

甘露飲의 항염증 효과에 대한 실험적 연구

임진호^{1)*} · 정호준¹⁾ · 김상찬²⁾ · 지선영¹⁾
대구한의대학교 안이비인후피부과교실¹⁾, 한의과대학²⁾

Anti-inflammatory effects of the *Gamroem* *in vivo* and *in vitro*

In-Ho Lim · Ho-Jun Jung · Sang-Chan Kim · Seon-Young Jee

Objectives : The present study was conducted to evaluate the anti-inflammatory effects of the *Gamroem* water extracts (GRE) *in vivo* and *in vitro*.

Methods : The effects of GRE on anti-inflammation were measured by production of NO, PGE₂ (Prostaglandin E₂), iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), COX-2, NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) and IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6 in Raw 264,7 macrophage cells stimulated with LPS.

- Results** : 1. In macrophage cells, LPS displayed significant stimulatory effects on the production of NO and PGE₂. However, GRE showed significant inhibitory effects on NO and PGE₂ release. The level of NO and PGE₂ was decreased by GRE in a concentration dependent manner as compared with LPS only group.
2. Immunoblot analysis verified that LPS stimulation significantly increased the iNOS and COX-2 protein level, but GRE suppressed the induction of iNOS and COX-2 protein at a concentration dependent manner.
3. GRE reduced the elevated production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by LPS. Moreover, the inhibitory effects of GRE was occurred in a dose-dependent manner.
4. GRE significantly reduced the expression of NF- κ B protein in nuclear fraction.
5. GRE effectively inhibited the increases of hind paw skin thicknesses and inflammatory cell infiltrations induced by carrageenan treatment. It, therefore, considered that GRE will be favorably inhibited the acute edematous inflammations.

Conclusions : These results indicated that GRE could have anti-inflammatory capacity by inhibiting the production of NO, PGE₂ and cytokines *in vitro* and by reducing the formation of carrageenan-induced paw edema *in vivo*. Moreover, inhibitory effects of GRE on the macrophage activation were attributable to the reduction of some of inflammatory factors by inhibiting iNOS and COX-2 through the suppression of NF- κ B.

Key words : *Gamroem*, Anti-inflammatory effects, NO, PGE₂, iNOS, COX-2, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6

I. 서 론

甘露飲은 《太平惠民和劑局方》에 기재된 처방으로 枇杷葉, 石斛, 黃芩, 枳殼, 天門冬, 麥門冬, 生地黃, 熟地黃, 茵蔯, 甘草로 구성되며 치은염, 구내염, 구강 궤양, 치조농루, 괴혈병, 편도선염, 설압, 베체트병 등의 염증성 질환에 사용된다^{1,2)}.

염증은 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 방어반응이다. 염증반응은 계통 발생론적으로 가장 오래된 방어기전으로 cytokines, PGE₂, NO, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 염증반응에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비와 NF- κ B의 활성화는 염증을 개시하고 유지시키기 위한 중요한 요소이며 이들의 분비량과 활성화에 대한 조절은 항염증 효과를 파악하는 기준이 된다. 따라서 NF- κ B 활성화 및 NO 생성 저해제는 septic shock, 다발성 경화증, 류마티스 관절염과 같은 각종 염증성 질환의 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

최근에는 이러한 조절제를 찾기 위해 牡丹皮, 款冬花, 香附子, 當歸, 靑黛, 苦楝皮 등의 한약재³⁻⁹⁾와 五味消毒飲, 托裏消毒飲, 龍膽瀉肝湯, 加味清上防風湯 등의 방제¹⁰⁻¹³⁾에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 현재 甘露飲에 관한 연구는 齒齲의 치료에 대한 문헌적 연구¹⁴⁾와 수종 한약 처방 전탕액의 허피즈바이리스에 대한 효능 검색¹⁵⁾이 있으나 면역반응 및 염증반응에 미치는 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 본 연구에서 甘露飲의 염증성 질환에 대한 효과를 확인하기 위해 감로음 추출물

(GRE)를 RAW 264.7 세포에 전처리한 후, LPS로 유도한 NO 생성, iNOS 발현 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 염증매개물질 생성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보고, 감로음 추출물 (GRE)가 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 염증매개물질에 대한 억제 효과를 기대할 수 있는지 살펴보았다. 또한 염증의 주요 증상 중 하나인 부종을 측정하기 위하여 carrageenan으로 유도한 급성염증 모델을 이용하여 감로음 추출물 (GRE)의 항염증 효과를 살펴보았다.

