

# 連芩止痢湯 물 추출물의 항염증작용에 관한 연구

김정환<sup>1</sup> · 이장석<sup>1</sup> · 강옥화<sup>2</sup> · 권동열<sup>2</sup> · 이기남<sup>1,3</sup> · 정명수<sup>1,3,\*</sup>

1: 원광대학교 한의과대학 예방의학교실, 2: 원광대학교 약학대학 한약학과, 3: 원광대학교 전통의학연구소

## Study on the Anti-inflammatory Effect of Yeonguemjiri-tang Water Extract

Jung Hwan Kim<sup>1</sup>, Jang Suk Lee<sup>1</sup>, Ok Hwa Kang<sup>2</sup>, Dong Yeul Kwon<sup>2</sup>, Ki Nam Lee<sup>1,3</sup>, Myong Soo Chong<sup>1,3,\*</sup>

1: Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine,

2: Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, 3: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Yeonguemjiri-tang(連芩止痢湯, YGT) exhibits potent anti-inflammatory activity in widely intestine disease, but its mechanism undisclosed. To elucidate the molecular mechanisms of YGT on pharmacological and biochemical actions in inflammation, we examined the effect of YGT on pro-inflammatory mediators in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus A23187-induced mast cell and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. The investigation focused on whether YGT inhibited pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in PMA plus A23187- induced HMC-1 cells and inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. We found that YGT inhibited LPS-induced NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 productions as well as the expressions of iNOS and COX-2. These results suggest that YGT has inhibitory effects on mast cell-mediated and macrophage-mediated inflammation.

Key words : Yeonguemjiri-tang, Anti-inflammatory, HMC-1 cells, RAW 264.7

### 서 론

連芩止痢湯은 李兆華 편저의 《傳染病證治從新》에 나오는 처방으로<sup>1)</sup>, 燥濕解毒, 殺蟲止痢하는 효능이 있어, 이질 등의 濕熱 蘊腸證을 主治하였다. 이는 처방중의 黃連과 黃芩의 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 白頭翁과 馬齒莧의 淸熱解毒과 涼血止痢, 槐花의 涼血 止血, 厚朴의 行氣燥濕, 防己의 利水消腫과 祛風止痛, 五味子の 固澀止瀉 작용에 의한 것으로 설명할 수 있다<sup>2)</sup>. 최근에는 연금지리탕은 세균성이질과 아메바성이질, 과민성 결장염, 궤양성 대장염, 급성장염 등의 치료에 광범위하게 사용되고 있으나<sup>3)</sup>, 이에 대한 연구는 전무한 상태이다. 특히 염증작용에 임상에서 많이 사용되어 온 점에 착안하여 연금지리탕의 추출물이 자극원으로 유도한 세포내의 염증반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 in vitro에서 염증성 매개체들의 생성을 억제하는지 조사하였다.

대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주

반응에 관여하여 항상성을 유지하는 것으로 알려져 있으며, 산화적 스트레스 상황에서 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 NO를 생성하여 염증반응에서 중요한 역할을 한다<sup>4)</sup>. 특히 대식세포에서 리포다당류(Lipopolysaccharide; LPS), 사이토카인, TNF- $\alpha$ 와 같은 자극에 의해 발현되는 iNOS는 장시간 동안 다량의 NO를 생산한다. NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌 (L-arginine)으로부터 NO를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>5,6)</sup>.

비만세포는 Ehrlich에 의해 처음 관찰, 명명 되었는데 결합 조직에 많이 존재하고 있으며, 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있다<sup>7)</sup>. 면역학적 또는 비면역학적 자극에 의하여 활성화된 비만세포는 세포질 과립에 저장된 매개물질들(히스타민, 헤파린, 세로토닌, 가수분해효소 등)과 많은 cytokine을 분비하여 여러 면역반응과 염증반응에 관여한다. 특히, Interleukin (IL)-8은 염증조직 안으로 호중구를 보충해주는

\* 교신저자 : 정명수, 익산시 신용동 원광대학교 한의과대학 예방의학교실

· E-mail : neurokid@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6912

· 접수 : 2011/11/18 · 수정 : 2011/12/13 · 채택 : 2011/12/15

역할을 하는 중요한 염증성 매개자이며, 자극원의 자극에 의해서 강력하게 활성화 된다<sup>8-10)</sup>. 또한, 다양한 염증성 질환에서 염증 반응의 개시와 유지에 중추적인 역할을 한다<sup>11)</sup>. 또 다른 사이토카인인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 간에서 염증에 대한 급성반응을 유도하여 체온을 상승시키고, 근육과 지방 세포에 작용해 에너지 대사를 변화시켜 체온을 높게 된다. 특히, TNF- $\alpha$ 는 혈관내피세포를 활성화시키고 혈관투과성을 높여 이미 형성된 IgG, 보체의 염증세포로의 유입을 용이하게 한다<sup>12)</sup>.

