

LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 염증반응에서 淸肺瀉肝湯의 항염증 효과

김태연 · 임강현*

세명대학교 한의과대학

Effect of *Cheongpyesagan-tang* on LPS Induced Inflammation in RAW 264.7 Cells

Tae Yeon Kim, Kang Hyun Leem*

College of Korean Medicine, Semyung University

Cheongpyesagan-tang (CP) is one of the traditional medicinal prescription to treat Taeumin (太陰人)'s disease. It has been commonly used for the treatment of stroke, arthritis, diabetes and obesity. In this study, we investigated an anti-inflammatory potential of CP water extract. We examined the effects of CP on the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂). We also examined the levels of protein or mRNA of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and proinflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. CP inhibited NO and PGE₂ production in a dose dependent manner and decreased the protein and mRNA expression of iNOS and COX-2. Also, CP decreased the mRNA expression of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α). These results suggest that CP has potential as anti-inflammatory therapeutic medicine.

keywords : *Cheongpyesagan-tang*(CP), Anti-inflammatory, NO, PGE₂, Proinflammatory cytokines

서론

염증(inflammation)은 인체에서 일어나는 면역 반응(immune response)의 주요 부분 중 하나로, 바이러스나 박테리아에 대항하여 인체를 보호하거나 손상된 조직을 회복하는 등 상해 후에 나타나는 인체 자가 치유 기전이다. 그러나 과도한 염증반응은 조직손상을 초래하고 만성 질환을 일으키므로 인체에 부정적인 이면도 함께 가지고 있다. 특히 만성염증은 암, 치매, 심혈관계 질환, 관절염, 우울증 등 비전염성 노인질환의 90% 이상과 관련되어 있는 것으로 밝혀지면서 염증관리에 대한 중요성은 더욱 증가되고 있다¹⁾.

따라서 최근의 많은 연구자들은 다양한 만성·퇴행성 질환을 해결할 수 있는 가능성을 염증매개물질의 조절을 통한 염증반응의 제어에 두고 활발한 연구를 진행하고 있는 실정으로, Pub med 검색상 2011년 염증 연관 주요 질환의 연구 건수는 1980년과 비교하여 암 3.3배, 뇌졸중 6.5배, 대사성 질환 9.5배, 퇴행성 뇌질환 14.1배나 증가한 것으로 나타났다²⁾.

염증은 일반적으로 발적(redness), 부종(swelling), 열감(warmth)

을 초래하며 때때로 통증(pain), 부동상태(immobility)를 동반하기도 한다³⁾. 이는 한의학에서 病因으로 언급하는 六淫 중 발열·병세의 극렬함 등과 연관된 熱邪와, 염증반응·부종·만성질환과 연관된 濕邪의 작용으로 발생하는 일련의 증상들과 유사성을 띠고 있으며⁴⁾, 기존 연구들에서도 發散風熱, 淸熱燥濕, 淸熱解毒의 효능을 지닌 본초나 방제들 중 항염증의 효능을 가지고 있는 것들이 몇몇 밝혀져 있다⁵⁾. 그러나 임상에서 우수한 치료 효과를 내고 있으며 항염증의 효과가 있을 것으로 사료되는 다수 방제들의 효능에 대한 기초 연구는 아직도 미진한 실정이다.

淸肺瀉肝湯(*Cheongpyesagan-tang*, CP)은 『東醫壽世保元』의 太陰人 肝受熱裏熱病論에 기재된 熱多寒少湯에 大黃 一錢을 가한 처방이다. 淸肺瀉肝湯은 太陰人 燥熱病에 大便秘結이 있는 症을 치료하는 방제로써 中風으로 인한 中腑二便閉, 燥, 火, 六鬱, 水積, 白淫, 癩癩, 尿血, 痰塊, 產後 胞衣不下로 인한 腹痛 등에 사용되는 것으로 문헌에 기재되어 있다⁶⁾. 현대에 들어 淸肺瀉肝湯은 급성기 증상에 사용되는 처방 중 하나이며⁷⁻⁹⁾, 간 손상에 미치는 효과¹⁰⁾, 대장암 성장억제¹¹⁾, 혈소판응집 억제¹²⁾, 세포손상에 대한 보호

* Corresponding author

Kang Hyun Leem, College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

·E-mail : violet805@hanmail.net ·Tel : +82-43-649-1339

·Received : 2019/01/03 ·Revised : 2019/02/11 ·Accepted : 2019/02/20

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.02.33.1.31>Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

효과¹³), 면역반응과 항 알레르기 효과¹⁴), 관절염 개선 효과¹⁵) 및 대사성질환인 당뇨¹⁶)와 비만¹⁷⁻¹⁹)에 대한 개선 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 다양한 염증성 인자들의 단백질 또는 mRNA 발현에 대한 CP의 항염증 효과를 확인한 in vitro 연구는 아직까지 보고되지 않았다.