II. 재료 및 실험방법

1. 甘露飲 추출물 (GRE)의 제조

실험에 사용된 甘露飲의 구성은 《太平惠民和劑局方》¹⁾에 기록된 내용에 준하였으며, 시료로 사용된 약재는 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 시료의 생약명은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of *Gamroem*

韓藥名	生藥名	重量(g)
枇杷葉	Eriobotryae Folium	16
石斛	Dendrobii Herba	16
黃芩	Scutellariae Radix	16
枳殼	Aurantii Fructus	16
天門冬	Asparagi Radix	16
麥門冬	Liriopsis Tuber	16
生地黃	Rehmanniae Radix Crudus	16
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	16
茵蔯	Artemisiae Capillaris Herba	16
甘草	Glycyrrhizae Radix	16
總量		160

교신저자 : 지선영, 대구 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속 대구한방병원 안이비인후피부과교실 (Tel : 053-770-2130, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr)

• 접수 2010/07/08 • 수정 2010/07/26 • 채택 2010/08/02

시료의 추출물은 시료 160 g에 물 1300 mL를 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 후 여과포로 여과한 액을 취하여 0.2 μm filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용할 때까지 -20°C 에서 보관하였다. 시료는 *in vitro* 실험시 배지에 용해하여 사용하였으며 GRE의 수득율은 20.2%였다.

2. 시약

DMEM, FBS, penicillin, streptomycin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였고, LPS, MTT, Griess reagent, carrageenan은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. DMSO는 Junsei Chemical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였고, iNOS antibody는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였으며, COX-2 antibody는 Cayman (Ann Arbor, Mi, USA)에서 구입하였다. P-I- κ B antibody는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였고, NF- κ B antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

3. 세포 배양

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^5 cell/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주하고 serum free 배지로 교환한 후 24시간 동안 배양하였다. GRE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml을 각각 넣고 1시간 후 LPS (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 배양하였다. control군은 대조군으로서 아무것도 처리하

지 않고 동일한 시간 동안 배양하였다.

4. 세포 독성 측정

시료를 처리하고 세포 배양 24시간이 지난 후 5 mg/ml 농도의 MTT 시약을 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 DMSO를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 용해시킨 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다 [i.e. viability (% control) = $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$].

5. NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였으며 6, 12, 18, 24시간의 시간대 별로 각각 측정하였다. 96 well plate에 세포 배양 상층액 50 μl 와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H_2O) 50 μl 를 혼합하여 넣고 15분 동안 반응시킨 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO_2^- 의 농도는 sodium nitrite를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Cytokine과 PGE_2 측정

GRE를 처리하고 세포 배양 18시간이 지난 후 상층액을 회수하여 -70°C 에서 보관하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6는 각각 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였고, PGE_2 는 R&D Systems, Inc. (Minneapolis,

MN, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

7. Immunoblot analysis

20 mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 15,000×g로 4°C에서 30분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. 정량한 단백질 50 µg을 취하여 10% SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 NC membrane으로 gel의 단백질을 blot시켰다. Blocking 후 iNOS, COX-2, p-I-κB 및 NF-κB 1차 antibody와 반응시킨 후 2차 antibody인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG를 반응시키고 ECL detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis를 위해 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

8. 실험동물

실험동물은 4주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (130~160 g)를 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20~23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험은 아무런 처리를 하지 않은 군을 Normal 군으로 하고 기염제인 carrageenan (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA; 100 µl/rat)만을 투여한 군을 Control군으로 하였으며, carrageenan

과 dexamethasone (1 mg/kg, p.o)을 투여한 Dexamethasone군, carrageenan과 0.3 g/kg의 GRE를 투여한 0.3 g/kg GRE군, carrageenan과 1.0 g/kg의 GRE를 투여한 1.0 g/kg GRE군으로 나누어 4일 동안 매일 1회 투여하였으며, 마지막 약물투여 1시간 후 carrageenan을 100 µl/rat로 rat의 오른쪽 발바닥에 주입하였다.

9. Paw edema의 유도 및 측정

4일째 약물을 투여하고 1시간 후 carrageenan을 투여하여 Paw edema를 유발시켰다. Paw edema의 측정은 carrageenan을 주입후 시간별로 (0, 1, 2, 3, 4시간) 부종측정기 (Plethysmometer, LE 7500; LETICA Scientific Instruments, Spain)를 이용하여 부종 정도를 측정하였다.

10. 조직처리

Paw edema의 유발과 회복여부를 살펴보기 위해 carrageenan으로 염증이 유발된 rat의 오른쪽 하지의 발목아래를 절단하여 조직을 채취하여, 후지 (後肢)의 발등 (*dorsum pedis*) 및 발바닥 (*ventrum pedis*)의 피부 실질조직을 분리하여 10% 중성포르말린에 6시간 이상 고정시킨 다음 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 µm의 longitudinal 절편을 제작하여 Hematoxylin-eosin 염색을 실시하고, 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 관찰하였다.

11. 조직학적 평가

Kim *et al*⁽⁶⁾의 방법을 변형시켜, 발등 및 발바닥 피부 (상피에서 진피)의 두께를 mm 단위로 40 배 현미경 시야에서 자동영상분석장치 (DMI-300 Image Processing; DMI, Korea)를 이용하여 각각 측정하였으며, 각각 1 mm²의 발등 및 발바닥 피부에 침윤된 염증세포의 수 역시 자동영상분석장

치를 이용하여, 200배 현미경 (Nikon, Japan) 시야에서 측정하였다.

