

제마성향정기산과 열다한소탕의 항염증 효능 비교 연구

심은형[#], 유수성, 이호영^{*}

한국한의학연구원 한의기반연구부

Anti-inflammatory Effects of Jema-sunghyangjungkisan and Yeoldahanso-tang

Eun Hyoung Shim[#], Sooseong You, Hoyoung Lee^{*}

KM Fundamental Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine 483 Expo-ro,
Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Jema-sunghyangjungkisan (JSGS, Jima Xingxiang Zhengqi san) and yeoldahanso-tang (YDHST, Reduo hanshao decoction) are traditional herbal formulas which commonly used to prevent and treat stroke in traditional Korean medicine. However, JSGS and YDHST extracts have not been previously reported to have anti-inflammatory effects. Therefore, We measured the anti-inflammatory effects of JSGS and YDHST extracts on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells.

Methods : To investigate the anti-inflammatory activities of JSGS and YDHST extracts, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) were examined in RAW 264.7 cells with LPS of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Results : JSGS and YDHST extracts did not have any cytotoxicity in RAW 264.7 cells. TNF- α concentration decreased 49.67% at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by JSGS but, YDHST has no statistically significant effect at all concentration. IL-6 accumulation on JSGS and YDHST extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 cells reduced 22.03% and 41.44% at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. In addition, JSGS has no inhibitory effects on NO accumulation and YDHST reduced 10.08% at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Moreover, JSGS and YDHST treatment does-dependently reduced the PGE₂ production. In particular, YDHST (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) extract was more effective compared with 10 ng/ml of indomethacin which is the PGE₂ positive control.

Conclusions : Our results suggest that treatment of JSGS and YDHST extracts decreased the LPS-stimulated inflammation. Therefore, in the present study, we demonstrated that JSGS and YDHS may be used as a potential anti-inflammatory therapeutic agent.

Key words : Jema-sunghyangjungkisan (Jima Xingxiang Zhengqi san), Yeoldahanso-tang (Reduo hanshao decoction), Lipopolysaccharide (LPS), RAW 264.7, Anti-inflammatory

I. 서 론

제마성향정기산 (濟馬星香正氣散, Jema-sunghyangjungkisan, Jima Xingxiang Zhengqi san)은 성향정기산 (星香正氣散, Sunghyangjungkisan, Xingxiang

Zhengqi san)에 창출(蒼朮), 청피(靑皮), 육계(肉桂), 건강(乾薑), 익지인(益智仁)을 가미한 처방으로 중풍 초기 구급처방에 사용되며¹⁾ 혈관 이완효과²⁾, 대뇌피질 뇌경색 경계부위 감소효과³⁾에 대한 연구보고가 있고, 열다한소탕(熱多寒小湯, Yeoldahanso-tang, Reduo hanshao decoction)은 태음인의

*Corresponding author : Hoyoung Lee, KM Fundamental Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Expo-Ro, Yuseong-Gu, 305-811, Daejeon, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-868-9514 · Fax : +82-42-868-9299 · E-mail : lhoyoung@kiom.re.kr

#First author : Eun Hyoung Shim, KM Fundamental Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Expo-Ro, Yuseong-Gu, 305-811, Daejeon, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-868-9689 · Fax : +82-42-868-9299 · E-mail : tladmsgud@kiom.re.kr

· Received : 25 April 2017 · Revised : 28 June 2017 · Accepted : 15 July 2017

중풍 및 성인병 예방과 치료에 사용되는 처방으로 당뇨병 중풍⁴⁾, 혈관 염증⁵⁾, 간 보호 효과⁶⁾, 알리시성 접촉피부염에서의 효과⁷⁾, 아토피 피부염 환자에 대한 임상연구⁸⁾가 보고되어 있다. 제마성향정기산과 열다한소탕은 공통적으로 뇌혈관질환 (중풍, stroke)의 예방 및 치료에 사용되는 처방으로, 뇌혈관질환은 뇌로 가는 혈류의 흐름이 원활하지 않아 뇌 조직이 손상되는 경우를 말한다.

뇌혈관질환은 단일질환으로 국내 사망률 1, 2위를 차지하고 신체장애, 언어장애 등의 후유증과 합병증을 동반하기 때문에 꾸준한 예방과 관리가 필요하며^{9,10)} 최근 들어, 뇌혈관질환과 고지혈증^{11,12)}, 대사증후군^{13,14)} 등과의 상관관계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

염증반응은 생체의 세포 및 조직이 물리적, 화학적 원인 등에 의해 손상되거나 외부에서 침입한 감염원에 의한 손상으로부터 생체를 보호하기 위한 방어기작이다.^{15,16)} 염증반응이 진행되면 선천성 면역 (innate immunity)이나 획득성 면역 (adaptive immunity) 등을 매개로 하여 생체 내 대식세포가 활성화 되고 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 생성되는 nitric oxide (NO) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 생성되는 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 염증매개인자와 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 및 interleukin (IL)-1 β 와 같은 염증성 사이토카인 (cytokines)을 분비한다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 외부 자극에 의해 염증반응이 일어나면 생체 내 염증관련인자들이 과잉생성 되고, 발적, 발열, 동통 등의 임상증상을 동반하게 되며 세균성패혈증, 류마티스성 관절염, 죽상동맥경화증, 자가면역질환과 같은 다양한 질환을 야기한다.²⁰⁻²²⁾