따라서 본 저자는 염증을 나타내는 여러 질환에 있어 CP의 적용 가능성을 확인하기 위한 기초 연구로써, CP를 전처리한 RAW 264.7 cell을 이용하여 lipopolysaccharide (LPS) 자극 후 염증 매개 인자인 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성과 전구염증매개 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 단백질 및 유전자 발현 변화, 펩티드성 염증 인자인 cytokines의 유전자 발현 변화에 미치는 영향에 대해 관찰하였고, 유의한 결과를 얻었기에 본 논문을 통해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료의 추출

세명대학교 부속한방병원에서 구입한 CP 1첩(52 g)을 증류수로 세척한 뒤, 1 L의 증류수를 넣고 3시간 동안 가열하여 유효성분을 추출하였다. 추출된 용액은 원심분리를 통해 침전물을 제거한 뒤, 회전증발농축기(BUCHI, Switzerland)로 300 mL가 되도록 감압농축하고 -70°C 저온냉장고에서 동결시켰다. 이를 다시 동결건조기(Ilshinbiobase, South Korea)를 이용하여 9일 간 동결건조시킨 후 17.9 g의 분말을 얻었다. 시료는 -20°C에 보관하였다가 실험 직전 생리식염수나 배지에 희석하여 syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of Cheongpyesagan-tang

| Herbal name | Pharmacognostic name | Weight(g) |
|--------------|------------------------------------|-----------|
| 葛根 | <i>Puerariae Radix</i> | 16 |
| 黃芩 | <i>Scutellariae Radix</i> | 8 |
| 藜蘆 | <i>Angelicae Tenuissimae Radix</i> | 8 |
| 蘿藦子 | <i>Raphani Semen</i> | 4 |
| 桔梗 | <i>Platycodi Radix</i> | 4 |
| 升麻 | <i>Cimicifugae Rhizoma</i> | 4 |
| 白芷 | <i>Angelicae Dahuricae Radix</i> | 4 |
| 大黃 | <i>Rhei Rhizoma</i> | 4 |
| Total amount | | 52 |

2) 시약

본 실험에 사용된 LPS, Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터, fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin-streptomycin, Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)는 Welgene (Gyeongsan, South Korea)으로부터, Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)으로부터, Nitric Oxide Detection kit는 Intron Biotechnology (Sungnam, South Korea)로부터, PGE₂ assay kit는 R&D systems

(Minneapolis, MN, USA)으로부터, iNOS, COX-2, β -actin, Goat Anti-Rabbit HRP-conjugated secondary antibody는 Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)로부터, EZ-Western Detection kit는 Dogen (Seoul, Korea)으로부터, protein extraction buffer인 Proprep은 Intron Biotechnology (Seoul, Korea)로부터, Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Mini-PROTEAN TGX™ precast gels, Trans-Blot Turbo Transfer Pack (PVDF)은 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)로부터, RNeasy protect mini kit, QuantiTect Reverse Transcription kit, QuantiTect SYBR Green PCR kit는 Quagen (Hilden, Germany)으로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) Cell culture

한국세포주은행(Seoul, South Korea)에서 분양받은 RAW 264.7 cell은 10% heat-inactivated FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양되었다. 배지 교환은 2일마다 이루어졌으며, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 주기적으로 계대 배양하였다.