12. 통계적 검증

실험결과는 mean±SD로 나타내었으며 처리군 간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Keuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

III. 결 과

1. NO 생성에 미치는 영향 (Fig. 1).

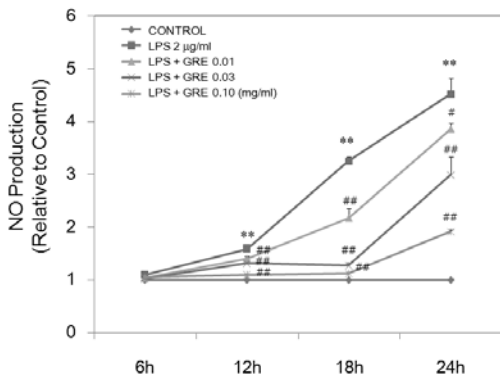


Fig. 1. Inhibitory effect of GRE on the LPS-induced production of NO.

RAW 264.7 cells were treated with 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml of GRE dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (2 µg/ml), and the cells were further incubated for 6~24 h. The concentration of nitrite and nitrate in culture medium was measured as described in the Methods section. Values represent mean±SD of three independent experiments. Values significant as compared to control, ** $p < 0.01$, significant as compared to LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

2. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성(Fig. 2).

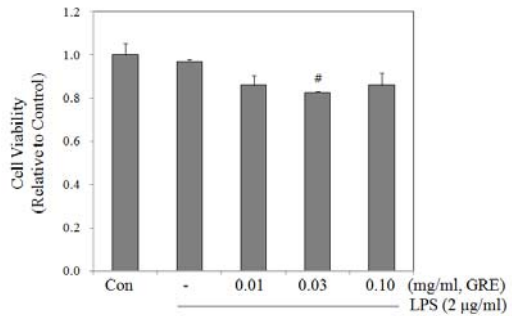


Fig. 2. Effect of GRE on the cell viability in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml of GRE dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (2 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Values represent mean±SD of three independent experiments. Values significant as compared to LPS alone, # $p < 0.05$

3. PGE2 생성에 미치는 영향(Fig. 3).

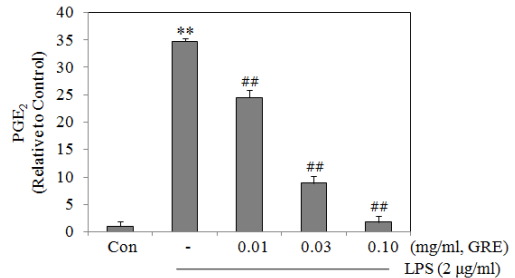


Fig. 3. Inhibitory effect of GRE on the LPS-induced synthesis of PGE2.

RAW 264.7 cells were treated with 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml of GRE dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (2 µg/ml), and the cells were further incubated for 18 h. The concentration of PGE2 in culture medium was measured by ELISA as described in the Methods section. Values represent mean±SD of three independent experiments. Values significant as compared to control, ** $p < 0.01$ significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$

4. iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향 (Fig. 4).

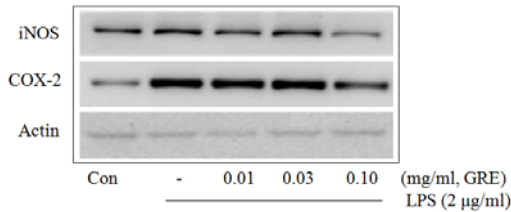


Fig. 4. Inhibitory effect of GRE on the LPS-induced iNOS and COX-2 protein expressions in RAW 264.7 cells.

Lysates were prepared from control or 24 h LPS (2 µg/ml) stimulated cells or from LPS plus GRE (0.01, 0.03, 0.10 mg/ml). Equal amounts of total protein (50 µg/lane) were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblot using specific anti-iNOS and anti-COX-2 antibodies. Actin is used as a loading control.

5. TNF-α 에 미치는 영향(Fig. 5).

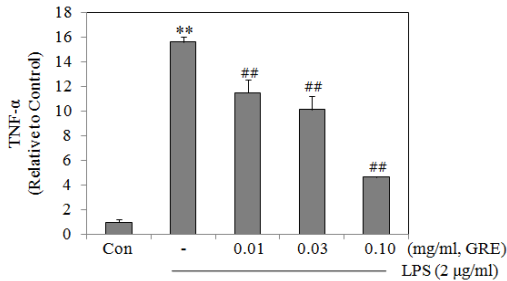


Fig. 5. Inhibitory effect of GRE on the LPS-induced production of TNF-α .