따라서 본 연구에서는 연금지리탕이 비만세포와 대식세포를 매개한 염증반응에서 염증매개체의 생성과 발현을 억제하는지 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Bovine serum albumin(BSA), LPS, PMA, A23187 (Calcymin; C29H37N3O6), PD98059와 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 그리고 다른 시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. IMDM, RPMI 1640, 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, FBS) 및 항생제는 하이크론사 (Hyclone, USA)로부터 구입하였고, 조직배양 플레이트와 직경 100 mm 페트리접시는 넉크사 (Nunc, Inc, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Anti-human TNF- $\alpha$ /IL-6 /IL-8 antibodies, biotinylated anti-human TNF- $\alpha$ / IL-6 /IL-8 antibodies, and recombinant human TNF- $\alpha$ /IL-6 /IL-8 는 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

#### 2) 약제

연금지리탕에 들어가는 약재 황련, 황금, 백두옹, 마치현, 괴화, 후박, 방기, 오미자는 음니허브(한국) 제품을 대한한약국(익산, 한국)에서 구입하였으며, 원광대학교 한약학과에서 정선하였다(Table 1).

Table 1. The composite of Yeonguemjiri-tang

藥物	生藥名	用量(g)	原產地
黃連	Coptidis Rhizoma	3	China
黃芩	Scutellariae Radix	8	Korea
白頭翁	Pulsatillae Radix	8	China
馬齒莧	Portulacae Herba	8	Korea
槐花	Sophorae Flos	8	China
厚朴	Magnoliae Officinalis Cortex	3	China
防己	Stephaniae Tetrandrae Radix	4	China
五味子	Schisandrae Fructus	4	Korea
Total		46	

#### 3) 세포

인간 비만 세포주(Hunam mast cell line, HMC-1)는 IMDM medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)에 10% fetal bovine serum과 100 U/mL penicillin/streptomycin sulfate를 첨가하여 배양하였다. 그리고 배양 환경은 5% CO<sub>2</sub> 와 37℃를 유지하였다.

PMA, A23187은 HMC-1 세포의 자극제로 사용하였다.

또한, 설치류 대식 세포주(murine macrophage cell line, RAW 264.7)는 한국 세포주 은행으로부터 구입하여 사용하였다 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology/American Tissue Culture Collection). 대식세포주는 항생제 및 항균제로서 100 U/ml의 페니실린 G와 100 U/ml의 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가하고 10% 열처리 우태아 혈청(heat inactivated FBS)을 첨가한 완전한 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>의 습한 대기, 37℃의 온도조건으로 배양하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 조제

연금지리탕 물추출물(YGT)은 증류수 (100 g/L)로 2시간 동안 달여서 준비하였다. 그 추출물은 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여, 감압하에 동결 건조(lyophilized)하였으며, 4℃에서 보관하였다. 동결건조된 추출물은 실험하기 위하여 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 용해하였다.

#### 2) MTT 분석

세포 생존력은 MTT assay를 이용하였다. 연금지리탕을 처리한 세포에 10  $\mu$ l의 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml) 용해액을 첨가한 후 37℃에서 4시간 보존한다. 세포배양 상층액을 제거하고 100  $\mu$ l의 DMSO를 첨가하여 MTT를 용해시킨 후 microplate reader기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 3) NO 생성량 측정

연금지리탕 물추출물 (0.5, 1 mg/mL)의 농도로 전처리하고 여기에 LPS (200 ng/ml)를 각각 주입한 다음 상기 대식 세포주 RAW264.7을 24시간 배양하였다. 배양한 대식세포주의 상층액을 수집하여 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)와 동량으로 주입한 후 10분간 실온에서 방치하였다. 아질산의 농도는 ELISA 리더기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 세포가 없는 배양액은 아질산이 0-100  $\mu$ M로 나타나, 이 값을 표준으로 하여 여러 실험군의 아질산 값의 흡광도를 측정하였다.