2) MTT assay

RAW 264.7 cell을 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에 섞은 후, 96 well plate (SPL, Pocheon, South Korea)에 5×10^4 cells/mL의 세포수가 되도록 100 μ 씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 overnight 시킨 뒤에, CP를 0, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 5 mg/mL의 MTT를 각 well에 20 μ 넣고 잘 혼합한 뒤 4 시간 동안 37°C의 배양기에서 넣은 다음 상층액을 제거하고, DMSO를 200 μ 씩 넣어 well에 생성된 formazan이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 준 후, Synergy 2 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도 측정을 하였다. 총 3회의 측정을 시행한 후, 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

3) NO assay

RAW 264.7 cell을 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM에 현탁시킨 후, 6 well plate (SPL, Pocheon, South Korea)에 5×10^5 cells/mL의 세포수가 되도록 2 mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양한 후 새로운 DMEM 배지로 교환하고 CP를 0, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 전처리하여 1시간 배양한 후, LPS (10 ng/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 각각의 상등액 100 μ 를 새로운 96 well plate에 넣은 후 Nitric Oxide Detection kit의 N1 buffer를 50 μ 넣고 10분, 다시 N2 buffer를 50 μ 넣고 10분 동안 배양한 뒤에 Synergy 2 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Nitrite standard를 사용하여 표준용량곡선을 작성하고 질소산화물(nitrite, NO₂-)의 생성을 산출하였다. 총 3회의 측정을 시행한 후, 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

4) PGE₂ assay

RAW 264.7 cell을 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM에 현탁시킨 후, 6 well plate (SPL, Pocheon, South Korea)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 2 ml씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양한 후 새로운 DMEM 배지로 교환하고 CP를 0, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 전처리하여 1시간 배양한 후, LPS (10 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 상층액을 수거하고 PGE₂ assay kit (R&D systems, USA)를 이용하여 지시에 따라 처리한 후 Synergy 2 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, PGE₂ standard를 사용하여 표준용량곡선을 작성하고 PGE₂의 농도를 산출하였다. 총 3회의 측정을 시행한 후, 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

5) Western blot

RAW 264.7 cell을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후, 100 mm cell culture dish (SPL, Pocheon, South Korea)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 10 ml씩 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 후 CP (50, 100 µg/ml)를 세포에 처리하여 1시간 배양하고 LPS (10 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 반응이 종료된 후 배지를 제거하고 cold PBS로 세척한 뒤 protein extraction buffer인 Proprep을 사용하여 protein을 추출하였다. Protein 양은 Protein Assay Dye Reagent Concentrate를 사용하여 정량하였으며, 각각 20 µg의 단백질을 10% Mini-PROTEAN TGX™ precast gel로 분리하고, Trans-Blot Turbo Transfer Pack (PVDF membrane)으로 transfer하였다. 이후 Tris-buffered saline Tween 20 (TBS-T ; 20 mM Tris, pH 7.6, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 용해된 10% skim milk에 membrane을 1시간 동안 실온에서 blocking하고 iNOS, COX-2, β-actin primary antibody (1 : 1000 dilution)로 4°C에서 overnight 반응한 후 TBS-T로 3분간 5회 washing하고, HRP-conjugated secondary antibody (1 : 2000 dilution)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. TBS-T로 3분간 5회 washing한 후 EZ-Western Detection kit로 면역반응성 단백질 밴드를 발색시킨 후, 웨스턴이미지분석시스템인 FUSION-SL2-3500.WL 및 FUSION-CAPT software (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany)를 사용하여 분석하였다.

6) Real time PCR

RAW 264.7 cell을 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM에 현탁시킨 후, 100 mm cell culture dish에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 10 ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM 배지로 교체한 뒤 CP (50, 100 µg/ml)를 세포에 처리하여 1시간 배양하고 LPS (10 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. RNeasy protect mini kit로 추출한 RNA는 QuantiTect Reverse Transcription kit를 사용하여 reverse transcription시켰고, QuantiTect SYBR Green PCR kit를 사용하여 Real time PCR을 시행하였다. Reaction mixture는 cDNA template 2 µl, SYBR Green PCR master mix 10 µl, primer 5 pM에 RNase free water를 넣어 총 20 µl의 양으로 시행하였다. 온도조건은 95°C에서 15분간 전변

성 반응 후, 94°C 15초, 55°C 30초, 72°C 30초의 3단계를 1 cycle로 하여 총 60 cycle 반복하였다.