현재까지 두 처방에 대한 임상연구 및 질환별 연구가 선행되었으나 각 처방에 대한 항염증 관련 연구는 상대적으로 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 습담 치료에 공통적으로 사용되는 제마성향정기산과 열다한소탕에 대해 마우스 대식

세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 TNF- α , IL-6, NO 및 PGE₂ 등 염증성 사이토카인 및 염증매개인자의 생성량을 확인함으로써 각 처방에 대한 항염증 효과에 대해 비교 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Dulbeco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P&S), Dulbeco's phosphate-buffered saline (DPBS), trypsin-DTA는 Gibco BRL (NY, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS), NG-methyl-L-arginine (L-MMA), indomethacin은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하였으며, 실험에 사용한 Cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)에서, Griess reagent는 Promega Corporation (Madison, WI, USA)에서, PGE₂ ELISA kit는 Amersham (UK)에서, TNF- α 및 IL-6 ELISA kit은 Invitrogen Co.(Camarillo, CA, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 추출물의 제조

실험에 사용된 약재는 음니허브 (Daegu, Korea)에서 구입하여 전문가 감별 후 사용하였다 (Table 1). 각 처방에 따라 약재를 배합한 후 약재 무게의 10배에 해당하는 증류수를 첨가하여 100℃ 에서 2시간 동안 무압환류추출법 (COSMOS-60, Kyungseo Machine CO. Incheon, Korea)을 통하여 추출하였고, 추출액은 sieve를 사용하여 필터링 한 후, 동결건조 (PVTFD-100, ilShin BioBase, Daegu, Korea)하여 -70℃ 에서 보관하였다.

Table 1. Composition of Jema-sunhyangjungkisan and Yeoldahanso-tang.

Prescription	Herbs	Original region	Company	Amount (g)	Yield (%)
Jema-sunhyangjungkisan	Agastachis Herba	Korea	Omnierb	6.00	22.49
	Perillae Herba	Korea	Omnierb	6.00	
	Arisaematis Rhizoma	China	Omnierb	6.00	
	Aucklandiae Radix	China	Omnierb	4.00	
	Atractylodis Rhizoma	China	Omnierb	4.00	
	Atractylodis Rhizoma Alba	China	Omnierb	4.00	
	Fraxini Cortex	Korea	Omnierb	4.00	
	Pinelliae Rhizoma	China	Omnierb	2.00	
	Citri Unshius Pericarpium Immaturus	China	Omnierb	2.00	
	Arecae Pericarpium	China	Omnierb	2.00	
	Cinnamomi Cortex	Vietmam	Omnierb	2.00	
	Zingiberis Rhizoma	Korea	Omnierb	2.00	
	Alpiniae Oxyphyllae Fructus	China	Omnierb	2.00	
	Glycyrrhizae Radix	China	Omnierb	2.00	
	Zingiberis Rhizoma Recens	Korea	Omnierb	2.00	
Zizyphi Fructus	Korea	Omnierb	4.00		

Prescription	Herbs	Original region	Company	Amount (g)	Yield (%)
Yeoldahanso-tang	Puerariae Radix	China	Omniberb	16.00	
	Scutellariae Radix	China	Omniberb	16.00	
	Angelicae Tenuissimae Radix	China	Omniberb	8.00	
	Raphani Semen	China	Omniberb	8.00	20.00
	Platycodi Radix	Korea	Omniberb	8.00	
	Cimicifugae Rhizoma	China	Omniberb	8.00	
	Angelicae Dahuricae Radix	China	Omniberb	4.00	

3. 세포배양

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고 5.5% FBS와 1% P&S가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

4. 세포독성

각 처방의 세포독성을 측정하기 위하여 CCK-8 kit를 이용하였다. RAW 264.7세포를 3 × 10³ cells/well의 밀도로 96 well plate에 분주한 후 세포가 confluent한 상태가 되었을 때 각각의 처방을 농도별 (0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 or 1,000 µg/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 세포에 CCK-8 용액을 첨가하여 37°C, 5% (v/v) CO₂ 조건에서 4시간 동안 배양한 후, microplate reader (Benchmark Plus, BIO-RAD, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통하여 상대적 세포생존율 (% of control)을 계산하였다. 본 실험은 세포독성이 나타나지 않는 최고 농도를 기준으로 진행하였다.

5. 각 처방에 따른 TNF-α, IL-6, NO 및 PGE₂ 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 2.5 × 10⁵ cells/well의 밀도로 48 well plate에 분주한 후 세포가 confluent한 상태가 되었을 때 LPS (1 µg/ml)와 함께 처방을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하고 배양 상층액 내에 분비되는 염증성 사이토카인 ; TNF-α 및 IL-6과 염증매개인자 ; NO 및 PGE₂의 분비량을 측정하였다. TNF-α 및 IL-6 생성량 측정은 ELISA kit를 사용하여 제조사의 수행방법에 따라 측정하였으며 NO 생성량을 측정하기 위하여 Griess reagent를 이용하였으며 nitric oxide synthase inhibitor인 L-NMMA를 양성대조군으로 사용하였다. 상층액 내 존재하는 PGE₂ 생성량을 측정하기 위해서 PGE₂ ELISA kit를 사용하였으며 양성대조군으로 indomethacin을 사용하였다.