#### 4) ELISA

세포를 24 well tissue culture plates 안에 well당 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 개의 세포들을 배양해 LPS 또는 PMA+A23187로 자극하기 전에 30분간 두 가지 농도(0.5, 1 mg/mL)의 연금지리탕 추출물로 전 처리되었다. 세포는 24 well tissue culture plates 안에 well당 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 개의 세포들을 배양해 연금지리탕 물추출물 (0.5, 1 mg/mL)의 농도로 전처리 한 후 LPS 또는 A23187(1  $\mu$ M) + PMA(50 nM)로 자극하였다. ELISA plate(Falcon, Becton Dickinson Labware, USA)는 coating buffer(0.1 M carbonate, pH 9.5)에서 희석되어진 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  항체로 4℃에서 밤새도록 덧입혀졌다. 다음에 0.05% tween 20(PBS-T)을 함유한 PBS로 4번을 세척했다. 단백질이 결합할 수 있는 장소는 적어도 1시간 동안 assay diluent(FBS10% 농도의 PBS pH 7.0)로 차단되었고 각 샘플의

100  $\mu$ L 혹은 assay diluent로 표준 희석되어진 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  는 well에 적용되었다. 2시간 동안 배양한 후에, 100  $\mu$ L의 발효 작용 검출기(바이오티닐레이트된 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  모노클로날 항체와 avidin-HRP가 첨가되어 1시간 동안 배양되었다. 그 후, 100  $\mu$ L의 기질용해제 (tetramethylbenzidine (TMB))가 각 well에 첨가되었고 50 $\mu$ L의 stop solution(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)에 의해 그 반응이 멈춰지기 전 30분간 암실에서 배양되었고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 이후의 절차들은 실온에서 이루어졌고, 모든 표준 규격품 및 샘플들은 세 번씩 측정되었다.

5) Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척 한 후 1 ml의 lysis buffer를 첨가하여 30 분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 protein assay Kit (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 20-30  $\mu$ g의 lysate를 8-12% mini gel SDS-OAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5 % skim milk가 함유된 TBS-T (TBS+0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 1시간 동안 실시하였다. ERK의 발현 양을 검토하기 위해 항체로는 anti-mouse COX-2, iNOS (1 : 1000)를 TBS-T 용액에서 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 배양시킨 후 다음날 TBS-T로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG를 1 : 2000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBS-T로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1-3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

3. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과를 각 항목에 따라 평균치 $\pm$  표준편차(S.D)를 구하여 신뢰수준 99% ( $p < 0.01$ )에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. 연금지리당 물추출물(YGT)이 세포생존율에 미치는 영향

연금지리당 물추출물(YGT)이 세포독성에 영향을 주는지 알아보기 위해 MTT 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. YGT를 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 처리 하였을 때 모두에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. HMC-1 세포에서 YGT의 IL-6 생성에 대한 영향

YGT가 Pro-inflammatory cytokine인 IL-6의 생성에 영향을 주는 지 ELISA를 이용하여 실험하였다. PMA+A23187로 활성화된 HMC-1 세포에서 IL-6의 생성량이 현저히 증가하였고, YGT를 0.5, 1 mg/mL 농도로 처리하였을 때 IL-6 생성 역시 농도 의존적으로 억제 하는 양상을 보였다(Fig. 2).

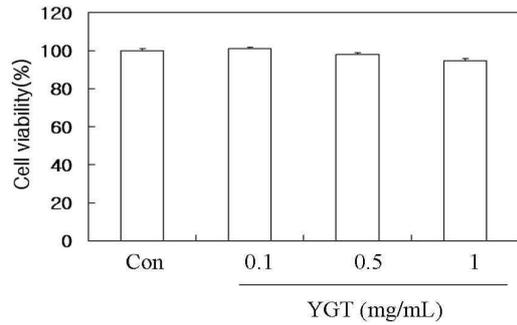


Fig. 1. Effect of YGT on cell viability in HMC-1 cells. Cell viability was evaluated with the MTT assay. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. of duplicate determinations from three separate experiments.