mRNA 발현 정도는 Rotor Gene Q와 부속 프로그램(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 수치화하였다. iNOS, COX-2, IL-6, IL-1β, TNF-α의 mRNA 정량과 분석을 위하여 housekeeping gene인 β-actin을 internal control로 활용하였다. 각 primer의 염기서열은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. The Primers for RT-PCR Analysis

| Gene | Strand | Oligonucleotide sequences(5' to 3' direction) |
|---------|-----------|---|
| iNOS | Sense | GTGTTCCACCAGGAGATGTTG |
| | Antisense | CTCTGCCCACTGAGTTCGTC |
| COX-2 | Sense | TGCATGTGGCTGTGGATGTCATCAA |
| | Antisense | CACTAAGACAGACCCGTCATCTCCA |
| IL-6 | Sense | GAGTTGTGCAATGGCAATTCTG |
| | Antisense | GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCAT |
| IL-1β | Sense | GAAATGCCACCTTTTGACAGTG |
| | Antisense | CTGGATGCTCTCATCAGGACA |
| TNF-α | Sense | CCCTCACACTCAGATCATCTTCT |
| | Antisense | GCTACGACGTGGGCTACAG |
| β-actin | Sense | AGTGTGACGTTGACATCCGT |
| | Antisense | GCAGCTCAGTAACAGTCCGC |

3. 통계분석

SPSS 17.0 K for Windows 통계 프로그램 패키지를 이용하여 one way-ANOVA를 실시하여 각 실험군 간 통계학적 분석을 하였으며 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 淸肺瀉肝湯의 세포독성

CP가 RAW 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 약물 처리를 하지 않은 대조군의 흡광도 평균을 100으로 정하고 약물 처리군의 흡광도 값을 환산하여 계산한 결과, 0, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml의 농도에서의 상대적 흡광도는 100.0 ± 12.6 , 102.0 ± 12.2 , 101.5 ± 13.5 , 103.4 ± 13.0 , $102.5 \pm 12.7\%$ 로, CP 처치 전 농도에서 대조군과의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

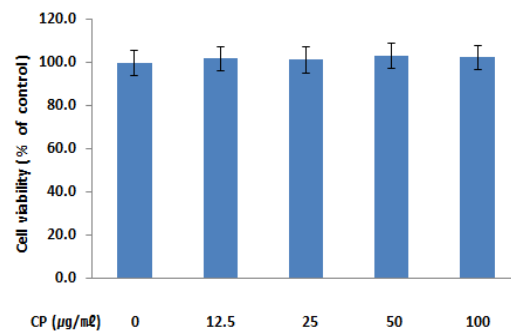
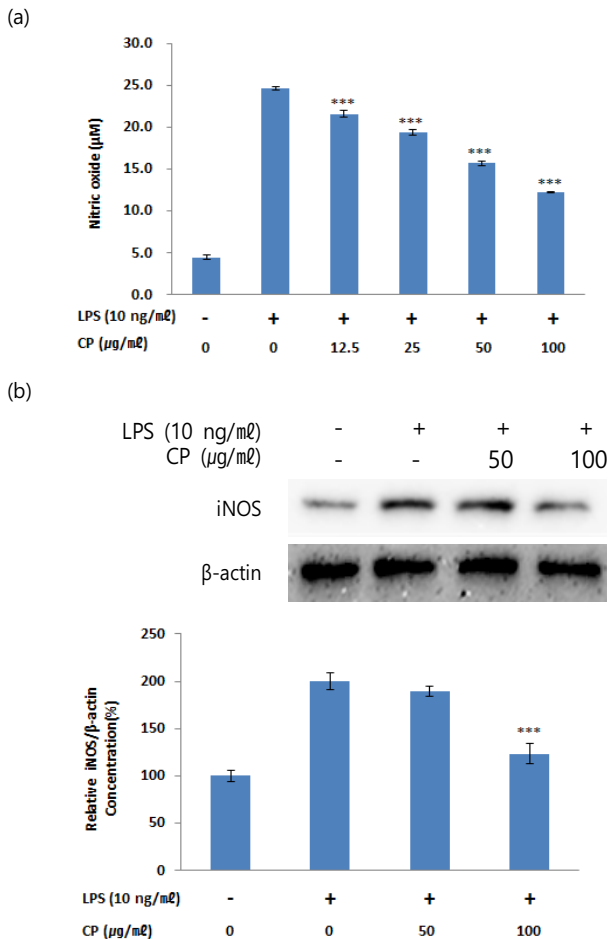


Fig. 1. Effects of CP on the cell viability of RAW 264.7 cells. Cells were treated with 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml of CP extracts for 24 h. The amount of viable cells were determined by MTT assay. There were no significant differences between non-treated groups and CP extracts treated groups.