6. 통계처리

각 실험결과는 SYSTAT ver. 13.0 (SPSS Inc. USA)을 이용하여 분석하였으며, 평균 (mean) ± 평균오차 (SEM)로 표기하였다. 각 실험결과의 유의성 검증은 일원배치분산분석으로 비교한 후, Bonferroni multiple comparison method을 이용하여 p<0.05의 유의수준에서 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 처방별 독성평가

각 처방에 대한 세포독성을 확인하기 위하여 CCK-8 assay를 진행하였다. RAW 264.7 세포에 각 처방을 농도별 (0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000 µg/ml)로 처리한 결과, 실험에 사용한 최고농도 (1000 µg/ml)까지 세포독성이 없음을 확인하였다 (Fig. 1). 이상의 결과를 바탕으로 세포독성이 나타나지 않는 62.5, 125, 250 및 500 µg/ml의 농도로 실험조건을 설정하여 각 처방에 대한 효능을 확인하였다.

2. 처방이 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응을 유도하고 각 처방을 농도별로 처리하여 처방이 TNF-α 및 IL-6의 생성량에 미치는 영향을 확인하였다. 실험결과, TNF-α는 정상군 (1.93±0.37 ng/ml)과 비교하여 LPS를 처리한 유도군에서 약 6.5배 (12.59±1.19 ng/ml) 증가하였다. 제마성향정기산은 500 µg/ml에서 49.67% (7.29±1.42 ng/ml)가 감소하고 (p<0.05), 다른 농도에서는 통계적 유의성이 없었으며 열다한소탕은 모든 농도에서 통계적으로 유의한 결과를 확인할 수 없었다 (Fig. 2A).

IL-6 생성량은 정상군 (0.28±0.28 ng/ml)과 비교하여 LPS 유도군에서 약 150배 (41.51±0.42 ng/ml) 증가하는 것을 확인하였다. 제마성향정기산은 500 µg/ml에서 22.03% (32.43±3.80 ng/ml)가 감소하고 (p<0.05), 다른 농도에서는 통계적 유의성이 없었으며, 열다한소탕은 500 µg/ml에서 41.44% (24.43±1.39 ng/ml)가 감소하고 (p<0.01), 모든 농도에서 통계적 유의성이 있었다 (Fig. 2B).

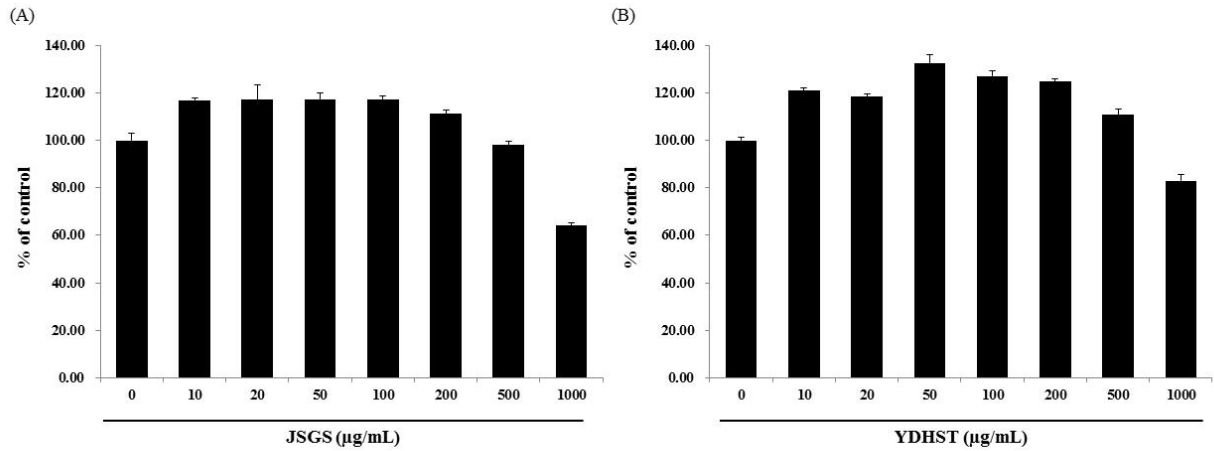


Fig. 1. Cytotoxic effects of Jema-sunhyangjungkisan (JSGS) and Yeoldahanso-tang (YDHST) in RAW 264.7 cells. Cells were treated with JSGS and YDHST from 0 µg/mL to 1000 µg/mL for 24h. Cell viability was measured by CCK-8 kit by measuring the absorbance at 450 nm. The data are mean values of three experiments mean ± SEM.

