 1990.
2. 李心機 編著. 傷寒論通釋. 北京, 人民衛生出版社, p 190, 2003.
3. 한의과대학 방제학교수 공편저. 방제학. 영림사, 서울, pp

535-536, 1999.
4. 박정운, 문석재, 문 구, 원진희. 행인 과루인 추출물이 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포주의 iNOS 발현 및 superoxide 형성에 미치는 영향. J. of Kor. Oriental Oncology. 5(1):137-150, 1999.
5. Tang, J., Feng, Y., Tsao, S., Wang, N., Curtain, R., Wang, Y. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigatsions. J Ethnopharmacol. Epub ahead of print, 2009.
6. Wang, B., Guan, S.M., Li, X.D. Effects of micrometer compound rhizoma coptidis on nuclear factor-kappaB and inflammatory factors in rabbit fed with high lipid diet. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 32(12):1207-1210, 2007.
7. 정효원, 박용기. 황련의 쥐대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 Nitric Oxide 및 TNF-α의 생성억제효과. 대한본초학회, 21(2):165-173, 2006.
8. Park, E.K., Rhee, H.I., Jung, H.S., Ju, S.M., Lee, Y.A., Lee, S.H., Hong, S.J., et al. Antiiflammaotry effects of a combined herbal preparation(RAH13) of Phellodendron amurense and Coptis chinensis in animal models of inflmmation. Phytother Res. 21(8):746-750, 2007.
9. Song, K., Cho, K.H., Kim, Y.S., Bae, H.S., Lee, K.S. Experimental study on the effects of Sohamhyungtang and Gamisohamhyungtang upon hypertension and hyperlipidemia. Kyunghee Medicine, 9(1):83-92, 1993.
10. 황황 중의십대류방. 집문당, 서울, pp 193-194, 2004.
11. 大關 潤一, 奈良 範子. 小陷胸湯合小柴胡湯を使用しその後良好な經過を辿っているい長年續た氣管支喘息の1例. Japanese Journal of Oriental Medicine 57: 220, 2006.
12 大關 潤一, 小陷胸湯が有效だった肋間神經痛の2症例. Japanese Journal of Oriental Medicine 51(6):140, 2001.
13. 伊藤良. 肺炎に小陷胸湯の偉效. 漢方の臨床, 18(8):764-765, 1971.
14. 平崎 能郎, et al. 附子粳米湯合小陷胸湯が奏功した胸水貯溜の1例. 漢方の臨床 54(2):254-260, 2007.
15. Desai, A., Vyas, T., Amiji, M. Cytotoxicity and apotosis enhancement in brain tumor cells upon co-administration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. J Pharm Sci. 97(7):2745-2756, 2008.
16. Wang, S., Chen, Y., He, D., He, L., Yang, Y., Chen, J., Wang, X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with Gastrodia and Uncaria decoction, a traditional Chinese formulation. J Ethnopharmacol. 114(3):458-462, 2007.
17. 윤현정 등. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 茵蔯蒿湯의 항염증 효과. 대한본초학회지 23(2):169-178.
18. 대한병리학회 병리학 제5판. 고문사, pp 68-69, 2003.
19. Kim, Y.K., Ha, H.K., Lee, J.H., Kim, C.S. COX-2 inhibition and anti-inflammatory effects of traditional herbal medicine Korean Journal of Oriental Medicine 8(1):65-74, 2001.
20. Bhattacharyya, A., Pathak, S., Datta, S., Chattopadhyay, S., Basu, J., Kundu, M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate Helicobacter pylori-mediated interleukin-8 release from macrophages. Biochem J. 368(Pt 1):121-129, 2002.
21. 정용준, 최세영, 안치선, 전윤희, 박동기, 임병우. 상황버섯과 발아현미상황버섯 열수추출물의 murine macropahge RAW 364.7 세포에서 항염증 반응 비교. 韓藥作誌, 17(2):97-101, 2009.
22. Park, S.J., Song, H.J. Anti-inflammatory effect of extract of Pulsatilla koreana Nakai in LPS-stimulated murine peritoneal macrophage, Kor. J. Herbology. 22(1):111-117, 2007.
23. Snyder, S.H., Bredt, D.S. Biological roles of nitric oxide. Scientific American Review pp 28-35, 1992.
24. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. The Journal of Immunology 144: 1425-1431, 1990.
25. Jun, C.D., Park, S.J., Choi, B.M., Kwak, H.J., Park, Y.C., Kim, M.S., Chung, H.T. Potentiation of the activity of nitric oxide by the protein kinase C activator phorbol ester in human myeloid leukemic HL-60 cells: association with enhanced fragmentation of mature genomic DNA. Cell Immunol. 176(1):41-49, 1997.
26. Ryu, et al. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthetics in LPS-activated macrophage. Phytotherapy research 17: 485-489, 2003.
27. McCartney, et al. 1993. Zeisz, et al. 1996.
28. Suzuki, J., Ishobe, M., Morishita, R., Nagai, R. Review Article Tea polyphenols regulate key mediators on inflammatory cardiovascular diseases. Mediators of Inflammation, Hindawi Publishing Corporation, 2009.
29. Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. Trends Biochem Sci. 29(2):72-79, 2004.