RAW 264.7 cells were treated with 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml of GRE dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (2 µg/ml), and the cells were further incubated for 18 h. The concentration of TNF-α in culture medium was measured by ELISA as described in the Methods section. Values represent mean±SD of three independent experiments. significant as compared to control, **p<0.01 significant as compared to LPS alone, ##p<0.01

6. IL-1β , IL-6에 미치는 영향(Fig. 6).

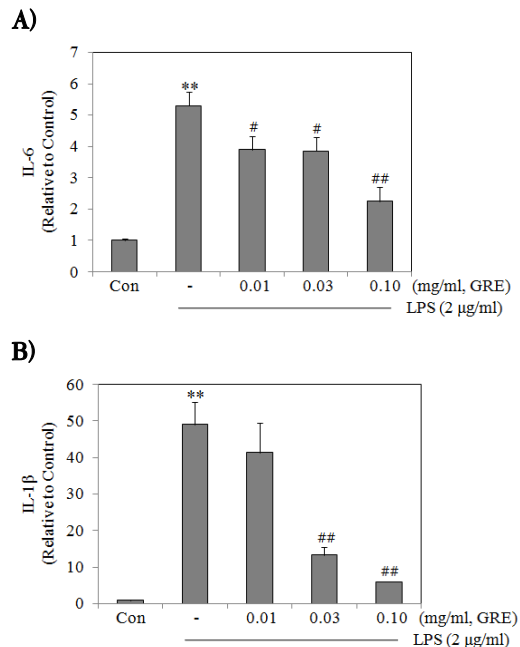


Fig. 6. The effect of HJE on GRE stimulated IL-1β , IL-6 production.

264.7 cells were treated with 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml of GRE dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (2 µg/ml), and the cells were further incubated for 18 h. The concentrations of IL-1β , IL-6 in culture medium was measured by ELISA as described in the Methods section. Values represent mean±SD of three independent experiments. significant as compared to control, **p<0.01 significant as compared to LPS alone, ##p<0.01

7. NF-κB 단백질 발현에 미치는 영향(Fig. 7).

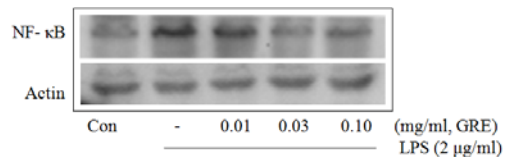


Fig. 7. Inhibitory effect of GRE on the LPS-induced NF-κB protein expressions in RAW 264.7 cells.

The level of NF- κ B protein was monitored 1 h after treatment of cells with LPS (2 μ g/ml) with or without GRE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). Actin is used as a loading control.

8. 급성염증 모델의 paw edema에 미치는 영향 (Fig. 8).

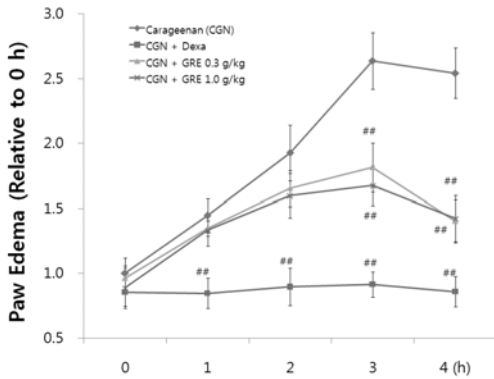


Fig. 8. Inhibition of carrageenan-induced paw edema by GRE

GRE was administered to rats at an oral dose of 0.3, 1.0 g/kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The swelling of the paw was measured 0~4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean \pm SD of six animals. significant compared with carrageenan alone. ##p<0.01

9. 급성염증 모델의 조직 변화에 미치는 영향

Carrageenan으로 유도된 발부종의 조직학적 평가를 위하여 발부종 측정을 끝내고 실험동물을 희생하여 부종발의 피부두께 및 침윤 염증세포를 측정하였다.

본 실험의 결과, 발등피부의 두께는 정상군에서 0.88 \pm 0.16 (mm)이었으나, carrageenan군이

1.88 \pm 0.27 (mm)로 유의성 있게 증가하였고, dexamethasone 및 GRE 1.0 g/kg를 처치한 실험군에서 0.76 \pm 0.13, 1.23 \pm 0.15 (mm)로 유의하게 감소하였다. 부종 발의 발등 조직에서 침윤 염증세포의 수 역시 정상군에서는 6.80 \pm 2.59 (cell/mm²)이었으며, carrageenan군은 29.80 \pm 1.30 (cell/mm²)로 유의성 있게 증가하였다. 염증세포의 증가는 dexamethasone 및 GRE 1.0 g/kg의 처치에 의해 8.40 \pm 2.07, 10.60 \pm 1.67 (cell/mm²)을 나타내어 유의하게 감소되었다 (Table 2).

발바닥 부위의 피부두께에 있어서도 정상군은 0.71 \pm 0.15 (mm)이었으나, carrageenan군에 있어서는 1.92 \pm 0.18 (mm)으로 유의성 있게 증가하였으며, 발바닥 피부의 두께 역시 dexamethasone 및 GRE 0.3, 1.0 g/kg를 처치한 실험군에서 0.82 \pm 0.31, 1.24 \pm 0.18, 1.15 \pm 0.11 (mm)로 유의하게 감소하였다. 부종 발의 발바닥 조직에서의 침윤 염증세포는 정상군이 7.00 \pm 3.39 (cell/mm²)이었으며, carrageenan군은 890.60 \pm 143.57 (cell/mm²)로 유의한 증가를 나타내었다. 염증세포의 침윤은 발 등 조직에서와 마찬가지로 dexamethasone 및 GRE 0.3, 1.0 g/kg의 처치에 의해 111.00 \pm 67.71, 250.60 \pm 48.01, 170.00 \pm 43.76 (cell/mm²)로 유의하게 억제되었다 (Table 2).