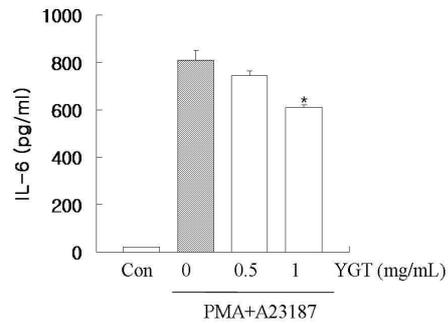


Fig. 2. Effect of YGT on production of IL-6 in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with YGT (0.5 and 1 mg/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 8 h. The production level of IL-6 was determined by ELISA. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. \* $p < 0.01$  compared with PMA+A23187-stimulated values.

3. HMC-1 세포에서 YGT의 IL-8 생성에 대한 영향

PMA+A23187로 활성화된 HMC-1 세포에서 IL-8의 생성에 관해 YGT의 억제효과를 실험하였다. 상층액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. YGT가 LPS로 유도된 IL-8의 생성을 농도 의존적으로 억제한다는 것을 보여준다. YGT는 고농도 (1 mg/mL)에서 IL-8 생성을 67% 억제하고 저농도 (0.5 mg/mL)에서 IL-8 생성을 24% 억제하는 것을 보여주었다(Fig. 3).

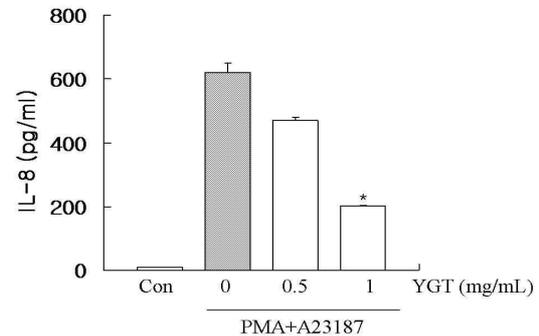
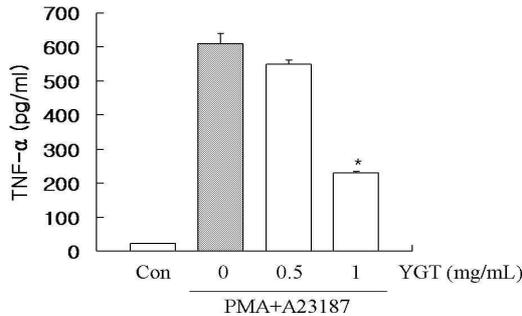


Fig. 3. Effect of YGT on production of IL-8 in LPS-induced HMC-1 cells. HMC-1 cells were pretreated with YGT (0.5 and 1 mg/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 8 h. The production level of IL-8 was determined by ELISA. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. \* $p < 0.01$ , compared with LPS-stimulated values.

4. HMC-1 세포에서 YGT의 TNF- $\alpha$  생성에 대한 영향

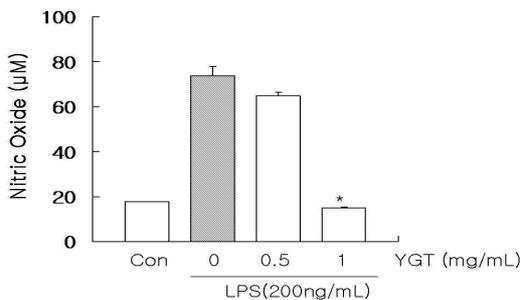
YGT의 전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 HMC-1 세포들 안에서 A23187+PMA로 유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성에 대해 YGT의 억제효과를 실험하였다. 상층액은 ELISA 방법에 의해 측정되었다. YGT가 A23187+PMA로 유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성을 농도 의존적으로 억제한다는 것을 보여준다. 특히, YGT 고농도 (1 mg/mL)에서 TNF- $\alpha$  생성을 62% 억제하는 것을 보여주었다(Fig. 4).



**Fig. 4. Effect of YGT on production of TNF- $\alpha$  in PMA plus A23187-induced HMC-1 cells.** HMC-1 cells were pretreated with YGT (0.5 and 1 mg/mL) for 1 h prior to PMA+A23187 stimulation for 8 h. The production level of TNF- $\alpha$  was determined by ELISA. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. \* $p$ <0.01 compared with PMA+A23187-stimulated values.