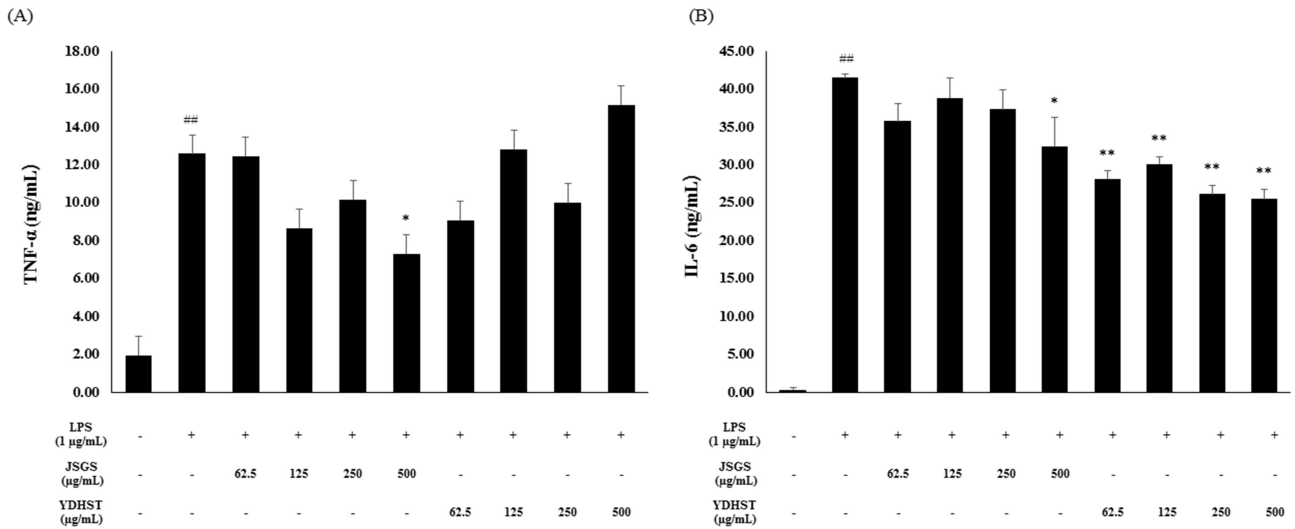


Fig. 2. Effects of Jema-sunhyangjungkisan (JSGS) and Yeoldahanso-tang (YDHST) extracts on LPS-stimulated inflammatory cytokines. The TNF-α (A) and IL-6 (B) concentrations in supernatant were evaluated by using ELISA. The data are mean values of three experiments mean ± SEM; ^{##}<0.05 compared with control (no LPS-stimulated), ^{*}P <0.05; ^{**}P <0.01 compared with the LPS.

3. 처방이 NO 생성에 미치는 영향

마우스 대식세포 RAW 264.7에 LPS를 첨가하여 염증반응을 유도하였다. 양성대조군으로 사용한 L-NMMA는 25, 50, 100 및 200 µM의 농도로 처리하고 제마성향정기산과 열다한소탕을 농도별로 처리한 후 NO 생성량을 측정하였다. 실험결과, 정상군 (0.00±0.14 µM)과 비교하여 LPS를 처리한 유도군의 NO 생성량이 약 80배 (80.17±0.67 µM)가 증가함을 확인하였다. 양성대조군인 L-NMMA는 200 µM에서 약 74% (21.04±0.78 µM)로 NO 생성량을 억제하였다. 그러나, 제마성향정기산은 모든 농도에서 통계적 유의성이 나타나지 않았으며, 열다한소탕은 500 µg/ml에서 NO 생성량이 10.08% (71.19±1.80 µM)가 감소하고 (p<0.05), 다른 농도에서는 통계적 유의성이 없음을 확인하였다 (Fig. 3).

4. 처방이 PGE₂ 생성에 미치는 영향

LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포에 제마성향정기산과 열다한소탕을 농도별로 처리하고 양성대조군으로 indomethacin을 1.25, 2.5, 5 및 10 ng/ml의 농도로 처리하여 배양한 후 상층액을 이용하여 PGE₂ 생성량을 확인하였다. 실험결과, 정상군 (0.20±0.02 ng/ml)과 비교하여 LPS를 처리한 유도군은 PGE₂ 생성량이 약 55배 (10.91±0.71 ng/ml) 증가함을 확인하였다. 양성대조군인 indomethacin은 10 ng/ml에서 PGE₂ 생성량을 약 83% (2.04±0.34 ng/ml) 억제하였고 실험에 사용한 모든 농도에서 PGE₂ 생성량을 농도의존적으로 감소하였다 (p<0.01). 제마성향정기산은 500 µg/ml에서 40.85% (6.54±0.28 ng/ml), 열다한소탕은 500 µg/ml에서 99.51% (0.25±0.04 ng/ml)로 PGE₂ 생성을 억제하였으며 (p<0.01), 두 처방의 IC₅₀는 제마성향정기산은 686.46 µg/ml, 열다한소탕은 110 µg/ml로 열다한소탕이 제마성향정기산보다 PGE₂ 억제 효과가 우수함을 확인하였다. 특히, 열다한소탕은 500 µg/ml 농도에서 양성대조군으로 사용한 indomethacin (10 ng/ml)보다 PGE₂ 생성 억제효과가 우수했다 (Fig. 4).