IV. 고 찰

甘露飲은 《太平惠民和劑局方》에 기재된 처방으로 枇杷葉, 石斛, 黃芩, 枳殼, 天門冬, 麥門冬, 生地黃, 熟地黃, 茵陳, 甘草로 구성되며 “治 丈夫婦人 小兒 胃中客熱 牙宣口氣 齒齲腫爛 時出膿血...口舌生瘡 咽喉腫痛 瘡疹已發未發 皆可服之”라 하여 치은염, 구내염, 구강 궤양, 치조농루, 괴혈병, 편도선염, 설암, 베체트병 등의 염증성 질환에 사용된다^{1,2)}.

Table 2. Changes of Histomorphometrical Measurements in the Present Study

Groups	<i>Dorsum pedis</i> skin		<i>Ventrum pedis</i> skin	
	Thickness (mm)	Infiltrated inflammatory cells (cell/mm ²)	Thickness (mm)	Infiltrated inflammatory cells (cell/mm ²)
Controls				
Normal	0.88 ± 0.16	6.80 ± 2.59	0.71 ± 0.15	7.00 ± 3.39
Carrageenan	1.88 ± 0.27**	29.80 ± 1.30**	1.92 ± 0.18**	890.60 ± 143.57**
Dexamethasone	0.76 ± 0.13##	8.40 ± 2.07##	0.82 ± 0.31##	111.00 ± 67.71##
GRE treated groups				
0.3 g/kg	1.74 ± 0.17	27.80 ± 5.07	1.24 ± 0.18##	250.60 ± 48.01##
1.0 g/kg	1.23 ± 0.15##	10.60 ± 1.67##	1.15 ± 0.11##	170.00 ± 43.76##

GRE was administered to rats at an oral dose of 0.3, 1.0 g /kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Values are expressed as mean±SD of 5 histological fields.

**p<0.01 as compared with Normal control

##p<0.01 as compared with Carrageenan control

甘露飲을 구성하는 각 약물의 효능을 살펴보면 枇杷葉은 苦微寒한 性味로 化痰止咳 和胃降逆 하는 효능이 있어 肺熱咳嗽 胃熱嘔逆 煩熱口渴 등을 치료하고, 石斛은 甘寒한 性味로 益胃生津 滋陰清熱 하는 효능이 있어 熱病傷津 口乾煩渴 病後虛熱 등을 치료하며, 黃芩은 苦寒한 性味로 寫實火 除濕熱 止血 하는 효능이 있어 壯熱煩渴 肺熱咳嗽 黃疸 吐衄 目赤腫痛 癰腫疔瘡 등을 치료하고, 枳殼은 辛苦涼한 性味로 破氣 行痰 消積 하는 효능이 있어 胸膈痰滯 胸痞 噯氣 嘔逆 등을 치료한다. 天門冬은 甘苦寒한 性味로 滋陰潤燥 清肺降火 하여 陰虛發熱 咳嗽吐血 肺痿 咽喉腫痛 등을 치료하고, 麥門冬은 甘微苦微寒한 性味로 養陰潤肺 清心除煩 益胃生津 하는 효능이 있어 肺燥乾咳 吐血 咯血 咽乾口燥 熱病傷津 등을 치료하며, 生地黄은 甘苦寒한 性味로 清熱生津 涼血止血 하는 효능이 있어 發斑發疹 吐血 衄血 咽喉腫痛 등을 치료하고, 熟地

黃은 甘微溫한 性味로 滋陰補血 填髓하는 효능이 있어 肝腎陰虛 腰膝酸軟 骨蒸潮熱 內熱消渴 등을 치료한다. 茵陳은 苦微寒한 性味로 清利濕熱 退黃疸 하는 효능이 있어 濕熱黃疸 小便不利 濕瘡癢痒 등을 치료하며, 甘草는 甘平한 性味로 和中緩急 潤肺 造化諸藥의 효능이 있어 咽喉腫痛 消化性潰瘍 癰疽瘡瘍 등을 치료한다¹⁷⁾.