## 5. RAW 264.7 세포에서 YGT의 NO 생성에 대한 영향

NO(nitric oxide) 생성에 대한 YGT의 효과를 알아보기 위해 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 YGT를 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 NO 생성을 크게 억제하였다. 특히, YGT 1 mg/mL의 농도에서 NO 생성이 유의하게 억제되었다(Fig. 5).

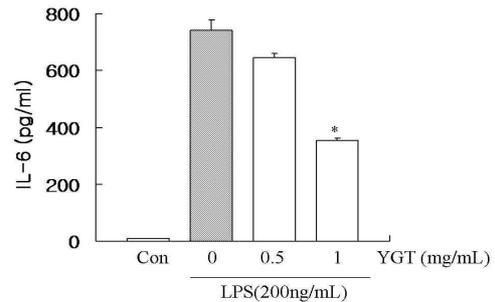


**Fig. 5. Effect of YGT on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of YGT for 1 h before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for nitrite production. Control (con) cells were incubated with vehicle alone. Data are mean  $\pm$  SEM values of duplicate determinations from three separate experiments. \* $P$  < 0.01.

## 6. RAW 264.7 세포에서 YGT의 IL-6 생성에 대한 영향

YGT의 대식세포에서 전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 염증

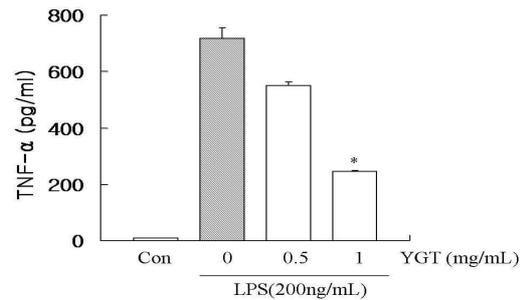
성 사이토카인 IL-6의 생성을 ELISA를 이용하여 실험하였다. 그 결과, LPS 자극원을 처리하였을 때 IL-6 생성이 현저히 증가하였고, YGT를 0.5, 1 mg/mL의 농도를 처리하였을 때 IL-6 생성 억제 효과가 나타났다(Fig. 6).



**Fig. 6. Effect of YGT on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of YGT for 1 h before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for nitrite production. Control (Con) cells were incubated with vehicle alone. Data are mean  $\pm$  SEM values of duplicate determinations from three separate experiments. \* $P$  < 0.01.

7. RAW 264.7 세포에서 YGT의 TNF- $\alpha$  생성에 대한 영향

설치류 대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ 의 생성에 대해 YGT의 억제효과를 ELISA를 이용하여 실험하였다. 그 결과, YGT가 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성을 농도 의존적으로 억제한다는 것을 보여준다(Fig. 7).



**Fig. 7. Effect of YGT on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of YGT for 1 h before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for nitrite oxide production. Control (con) cells were incubated with vehicle alone. Data are mean  $\pm$  SEM values of duplicate determinations from three separate experiments. \* $P$  < 0.01.

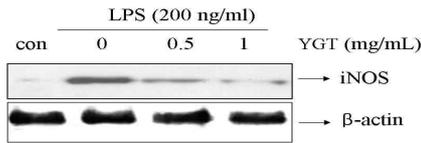
## 8. RAW 264.7 세포에서 YGT의 iNOS protein발현에 대한 억제 효과

YGT의 iNOS의 protein 발현을 알아보기 위해 Western blot 을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 형성되는 iNOS protein 발현은 YGT 1 mg/mL에서 현저한 억제 양상을 보였다(Fig. 8).

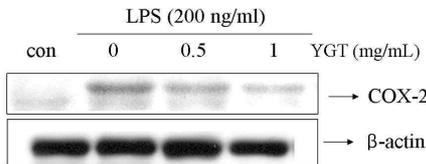
## 9. RAW 264.7 세포에서 YGT의 COX-2 protein발현에 대한 억제

효과

YGT의 COX-2 protein 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 Western blot을 수행하였다. 그 결과, LPS 자극에 의해 활성화된 COX-2 protein 발현이 YGT 0.5, 1 mg/mL에서 농도 의존적으로 억제되는 양상을 보였다(Fig. 9).



**Fig. 8. Effect of YGT on LPS-induced iNOS protein expression in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of YGT for 1 h before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Equal amounts of protein (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with iNOS antibodies. Equal loading of protein was verified by β-actin.