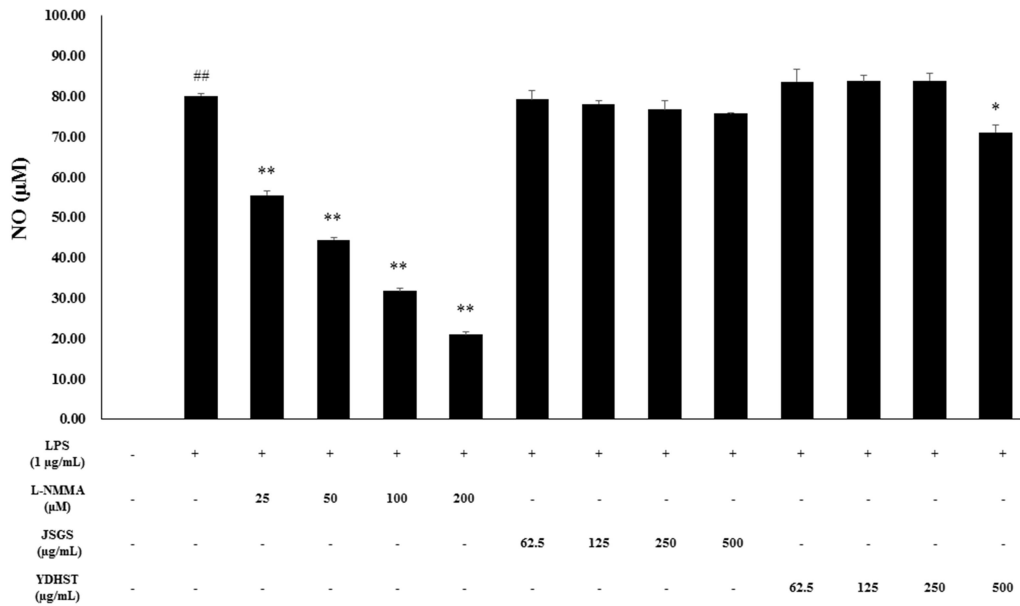


Fig. 3. Effects of Jema-sunhyangjungkisan (JSGS) and Yeoldahanso-tang (YDHST) extracts on LPS-stimulated NO in RAW 264.7 cells. The data are mean values of three experiments mean ± SEM ; ##(0.05 compared with control (no LPS-stimulated), *P <0.05 ; **P <0.01 compared with the LPS.

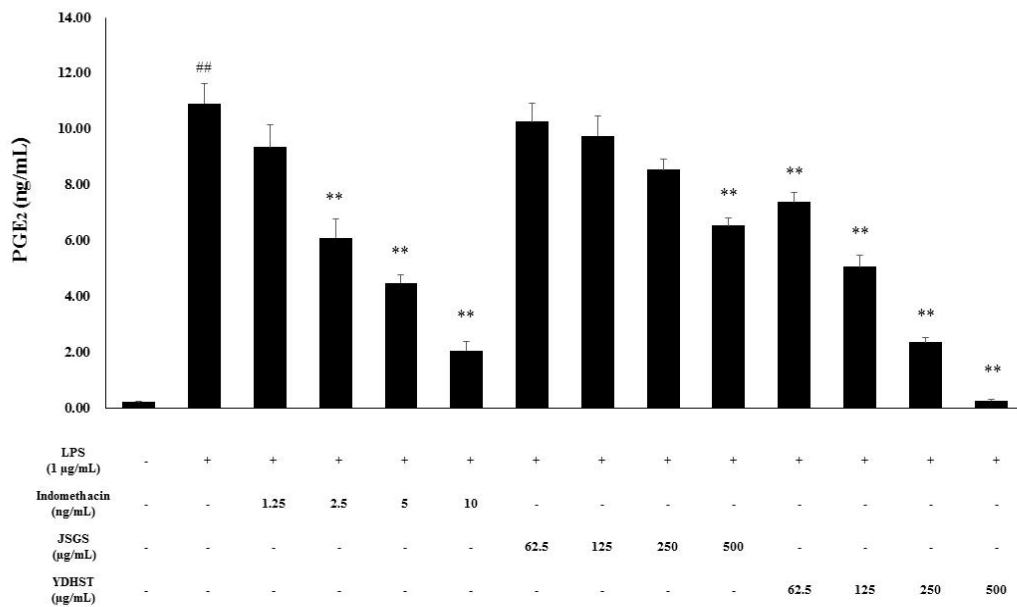


Fig. 3. Effects of Jema-sunhyangjungkisan (JSGS) and Yeoldahanso-tang (YDHST) extracts on LPS-stimulated NO in RAW 264.7 cells. The data are mean values of three experiments mean ± SEM ; ##(0.05 compared with control (no LPS-stimulated), *P <0.05 ; **P <0.01 compared with the LPS.

IV. 고찰

사상체질이란 1894년 이제마가 저술한 동의수세보원(東醫壽世保元)에서 언급한 한국의 체질의학으로 사람이 본래 가지고 태어난 체형기상, 용모사기, 성질재간, 항심 등을 기준으로 태양인, 태음인, 소양인, 소음인으로 구분하여 장부생리(臟腑生理) 및 병증약리(病證藥理)를 규명하고자 하는 이론이다²³⁾. 제마성향정기산은 사상체질 중 소음인의 중풍 초기 구급처방으로 사용되며, 열다한소탕은 태음인의 중풍전조증에 사용되는 처방이다. 소음인과 태음인의 체형, 용모 및 성질재간 등이

다르고 각각의 체질별로 치료법도 다르지만 뇌혈관질환은 체질에 관계없이 발병하며, 임상에서의 뇌혈관질환 치료 및 예방은 체질 및 변증 등 여러 관점에서 종합적으로 판단하여 치료하며 두 처방은 공통적으로 한의학 변증 중 습담 환자의 뇌혈관질환 치료 및 예방에 사용되고 있다²⁴⁾.

동맥경화, 고지혈증 및 비만 등을 포함한 대사성질환은 혈관성 염증을 동반하며 한의학적으로는 체액순환의 장애 및 혈액의 정체 등을 동반하는 습담 및 어혈 변증으로 구분된다^{25,26)}.