현재 甘露飲에 관한 연구는 齒衄의 치료에 대한 문헌적 연구¹⁴⁾가 있으나 면역반응 및 염증반응에 미치는 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 甘露飲 추출물 (GRE)의 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극으로 분비되는 염증매개물질 억제와 염증의 주요 증상 중 하나인 부종 억제를 통해 항염증 효과를 평가함으로써, GRE가 면역체계에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

NO는 염증반응을 조절할 수 있는 인자 중 하나

로 알려져 있으며 다른 free radical이나 중금속과 쉽게 반응하고 혈관확장, 신경전달체제, 항균물질, 면역조절 등의 생체 내 작용에 관여한다¹⁸⁾. L-arginine으로부터 NOS를 경유하여 생성되는 radical로 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다. NOS는 크게 cNOS와 iNOS 두 가지로 분류되는데 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체 내 항상성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 iNOS는 LPS, IFN- γ , IL-1 및 TNF- α 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포, 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다^{20,21)}. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 다발성 경화증, 류마티스 관절염과 같은 각종 염증성 질환의 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

대식세포는 자연 면역 뿐만 아니라 획득 면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있다^{22,23)}. LPS에 의한 대식세포의 활성화는 염증 매개물질인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등 다양한 cytokine을 유도하며 염증매개물질의 생성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 생성 과정으로 이어지게 된다^{24,6)}.

RAW 264.7 세포에서 GRE의 NO 생성 저해 정도를 관찰하기 위하여 GRE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO 생성량이 LPS를 처리한 12, 18, 24시간

후 유의하게 증가하였으며, GRE를 처리한 실험군에서는 12, 18, 24시간에서 유의하게 NO 생성을 저해하였다(Fig. 1). 이 실험결과가 GRE의 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하기 위해 GRE를 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험 결과 LPS 단독 처리군과 GRE 0.01, 0.10 mg/ml 처리군에서는 control군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았으나, GRE 0.03 mg/ml 농도에서 미약한 세포독성을 나타내었다(Fig. 2).

NO는 L-arginine으로부터 NOS를 경유하여 생성되므로²⁷⁾ NO 생성 저해에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현을 조사하였다. 실험결과 LPS 처리 시에는 iNOS 단백질의 발현이 뚜렷하게 증가되었으나, LPS에 GRE 0.10 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 발현이 현저히 감소하여, LPS와 GRE를 동시에 처리하였을 때 iNOS 단백질의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). GRE에 의한 iNOS 단백질 발현 저해는 NO 생성 저해와 매우 유사한 경향을 나타냄으로써 NO 생성 저해는 iNOS 단백질 발현 저해를 경유한 것임을 확인할 수 있었다.

TNF- α , IL-1 β , IL-6 등은 전염증성 cytokine으로 염증반응을 조절하며 서로 간에 상호작용을 하는 것으로 알려져 있는데 염증반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다^{28,29)}.

TNF- α 는 LPS반응의 주요 매개체로서 선천성 면역 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 대식세포와 비만세포에서 분비되는 TNF- α 는 종양세포에 세포독성을 나타내며 만성염증성 반응과 관련되어 있다. IL-1 β 는 단핵세포, 대식세포, B 세포, 수지상세포, 혈관내피세포, 호중구와 간세포에서 분비되며, TNF- α , IL-2, IL-6와 함께 전염증성 cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어

있다. 특히 IL-1 β 는 T 세포의 activation, B 세포의 maturation, NK 세포의 activity를 활성화 한다. IL-6는 단핵세포와 대식세포에 의해 분비되는데 분화된 B 세포가 형질세포로 분화되도록 촉진시키고 antibody의 분비를 자극한다. IL-6는 또한 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다^{30,31}.

본 실험에서 LPS는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며 GRE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml은 LPS로 유도된 TNF- α , IL-6를 유의성 있게 감소시켰으며, GRE 0.03, 0.10 mg/ml은 IL-1 β 를 유의하게 감소시켰다(Fig. 5, 6).

COX는 중요한 생물학상 매개체인 prostaglandins, prostacyclin, thromboxanes 등을 포함하는 prostanoids 형성에 관여하는 효소이다. COX에는 COX-1과 COX-2가 존재하는데 COX-1은 항상성을 조절하기 위한 prostaglandin 합성에 관여하고 COX-2는 염증반응 부위에서 활성화된 대식세포에 의해 염증반응을 매개하는 prostaglandin 합성에 관여한다^{32,33}. PGE₂는 COX-2 활성화 후에 생성되며 주로 비만세포나 대식세포에 의해 분비된다. 또한 염증부위의 부종, 통증, 감각과민을 초래하는 histamine, bradykinin, NO 등과 더불어 혈관 투과성을 증가시킨다³⁴.

본 실험에서 LPS는 PGE₂의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, GRE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml은 LPS로 유도된 PGE₂를 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3). GRE에 의한 PGE₂의 생성 저해가 COX-2 단백질 저해로 인한 것인지를 관찰하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 COX-2 단백질의 발현을 조사하였다. 실험 결과 LPS 처리 시에는 COX-2 단백질의 발현이 증가되었으나, LPS에 GRE 0.10 mg/ml을 처리한 실험군에서는 COX-2의 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 4). 이는 LPS와 GRE를 동시에 처리하였을 때 PGE₂의 생성이 저해된 결과와 일치함을 보여

주고 있다. GRE에 의한 COX-2 단백질 발현 저해는 PGE₂ 생성 저해와 매우 유사한 경향을 나타냄으로써 PGE₂ 생성 저해는 COX-2 단백질 발현 저해를 경유한 것임을 확인할 수 있었다.