**Fig. 9. Effect of YGT on LPS-induced COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of YGT for 1 h before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Equal amounts of protein (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with COX-2 antibodies. Equal loading of protein was verified by β-actin.

## 고찰

連芩止痢湯은 李兆華 편저의 《傳染病證治從新》에 나오는 처방으로, 黃連, 黃芩, 白頭翁, 馬齒莧, 槐花, 厚朴, 防己, 五味자로 구성되어 있으며<sup>1)</sup>, 燥濕解毒, 殺蟲止痢하는 효능이 있어<sup>3)</sup>, 濕熱蘊腸證을 主治하며, 세균성이질과 과민성 결장염, 급성장염 등의 치료에 사용되고 있어<sup>3)</sup>, 염증의 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

염증(inflammation)은 여러 가지 형태의 감염(infection)이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 내 방어기전의 발현이라 할 수 있고, 다양한 화학적 매개체가 염증의 발현 기전에 관여하고 있으며, 그 병인도 매우 복잡하다<sup>13)</sup>. 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 炎症을 유발한다. 그러나 지속적인 炎症반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암이 유발되기도 한다<sup>14)</sup>.

이에 본 연구에서는 염증질환에서의 연금지리탕의 효능을 밝히기 위해 炎症반응의 주체가 되는 비만세포주인 HMC-1 세포와 대식세포 계열인 RAW264.7 세포에서 각 자극원에 의해 유도된 염증 매개체들(즉, NO, pro-inflammatory cytokine, COX-2

등)의 발현을 억제하는지 살펴보았다.

인체비만세포(human mast cells)는 결합조직, 피부, 혈관주위에 위치하여 외부환경과 숙주 사이에서 중요한 면역역할을 한다. 비만세포는 과립내에 존재하는 histamine, vasoactive amines, specific proteolytic enzymes, cytokines, chemokines, arachidonic acid metabolites 등 다양한 물질들을 세포의 분비를 통해 친식, 아토피 피부염과 알레르기성 비염과 같은 알레르기성 염증반응을 유도하고 또한 박테리아나 기생충 감염에 있어 숙주 방어과정에 기여한다<sup>15-17)</sup>. 또한 대식세포는 백혈구로서 인체 내의 불필요한 세포들을 제거하고 다양한 cytokine 등의 면역매개 물질을 생성하여 외부로부터 침입한 항원을 공격, 제거하는 등의 작용을 함으로써 선천성 면역반응과 염증반응에 있어서 중요한 역할을 담당한다<sup>18-20)</sup>.

본 연구에서 연금지리탕 물추출물(YGT)의 세포독성여부를 확인하기 위하여 인간비만세포(HMC-1 cell)를 이용하여 MTT 분석을 한 결과 0.1, 0.5, 1.0 mg/mL 농도에서 모두 세포독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

Cytokines이란 면역담당세포를 위시하는 여러 가지 세포에서 생산되는 생리활성 물질을 총칭하는 것으로<sup>21)</sup>, 특이적인 세포 수용체에 결합하여 면역세포의 활성화와 성장을 조절하고 정상 혹은 병적인 염증반응과 면역반응을 매개한다<sup>22)</sup>. 비만세포를 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 calcium ionophore A23187로 활성화시켰을 때, IL-8, IL-6, TNF-α와 같은 염증성 cytokines의 생산이 증가하며<sup>23-26)</sup>, 대식세포를 그람음성균의 세포벽에 존재하는 구성물질의 일종인 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화시킬 경우 역시 염증성 cytokine의 분비를 증가시켜 감염이나 염증을 유발하기도 한다<sup>27)</sup>.

YGT가 A23187과 PMA로 유도된 HMC-1 세포에서 염증성 cytokines의 일종인 IL-6, IL-8과 TNF-α 발현을 억제하는지를 실험하였다. 그 결과 이러한 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8, TNF-α)의 발현이 YGT에 의해 억제되었다. 또한, YGT로 전처리 후 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서는 IL-6와 TNF-α 발현이 현저하게 줄어들었으며, 용량 의존적으로 억제되는 양상을 보였다.