2. 淸肺瀉肝湯의 NO 생성 및 iNOS 단백질과 mRNA 발현 저해

RAW 264.7 cell의 NO 생성에 미치는 CP의 작용을 확인하기 위하여 NO assay를 시행하였다. 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군의 NO 생성량은 $4.49 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 이었으며, LPS를 단독 처리한 대조군의 경우에는 $24.65 \pm 0.32 \mu\text{M}$ 이었다. LPS 처리 후 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 CP 처리군에서의 NO 생성량은 각각 21.62 ± 0.48 , 19.42 ± 0.50 , 15.71 ± 0.25 , $12.24 \pm 0.30 \mu\text{M}$ 로 모든 CP 처리군에서 대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되었다(Fig. 2a).

또한 CP에 의한 NO의 생성 억제 효과가 iNOS의 발현과 관련성이 있는가를 확인하기 위해 Western blot과 RT-PCR을 시행하여 iNOS의 단백질 및 mRNA 발현을 관찰하였다. LPS를 단독 처리한 대조군의 iNOS 단백질 생성량은 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군에 비하여 $200.2 \pm 19.4\%$ 로 증가하였으며, LPS + CP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS + CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서의 iNOS 단백질 생성량은 각각 189.8 ± 12.2 , $123.3 \pm 24.3\%$ 로 감소하는 양상을 보였다. 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 CP 처리군에서는 대조군과 비교하여 유의성 있는 저해가 관찰되었다(Fig. 2b). iNOS mRNA의 상대적 발현은 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과 LPS를 단독 처리한 대조군의 경우 각각 0.001 ± 0.000 , 1.000 ± 0.164 의 값을 나타내었다. 대조군과 비교하여 LPS + CP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS + CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 각각 0.64 ± 0.13 , 0.53 ± 0.11 로 모두 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2c).



(c)

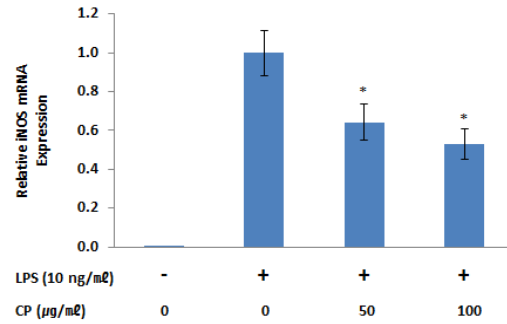


Fig. 2. Effects of CP on LPS-stimulated NO production and iNOS protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were co-treated with CP extracts (12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (10 ng/mL) for 24 h. Levels of NO in culture supernatants was determined by the Griess reaction. (b) Cells were co-treated with CP extracts (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (10 ng/mL) for 24 h. Total iNOS proteins were isolated and analyzed by Western blot. (c) Cells were co-treated with CP extracts (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (10 ng/mL) for 24 h. The mRNA level of iNOS was evaluated by real time PCR. β -actin was used as an internal control for realtime PCR. Data were presented as the means \pm SEM of triplicate experiments (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. the control group).

3. 淸肺瀉肝湯의 PGE₂ 생성 및 COX-2 단백질과 mRNA 발현 저해

RAW 264.7 cell의 PGE₂ 생성에 미치는 CP의 작용을 확인하기 위하여 PGE₂ assay를 시행하였다. 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군의 PGE₂ 생성량은 $2979 \pm 373 \text{ pg}/\text{mL}$ 이었으며, LPS를 단독 처리한 대조군의 경우에는 $4450 \pm 237 \text{ pg}/\text{mL}$ 이었다. LPS 및 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 CP 처리군에서의 PGE₂ 생성량은 각각 3915 ± 451 , 3614 ± 284 , 3378 ± 306 , $3240 \pm 322 \text{ pg}/\text{mL}$ 로 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 CP 처리군에서 대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되었다(Fig. 3a).

또한 prostaglandin 생합성의 전구체인 arachidonic acid로부터 PGE₂를 생성하는데 관여한다고 알려진 COX-2 효소와의 연관성을 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR을 시행하여 COX-2의 단백질과 mRNA 발현을 관찰하였다. LPS를 단독 처리한 대조군의 COX-2 단백질 생성량은 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군에 비하여 $179.5 \pm 20.3\%$ 로 증가하였으며, LPS + CP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS + CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서의 COX-2 단백질 생성량은 각각 165.0 ± 13.0 , $105.7 \pm 13.5\%$ 로 감소하는 양상을 보였다. 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 CP 처리군에서는 유의성 있는 저해를 나타내었다(Fig. 3b). COX-2 mRNA의 상대적 발현은 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과 LPS를 단독 처리한 대조군의 경우 각각 0.001 ± 0.000 , 1.000 ± 0.069 의 값을 나타내었다. 대조군과 비교하여 LPS + CP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS + CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 각각 0.91 ± 0.08 , 0.75 ± 0.10 로 감소되었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 경우 유의성 또한 관찰되었다(Fig. 3c).