NO를 생성하는데 관여하는 iNOS의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NF- κ B, AP-1, C/EBP 등이 있으며²⁹, 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NF- κ B이다¹⁰. NF- κ B는 세포사멸 억제, 세포주기 조절, oncogenesis 등과도 관련이 있으며³⁵, 바이러스나 박테리아 감염 시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF- α 유전자 발현에 관련된다²⁹. 휴식세포에서 NF- κ B는 세포질 내에서 inhibitory molecule인 I- κ B α , I- κ B β , I- κ B ϵ , p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NF- κ B signaling cascade가 활성화되면 I- κ B, p105, p100이 degradation되면서 NF- κ B가 핵 내로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-xL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. I- κ B protein의 종류는 I- κ B α , I- κ B β , I- κ B ϵ 등으로 알려져 있지만 세포에서 가장 풍부한 NF- κ B의 inhibitory protein은 I- κ B α 이다³⁵.

본 실험에서는 핵 내에서 NF- κ B의 발현량을 측정하였다. LPS 처리 시에는 핵내에 존재하는 NF- κ B의 발현이 증가되었으나, LPS에 GRE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml을 처리한 실험군에서는 NF- κ B의 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 7). 이는 GRE가 유도하는 iNOS 및 COX-2의 감소는 NF- κ B의 translocation이 억제됨으로 인한 것임을 의미한다.

염증의 주요 증상 중 하나인 부종을 유도하기 위하여 사용한 carrageenan 유도 급성염증 모델은 carrageenan의 대식세포에 대한 선택적 독성작용에 의해 염증을 일으키는 특성을 이용한 것이다. carrageenan은 해조류에서 추출한 LPS의 일종으로 부종을 유발하며, 1시간까지의 초기 부종기에는

histamine, 5-hydroxytryptamine, kinin, PAF 등의 물질이 관여하고, 1시간 이후 6시간까지 후기 부종기에는 prostaglandin, superoxide anion, NO 등이 관여하는 것으로 알려져 있다^{36,37)}.

GRE가 *in vivo*에서도 항염증 효과를 나타내는지를 평가하기 위하여 carrageenan으로 유도된 rat의 발 부종에 대한 GRE의 효과를 평가하였다. carrageenan은 염증세포의 침윤을 동반한 급성부종을 초래하므로, 현재항염증 물질의 급성 염증에 대한 효력평가에 널리 이용되고 있는 *in vivo* 모델로서^{38,39)}, 조직학적으로는 투여부위에 국소적인 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 부종이 관찰되는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾.

본 실험의 결과에서도 carrageenan을 처치한 군에서는 발 부종을 유발하였고, GRE는 carrageenan 처치 후, 3시간과 4시간에 유의한 족부부종의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 8). 또한, carrageenan군은 현저한 침윤 염증세포의 수적 증가 및 부종성 변화에 의한 발등 및 발바닥 피부 두께의 증가가 관찰되었다. 이러한 carrageenan 유발 급성 부종성 염증 소견은, 발등에서는 1.0 g/kg의 GRE 투여에 의해 유의성 있게 현저히 억제되었으며, 발바닥에서는 0.3 및 1.0 g/kg의 GRE 투여군에서 유의성 있게 억제되었다(Table 2).

발등 피부에 침윤된 염증세포의 수는 carrageenan군에서 유의성 있는 증가를 나타내었으며, dexamethasone 및 1.0 g/kg GRE 처리군에서는 carrageenan군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 2, Fig. 10). 발바닥 피부에 침윤된 염증세포의 수는 carrageenan군에서 유의성 있는 증가를 나타내었으나, dexamethasone, 0.3 g/kg GRE, 1.0 g/kg GRE처리군에서는 carrageenan군에 비교하여 유의한 감소를 나타내었다(Table 2).

이상의 결과로 GRE는 *in vitro*, *in vivo*에서 모두 유의한 항염증작용을 나타냄을 보여주었다. 위의 결과를 종합하면 GRE는 LPS로 유도된 염증

모델에서 NF- κ B가 핵 내로 translocation되는 기전을 억제하며 그에 따른 결과로 iNOS, COX-2 단백질 발현 및 NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성을 저해함으로써 유의한 항염증 효과가 있음을 보여준다. 이러한 연구결과는 GRE를 활용한 염증반응 조절제 개발의 가능성을 제시하고 있다.