Nitric oxide(NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 조절하는 것으로 알려져 있으며, NO는 여러 세포에서 nitric oxide synthase(NOS) 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성된다<sup>28,29)</sup>. NO를 생산하는 NOS는 세포내에 존재하며, calcium 또는 calmodulin에 의존적인 형태인 constitutive NOS(cNOS)와 비 의존적인 inducible NOS(iNOS)로 구분할 수 있다. 이 중, iNOS는 대식세포나 혈관내피세포가 활성화되었을 경우에 발현되며 또한 LPS 등 세균의 내독소와 여러 가지 cytokine에 의해 유도되기도 한다. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고 炎症상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 炎症반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 炎症매개체의 생합성을 촉진하여 炎症을 심화시키는 것으로 알려져 있다<sup>30,31)</sup>. 따라서 관절염을 비롯한 각

중 염증의 발생 억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제시키는 것이 중요하다<sup>31)</sup>.

COX는 중요한 생물학상 매개체인 prostaglandins, prostacyclin, thromboxanes 등을 포함하는 prostanoids 형성에 관여하는 효소이다. COX에는 COX-1과 COX-2가 존재하는데 COX-1은 위장관, 신장, 혈소판, 혈관내피세포 등 모든 조직에 항상 내재적 구성성분으로 일정한 양이 존재하여 위장관 보호, 신장의 혈류량 조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는 데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme 또는 constitutive enzyme인 반면, COX-2는 정상적인 상태에서는 발현되지 않다가 염증자극, cytokine, growth factors 등의 자극에 의하여 유도되어 염증조직, 활막세포, macrophage 등에서 발현되는 immediate early enzyme 또는 inducible enzyme으로 염증과 암을 비롯해 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다<sup>32-34)</sup>.

본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 YGT가 NO의 생성과 COX-2, iNOS의 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 YGT는 NO 생성과 COX-2, iNOS의 발현도 농도 의존적으로 억제하였다.

결론적으로 YGT는 세포내의 전염증성 인자들을 현저하게 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과는 이질 등으로 인해 나타나는 염증, 출혈 등의 증상치료에 많이 활용이 되는 연금지리탕이 항염증의 효과를 가진다는 것을 현대 과학적으로 증명하는 것이다.

## 결 론

인간 비만세포주인 HMC-1 세포를 PMA와 A23187로 자극하였을 때와 설치류의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극 하였을 때, 연금지리탕물추출물(YGT)의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

YGT는 PMA와 A23187로 자극한 비만세포에서 전염증성 사이토카인 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  생성을 농도 의존적으로 억제하였다. YGT는 LPS로 유도된 대식세포에서 NO생성을 농도 의존적으로 억제하였다. YGT는 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하였다. YGT는 LPS로 유도된 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 현저하게 억제하였다.

이와 같은 결과로 보아 연금지리탕 물추출물(YGT)은 비만세포에 작용하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8의 생성을 억제하였고, 대식세포에 작용하여 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6의 생성과 iNOS, COX-2 발현을 억제함으로써 비만세포와 대식세포를 매개로한 염증반응에 항염증 효과가 있음을 알 수 있다.

## 참고문헌

1. 李兆華 編著. 傳染病證治從新, 河北人民出版社, 1981.
2. 신민교. 임상본초학, 서울, 영림사, pp 280-282, 387, 400-404, 417-418, 487, 488, 598-600, 658-660, 1997.
3. 王崇國 主編. 臨床辨病傳方治療從書, 傳染病, 辨病傳方治療,

人民衛生出版社, p 246, 2000.