4. 淸肺瀉肝湯의 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA 발현 저해

CP가 RAW 264.7 cell에서 LPS로 촉진되는 pro-inflammatory cytokine의 발현을 억제하는지 알아보기 위해서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 mRNA 발현을 관찰하였다. IL-6 mRNA의 상대적 발현값은 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과 LPS

를 단독 처리한 대조군의 경우 각각 0.001 ± 0.000 , 1.000 ± 0.128 을 나타내었다. 대조군과 비교하여 LPS + CP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS + CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 각각 0.78 ± 0.05 , 0.75 ± 0.05 로 감소되었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 경우 유의성 또한 관찰되었다(Fig. 4a).

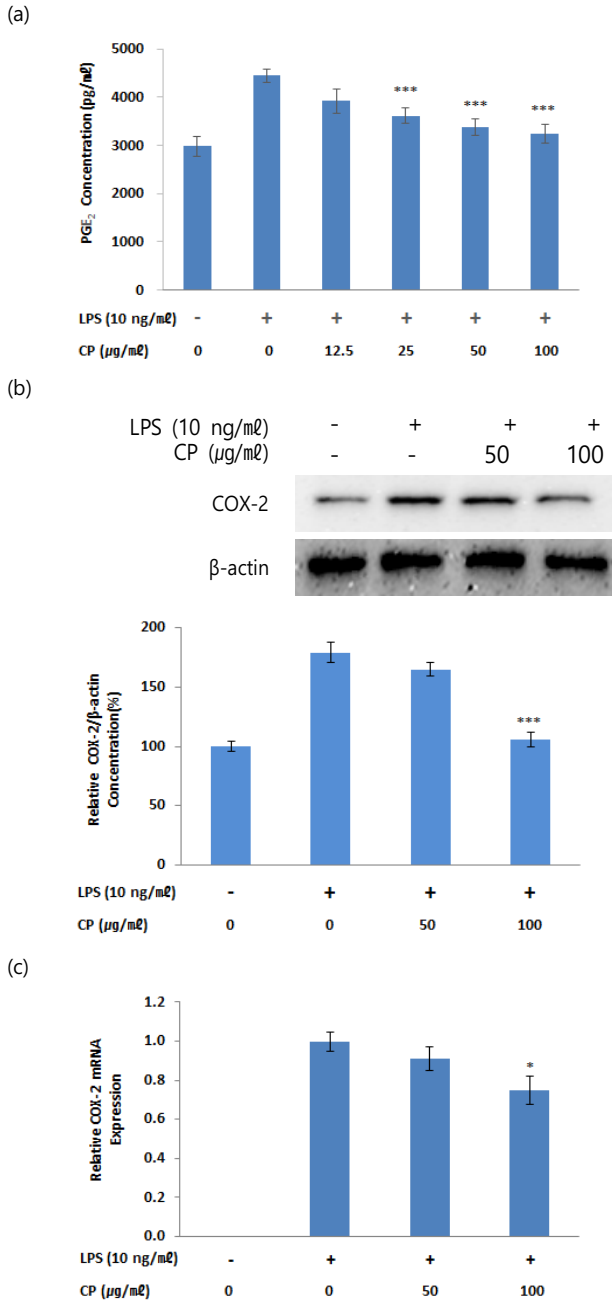


Fig. 3. Effects of CP on LPS-stimulated PGE₂ production and COX-2 protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were co-treated with CP extracts (12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (10 ng/ml) for 24 h. Levels of PGE₂ in culture supernatants were measured by ELISA. (b) Cells were co-treated with CP extracts (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (10 ng/ml) for 24 h. Total COX-2 proteins were isolated and analyzed by Western blot. (c) Cells were co-treated with CP extracts (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (10 ng/ml) for 24 h. The mRNA level of COX-2 was evaluated by real time PCR. β -actin was used as an internal control for realtime PCR. Data were presented as the means \pm SEM of triplicate experiments (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. the control group).