습담은 다양한 원인에 의해 정상적인 체액의 순환에 장애가 발생하여 체액의 흐름이 원활하지 못하고 이로 인해 병리적

산물이 생성되어 각 부위의 기혈소통을 방해하는 것을 말한다. 현대 사회에서는 지나친 음주, 과식, 운동부족 등의 원인으로 이상지질혈증, 동맥경화, 비만 등 대사성질환이 증가하는 추세이며 이러한 질환이 한의학 변증 중 습담에서 높게 나타난다는 연구보고가 있다^{13,27}. 또한, 습담은 서양의학적으로 대사성질환과 연관성이 높고, 혈관 및 조직의 염증반응을 야기한다고 알려져 있다²⁸. 본 연구에서는 변증 습담 처방인 제마성향정기산과 열다한소탕에 대한 항염증 효과를 확인하기 위하여 마우스 대식세포주인 RAW 264.7를 LPS로 유도하여 염증반응을 유발시킨 *in vitro* 모델에서 염증매개인자들의 억제효과에 각 처방이 미치는 영향을 비교하고자 하였다.

염증반응이 일어나면 염증인자들이 활성화 되고 이로 인하여 발적, 발열, 홍반, 부종 등의 임상증상이 나타난다. 이러한 염증반응은 생체 방어를 위해 필수적이지만 생체 내 염증반응이 과도하게 되면 정상조직의 파괴, 종양, 암, 대사성질환 등 다양한 질환의 원인이 된다^{29,30}. 대식세포는 면역반응과 염증반응에 중요한 역할을 하는 세포로서 NO, PG, leukotriene 및 염증성 사이토카인 등을 생산하고 분비하며 이러한 물질들은 선천성 면역과 후천성 면역을 조절하는 역할을 한다³¹.

초기 염증반응으로 인하여 대식세포가 활성화 되면 생체 내 염증성 사이토카인이 과잉 생성되고 세균성패혈증, 류마티스성관절염, 염증, 자가면역질환과 같은 다양한 염증성 질환을 야기한다^{32,33}. 대식세포는 외부자극에 의해 염증반응이 활성화 되면 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인을 생성한다. 특히, Th1 세포에서 생성되는 TNF- α 는 대식세포, 림프구, 호중구, 혈관 내피세포 등에서 합성되며 LPS에 의해 활성화 된 대식세포는 TNF- α 를 분비하고, 다량으로 분비된 TNF- α 는 대식세포와 호중구를 활성화 시켜 산화제, 단백질 분해효소, IL-1 및 IL-6 등을 분비한다. IL-6는 Th2 세포에서 생성되어 B 세포를 활성화 시키며, 패혈증 환자에서 염증반응으로 인하여 생체 내 IL-6 생성량이 많아지면 장기손상 및 부전 등을 유발한다는 보고가 있다^{34,35}. 본 연구에서 각 처방이 염증성 사이토카인의 분비 억제에 미치는 효과를 확인한 결과, TNF- α 생성량은 제마성향정기산의 경우 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 49.67% 감소하는 것을 확인하였으며 ($p < 0.05$), 나머지 농도에서는 통계적 유의성이 없었다. 열다한소탕은 일부 농도에서 TNF- α 감소효과가 나타났으나 통계적으로 유의한 결과는 나타나지 않았다. 두 처방의 IL-6 억제효과는 제마성향정기산은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 22.03% 감소하고 ($p < 0.05$), 다른 농도에서는 통계적 유의성이 없었으며 열다한소탕은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 41.44% 감소하고 ($p < 0.01$), 모든 농도에서 통계적으로 유의하게 IL-6 생성량이 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 두 처방의 IL-6 억제효과는 열다한소탕이 우수한 것으로 나타났다.

선천성 면역에 중요한 역할을 하는 대식세포는 염증반응이 일어나면 외부자극에 의해 NO와 PGE₂같은 염증촉진인자들을 생성함으로써 염증반응을 유발한다. 대식세포를 자극하는 대표적 성분인 LPS는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현이 증가시켜 대식세포에서 종양, 박테리아 파괴, 부종 등 염증반응에 관여하는 NO를 생성한다. NO는 체내방어, 신호전달 및 혈관확장 등의 기능을 담당하며 염증성 사이토카인에 의해 생성되고 염증매개 인자의 생합성을 촉진하여 염증을 유