V. 결 론

GRE의 항염증효능을 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서의 NO의 생성량, iNOS, COX-2, NF- κ B의 발현 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ 등에 미치는 GRE의 영향 및 carrageenan으로 유도된 rat의 paw edema에 미치는 GRE의 영향을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS는 NO의 생성량을 유의성 있게 증가시켰으며, 이러한 증가는 GRE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 전처치에 의하여 시간 및 농도의존적으로 유의하게 억제되었다. 또한 GRE는 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였다.
2. GRE는 LPS로 증가된 핵분획에서의 NF- κ B의 발현을 유의하게 억제하였다.
3. GRE는 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 분비되는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 유의하게 억제하였다.
4. LPS에 의해 발현이 증가된 COX-2, PGE₂ 역시 GRE에 의하여 유의하게 감소하였다.
5. carrageenan으로 유도된 rat의 paw edema에 대하여 GRE는 carrageenan으로 유발된 급성 부종성 염증 소견을 유의성 있게 억제하였다.

이러한 결과는 甘露飲이 염증성 질환의 예방 및

치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. 太平惠民和劑局. 太平惠民和劑局方. 北京:人民衛生出版社. 1985:216.
2. 한의학대사전 편찬위원회. 한의학대사전. 서울:정담. 1998:44.
3. Chun SC, Jee SY, Lee SG, Park SJ, Lee JR, Kim SC. Anti-Inflammatory activity of the methanol extract of Moutan Cortex in LPS-activated RAW 264,7 cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2007;4(3):327-33.
4. Yoon TG, Byun BH, Kwon TK, Suh SI, Byun SH, Kwon YK, Kim SC. Inhibitory effect of Farfarae Flos water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264,7 cells. *Korean J oriental Physiology & Pathology.* 2004;18(3):908-13.
5. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2003;17(3):771-6.
6. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, Chung HT. 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.* 2001;76(1):59-64.
7. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264,7 대식세포에서 당귀 에탄올추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지.* 2002;10(2):189-97.
8. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264,7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 2000;28(2):217-26.
9. 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.* 2000;406(3):301-9.
10. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 五味消毒飲이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2002;16(5):921-7.
11. 이상문, 홍승욱. Mouse cell에서 托裏消毒飲의 항산화작용과 항염증효과. *한방안이비인후피부과학회지.* 2007;20(3):43-50.
12. Lim JH, Lee JR, Kim SC, Jee SY. Inhibitory effect of Yongdamsagantang water extract on IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264,7 cells. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine.* 2007;7(3):321-9.
13. 서은성, 황충연, 김남권. 加味清上防風湯의 항염증 효과에 대한 실험적 연구. *한방안이비인후피부과학회지.* 2008;21(2):54-70.
14. 이재용, 황치원. 齒衄의 治療에 對한 文獻的 考察. *대전대학교 한의학연구소 논문집.* 2000;8(2):191-210.
15. 임성우. 수종 한약 처방 전탕액의 허피즈바이러스에 대한 효능 검색. *한방내과학회지* 2000;21(2):291-7.

16. Kim HD, Cho HR, Moon SB, Shin HD, Yang KJ, Park BR, Jang HJ, Lim LS, Lee HS, Ku SK. Effect of exopolymers from *Aureobasidium pullulans* on formalin-induced chronic paw inflammation in mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2006;16(12):1954-60.
17. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1995:178-9, 191, 329, 352, 476, 541, 580, 589-90, 592.
18. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:434-56.
19. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*. 2000;47(1):6-9.
20. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264,7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69(6):625-35.
21. 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 RAW 264,7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2001;76(1):119-23.
22. 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*. 2000;10(1):8-15.
23. 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. *J Immunol*. 1990;144(4):1425-31.
24. 임정호, 오경재, 유영천. 니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 Nitric Oxide의 역할. *대한산업의학회지*. 2001;13(3):274-85.
25. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;211(1):24-32.
26. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF- α and IFN- γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*. 1994;6(4):399-406.
27. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1998;333:664-6.
28. 신경민, 박영미, 김인태, 홍선표, 홍정표, 이경태. Amygdalin의 Murine Macrophage RAW 264,7 세포에서 *in vitro* 항염효과. *생약학회지*. 2003;34(3):223-7.
29. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:397-440.
30. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology*. 2003;139(1):11-20.
31. 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*. 2003;37(6):355-61.
32. Sarkar D, Saha P, Gamre S, Bhattacharjee S, Hariharan C, Ganguly S, Sen R, Mandal G, Chattopadhyay S, Majumdar S, Chatterjee M. Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(9):1264-71.
33. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:525-34.
34. Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Yang HL. Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5:1914-25.
35. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappa B in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 2001;159(2):387-97.
36. Shen Q, Chen F, Luo J. Comparison studies on chemical constituents of essential oil from *Ramulus Cinnamomi* and *Cortex Cinnamomi* by GC-MS. *Zhong Yao Cai*. 2002;25(4):257-8.
37. Fox JB, Doerr RC, Lakritz L. Interaction between sample preparation techniques and three methods of nitrite determination. *J Assoc Off Anal Chem*. 1982;65(3):690-5.
38. Lee JH, Choi YH, Choi BT. The anti-inflammatory effects of 2 Hz electroacupuncture with different intensities on acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Int J Mol Med*. 2005;16(1):99-102.
39. Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P, Selvan VT. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6:36.
40. Holt S, Comelli F, Costa B, Fowler CJ. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 2005;146 (3):467-76.