4. Higuchi, M., Hisgahi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-argininedependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J Immunol 144: 1425-1431, 1990.
5. Kim, K.M., Yu, K.W., Kang, D.H., Koh, J.H., Hong, B.S., Suh, H.J. Anti-stress and anti-fatigue effects of fermented rice bran. Biosci Biotechnol Biochem 65(10):2294-2296, 2001.
6. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science Dec; 18. 258(5090):1898-1902, 1992.
7. Ehrlich, P. Beitrage zur kenntnis der Anilinfarbung und ihrer Verwendung in drmikroskopischen Technik. Arch Mikrosk Anast 13: 263-277, 1877.
8. Kim, J.A., Kim, D.K., Kang, O.H., Choi, Y.A., Park, H.J., Choi, S.C., Kim, T.H., Yun, K.J., Nah, Y.H., Lee, Y.M. Inhibitory effect of luteolin on TNF-alpha-induced IL-8 production in human colon epithelial cells. Int Immunopharmacol 5(1):209-217, 2005.
9. Mahida, Y.R., Ceska, M., Effenberger, F., Kurlak, L., Lindley, I., Hawkey, C.J. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. Clin Sci (Lond) Mar; 82(3):273-275, 1992.
10. Izzo, R.S., Witkon, K., Chen, A.I., Hadjiyane, C., Weinstein, M.I., Pellecchia, C. Neutrophil-activating peptide (interleukin-8) in colonic mucosa from patients with Crohn's disease. Scand J Gastroenterol 28(4):296-300, 1993.
11. Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Watanabe, K., Tateishi, H., Nishiyama, T., Saiki, T., Ikeda, H., Tsuruta, O., Tanikawa, K. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. Clin Exp Immunol 96(3):432-436, 1994.
12. Janeway, C.A. Immunobiology. 5th ed., London, Churchill-Livingstone, pp 3-80, 2001.
13. Tizard, I.R. Immunology, An introduction inflammation. 2nd ed., Saunders College Publishing, New York, NY, USA. pp 423-441, 1986.
14. Willoughby, D.A. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. Ann Rheum Dis 34: 471-478, 1975.
15. Gordon, J.R., Burd, P.R., Galli, S.J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines, Immunol Today 11: 458-464, 1990.
16. Mekori, Y.A., Metcalfe, D.D. Mast cells in innate immunity, Immunol Rev 173: 131-140, 2000.
17. Williams, C.M., Galli, S.J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. J

- Allergy Clin Immunol 105: 847-859, 2000.
18. Newman, S.L. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. Trends Microbiol 7(2):67-71, 1999.
  19. Morrison, D.C., Ryan, J.L. Endotoxins and disease mechanisms. Annu Rev Med 38: 417-732, 1987.
  20. Tracey, K.J., et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. Nature 330: 662-664, 1987.
  21. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일, 서울, 의학문화사, p 717, 718, 721, 754, 2003.
  22. 대한내과학회. HARRISON'S 내과학(2). 서울, MIP, p 1861, 2004.
  23. Toivari, M., Maki, T., Suutarla, S., Eklund, K.K. Ethanol inhibits IgE-induced degranulation and cytokine production in cultured mouse and human mast cells. Life Sci 67: 2795-2806, 2000.
  24. Na, H.J., Moon, P.D., Ko, S.G., Lee, H.J., Jung, H.A., Hong, S.H., Seo, Y., Oh, J.M., Lee, B.H., Choi, B.W., Kim, H.M. Sargassum hemiphyllum inhibits atopic allergic reaction via the regulation of inflammatory mediators. J Pharmacol Sci 97: 219-226, 2005.
  25. Lee, D.H., Kim, S.H., Eun, J.S., Shin, T.Y. Mosla dianthera inhibits mast cell-mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production. Toxicol Appl Pharmacol 216: 479-484, 2006.
  26. Meyer, G.K., Neetz, A., Brandes, G., Tsikas, D., Butterfield, J.H., Just, I., Gerhard, R. Clostridium difficile toxins A and B directly stimulate human mast cells. Infect Immun 75: 3868-3876, 2007.
  27. Lindemann, R.A., Economou, J.S., Rothmel, H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral blood monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharide. J Dent Res 67(8):1131-1135, 1988.
  28. Förstermann, U., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M., Murad, F. Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. Biochem Pharmacol 42(10):1849-1857, 1991.
  29. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases; structure, function and inhibition. Biochem J 357(Pt.3):593-615, 2001.
  30. Tezuka, Y., Irikawa, S., Kaneko, T., Banskota, A.H., Nagaoka, T., Xiong, Q., Hase, K., Kadota, S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of Zanthoxylum bugeanum. J Ethnopharmacol 77: 209-217, 2001.
  31. Kim, R.G., Shin, K.M., Chun, S.K., Ji, S.Y., Seo, S.H., Park, H.J., Choi, J.W., Lee, K.T. In vitro antiinflammatory activity of the essential oil from Ligularia fischeri var. spiciformis in murine macrophage RAW 264.7 cells. Yakhak Hoeji 46: 343-347, 2002.
  32. 서은성. 가미청상방풍탕의 항염증효과에 대한 실험적 연구, 원광대학교 대학원, 2005.
  33. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지 42: 214-219, 1998.
  34. 서영준. 발암과정에서 cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암 예방. 분자세포생물학뉴스 13: 8-17, 2001.