도할 뿐만 아니라 superoxide와 결합하여 peroxynitrite의 형태로 전환되면 조직괴사를 야기한다³⁶⁻³⁸. 또한, LPS의 자극은 염증성 사이토카인 및 COX의 활성을 증가시켜 세포막의 phospholipid에서 arachidonic acid를 분비한다. 세포 내 분비된 arachidonic acid는 염증전달 반응 역할을 하는 PG로 변환되고 혈소판 응집에 관여하는 thromboxane을 생성한다. 특히, 염증반응에서 즉각적으로 발현이 증가하는 COX-2에 의한 PGE₂ 생성은 면역세포의 활성을 유도하고 염증반응을 촉진시키는 TNF- α 및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인을 생성하여 종양생성 및 염증반응을 유도한다³⁹⁻⁴¹. 본 연구에서 각 처방에 대한 NO 및 PGE₂ 분비억제 효과를 확인한 결과, NO 억제효과는 제마성향정기산은 모든 농도에서 통계적 유의성이 나타나지 않았고, 열다한소탕은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 NO 생성량을 10.08% 감소 시켰다. 각 처방에 대한 PGE₂ 분비억제 효과를 확인한 결과, 두 처방 모두 농도의존적으로 PGE₂ 억제에 효과가 있는 것으로 나타났으며 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 제마성향정기산 (40.85%), 열다한소탕 (99.51%)로 PGE₂ 생성 억제에 효과가 있었다. 두 처방의 PGE₂ 생성량 억제에 대한 활성을 비교 하였을 때 제마성향정기산과 비교하여 열다한소탕이 PGE₂ 억제 효과가 우수하고 특히, 열다한소탕은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 양성대조군인 indomethacin (10ng/mL) 보다 PGE₂ 억제 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 이러한 결과는 습담 처방으로 사용되는 제마성향정기산과 열다한소탕이 COX-2 발현 및 활성수준을 조절함으로써 PGE₂ 생성을 억제하는 것으로 예상된다.

V. 결 론

마우스 대식세포주인 RAW 264.7를 이용하여 습담 처방으로 사용되는 제마성향정기산과 열다한소탕에 대한 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제마성향정기산 및 열다한소탕은 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 세포독성이 나타나지 않았다.
2. 제마성향정기산은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 49.67% 만큼 TNF- α 를 억제하였고 열다한소탕은 모든 농도에서 통계적 유의성이 나타나지 않았다.
3. 각 처방에 대한 IL-6 생성량은 제마성향정기산은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 22.03%, 열다한소탕은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 41.44% 만큼 감소하는 것을 확인하였다.
4. 두 처방이 NO 생성량에 미치는 영향을 확인한 결과, 제마성향정기산은 실험에 사용한 모든 농도에서 통계적 유의성을 확인할 수 없었으며, 열다한소탕은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 10.08% 억제효과가 있는 것을 확인하였다.
5. 두 처방의 PGE₂ 생성 억제효과는 제마성향정기산과 비교하여 열다한소탕이 우수하며 특히, 열다한소탕은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 양성대조군인 indomethacin (10 ng/mL) 보다 PGE₂ 억제효과가 뛰어났다.

이상의 결과를 종합하여 두 처방이 염증성 사이토카인, NO 및 PGE₂ 생성억제에 일부 효과가 있음을 확인하였고, 제마성향정기산과 비교하여 열다한소탕이 항염증 효과가 우수한 것으로 나타났다. 이는 기존에 사용되는 습담치료 뿐만 아니라 염증성 질환 치료제로써의 응용연구를 제고할 수 있으며 추후, 각 처방에 대한 항염증 효과의 작용기전에 대한 연구 및 유효성분에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원(K17040) 연구비 지원으로 진행된 결과입니다.

References

1. Koo BH. Cardiovascular and neurologic disease. Seoul : Seowondang. 1985 : 305-11
2. Kim YG, Kweon JN, Kim JH. Effect of Sunghyangchungisan on Contractile Reactivity and Ca²⁺ Metabolism in Isolated Rabbit Carotid Artery. Korean J Orient Int Med. 2000 ; 21(3) : 377-88.
3. Kim HS, Kim YS. Neuroprotective Effect of Sunghyangjungki-San on Focal Cerebral Ischemia Induced by MCAO in Rats. Korean J Physiology & Pathology 2005 ; 20(3) : 596-02.
4. Kim YJ, Kim BO, Kim HJ, Kwack JJ, Jeon SY, Hong S. A clinical report of CVA with diabetib foot. Korean J Orient Int Med. 2003 ; 24(3) : 727-34.
5. Kim OS, Kim YJ, Shin HK. Anti-atherosclerotic Effects of Herbal Formulas for Sasang Constitutional Medicine. J Sasang Constit Med. 2012 ; 24(4) : 51-61.
6. Bae HS, Kim YS, Cho KH, Lee KS, Kim JJ, Lee HU, Kim DH. Hepatoprotective Activity of Reduohanxiaotang (Yuldahanso-tang) is Related to the Inhibition of β -Glucuronidase. Am J Chi Med. 2003 ; 31(1) : 111-7.
7. Kim MS, Park SS. Effects of yuldahansotang on rat skin occurred the allergic contact dermatitis. J of Sasang Const Med. 2002 ; 14(3) : 97-113.
8. Jung HS, Lee JY. A study on the alteration of general characteristics and therapeutic effect of GamiYeoldahansotang (加味熱多寒少湯) in patients with Atopic Dermatitis. 2001 ; 15(2) : 177-88.
9. Kim JH, Kang KW, Yu BC, Choi SM, Baek HK, Lim SM, Seol IC, Kim YS. A Case-Control Study on Blood Lipids as a Risk Factor of Stroke. Korean J Orient Int Med. 2007 ; 28(4) : 830-7.
10. Yoon YY, Song JH. Korean Death Report in 2014. Seoul : Statistics Korea. 2015.
11. Kim MJ, Kang BG, An JJ, Jo HK, Yoo HR, Kim YS,

- Seol IC. Case-Control Study on Relationship of Dampness-phlegm to Blood Lipid Level in Stroke Patients. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2009 ; 23(6) : 1470-9.
12. Park JK, Choi HJ, Kim DH. A study on the Effect of Kamijesubungitang on Hyperlipidemia. J Daejeon Orien Med. 2006 ; 15(1) : 19-31.
13. Min IK, Kim CH, Hwang JW, Park JY, Lee SY, Choi WW, Na BJ, Park SW, Jung WS, Moon SK, Park JM, Ko CN, Cho KH, Kim YS, Bae HS. The relation of Dampness-Phlegm and Metabolic Syndrome in Acute Stroke Patients. J Korean Oriental Med. 2009 ; 30(1) : 109-19.
14. Woo JM. The Relationship between Epicardial Fat Thickness and Dampness - Phlegm Pattern in the Patients with ischemic stroke. Kyung Hee Univ. 2017.
15. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors : intracellular regulators of infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol. 2007 ; 7(1) : 31-40.
16. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. Curr Opin Crit Care. 2006 ; 12(6) : 595-01.
17. Allen L-AH, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. Curr opin immunol. 1996 ; 8(1) : 36-40.
18. Nathan CF. Secretory products of macrophages. J Clin Invest. 1987 ; 79(2) : 319-26.
19. Salvemini D, Korb R, Anggård E, Vane J. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990 ; 87(7) : 2593-7.
20. Nava E, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide in endotoxic shock : effects of NG-monomethyl-L-arginine. J Cardiovasc Pharmacol. 1992 ; 20 (Suppl 12) : S132-4.
21. Hilliquin P, Borderie D, Hernvann A, Menkès CJ, Ekindjian OG. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1997 ; 40(8) : 1512-7.
22. López-Bojórquez LN, Dehesa AJ Reyes-Terán G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. Med Res Arch. 2004 ; 35(6) : 465-79.
23. Lee JM. Longevity & life preservation in oriental medicine. Seoul ; Kyung Hee University Press : 1997
24. Choi IY, Kim YH, Choi DJ, Han CH, Lee WC, Jun CY, Cho KH, Choi SM. Relationship between Warning Signs and Sasang Constitution(SC) in Early Stroke Patients. Korean J Orient Int Med. 2007 ; 28(4) : 773-40.
25. Wang Y, Li C, Chang H, Lu LH, Qiu Q, Ouyang YL, Yu JD, Guo SZ, Han J, Wang W. Metabolomic profiling reveals distinct patterns of tricarboxylic

- acid disorders in blood stasis syndrome associated with coronary heart disease. *Chin J Integr Med*, 2016 ; 22(8) : 597-04.
26. Kang JS, Kim DH, Shin HS, Jo CH, Lee JH, Kang BG, An JJ, Jo HK, Yoo HR, Seol IC, Kim YS. The Study on Relationship of Dampness-Phlegm Tongue Diagnosis to hyperlipidemia in Stroke Patients. *The journal of the Korea institute of oriental medical diagnostics*, 2009 ; 13(2) : 24-33.
 27. Kang BG, Go HY, Kang KY, Park SW, Kim JC, Go MM, Kim BY, Seol IC, Lee I, Jo HK, Choi SM. Study of The Diagnostic Indicators of Dampness-Phlegm Pattern Identification In Stroke Patients. *Korean journal of oriental medicine*. 2007 ; 13(2) : 53-8.
 28. Wang J, Wang Q, Li L, Li Y, Zhang H, Zheng L, Yang L, Zheng Y, Yang Y, Peng G, Zhang Y, Han Y. Phlegm-dampness constitution : genomics, susceptibility, adjustment and treatment with traditional Chinese medicine. *Am J Chin Med*, 2013 ; 41(2) : 253-62.
 29. Male D. Cell migration and inflammation. *Immunol*, 1993 ; 5 : 61-9.
 30. Chao CY, Yeh SL, Lin MT, Chen WJ. Effects of parenteral infusion with fish-oil or safflower-oil emulsion on hepatic lipids, plasma amino acids, and inflammatory mediators in septic rats. *Nutr*. 2000 ; 16(4) : 284-8.
 31. Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A, Van Dyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun*. 2004 ; 72(4) : 2312-20.
 32. Van Snick J. Interleukin-6 : an overview. *Annu Rev Immunol*. 1990 ; 8 : 253-78.
 33. Yoon HJ, Moon ME, Park HS, Im SY, Lee JH, Kim YH. Effects of Chitosamoligosaccharide on the C.albicans-induced inflammatory effect in mice and RAW 264,7 macrophage cells. *J Chitin Chitosan*, 2007 ; 12(1) : 15-20.
 34. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008 ; 63(8) : 879-84.
 35. Oh CH. Translation, simple immunology. 3rd rev. ed, seoul : Medical korea, 2006 : 161-200
 36. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 ; 43(2) : 109-42.
 37. McCann SM, Mastronardi C, de Laurentiis A, Rettori V. The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 ; 1057 : 64-84.
 38. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, 1991 ; 266(7) : 4244-50.
 39. Murakami, A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells : chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer*. 2007 ; 121(11) : 2357-63.
 40. Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*, 2005 ; 56 (Suppl 5) : 57-73.
 41. Gravaghi C, La Perle KM, Ogrodowski P, Kang JX, Quimby F, Lipkin M, Lamprecht SA. Cox-2 expression, PGE₂ and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice. *J Nutr Biochem*, 2011 ; 22(4) : 360-5.