IL-1 β mRNA의 상대적 발현값은 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과 LPS를 단독 처리한 대조군의 경우 각각 0.001 ± 0.000 , 1.000 ± 0.121 을 나타내었다. 대조군과 비교하여 LPS + CP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS + CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 각각 0.87 ± 0.08 , 0.80 ± 0.05 로 감소되었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 경우 유의성 또한 관찰되었다(Fig. 4b). TNF- α mRNA의 상대적 발현값은 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과 LPS를 단독 처리한 대조군의 경우 각각 0.200 ± 0.060 , 1.000 ± 0.085 을 나타내었다. 대조군과 비교하여 LPS + CP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS + CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 각각 0.85 ± 0.07 , 0.75 ± 0.06 으로 감소되었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 경우 유의성 또한 관찰되었다(Fig. 4c).

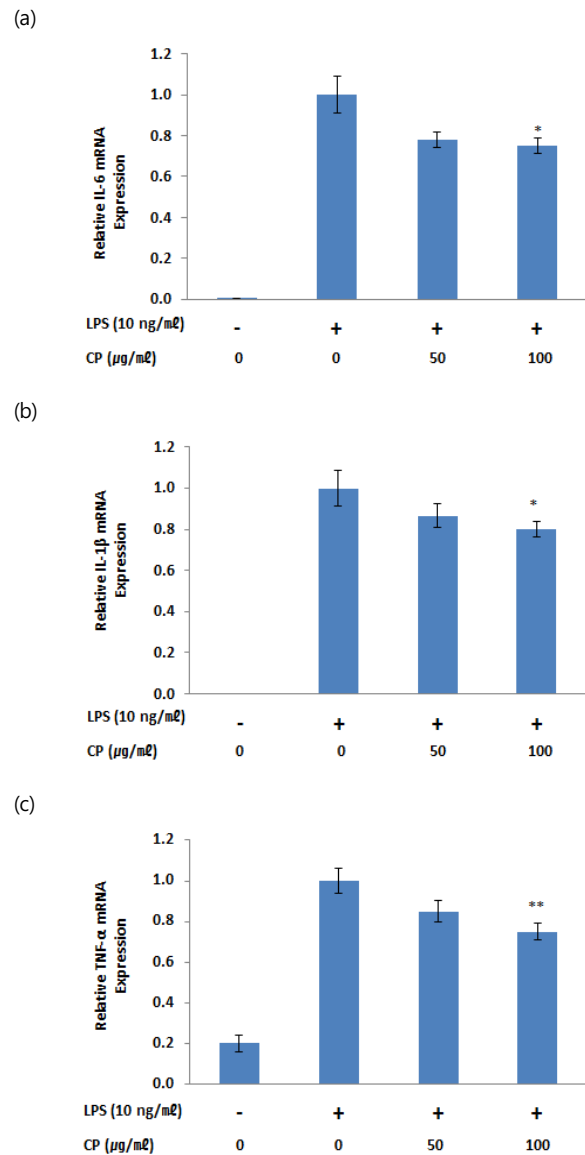


Fig. 4. Effects of CP on LPS-stimulated IL-6, IL-1 β and TNF- α mRNA expression in RAW 264.7 cells. Cells were co-treated with CP extracts (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (10 ng/ml) for 24 h. The mRNA levels of IL-6 (a), IL-1 β (b) and TNF- α (c) were evaluated by real time PCR. β -actin was used as an internal control for realtime PCR. Data were presented as the means \pm SEM of triplicate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the control group).

고찰

淸肺瀉肝湯은 四象醫學 이론을 수립한 東武 李濟馬의 『東醫四象新編』에서 처음 소개되었으며, 『東醫壽世保元』의 太陰人 肝受熱 裏熱病에 사용된 熱多寒少湯에 大黃을 가미한 처방으로⁶⁾, 發散風熱藥에 속하는 葛根.升麻, 淸熱燥濕藥에 속하는 黃芩, 攻下藥에 속하는 大黃, 發散風寒藥에 속하는 白芷.藁本, 淸化熱痰藥에 속하는 桔梗, 消食藥에 속하는 蘿菴子로 구성되어 있다^{5,6)}. 葛根, 升麻, 黃芩, 大黃은 각각 解肌退熱, 淸熱解毒, 瀉實火.除濕熱, 瀉熱逐瘀.涼血解毒의 약성을, 白芷, 藁本, 桔梗, 蘿菴子は 각각 散風除濕.通竅止痛, 除濕止痛, 祛痰排膿, 消食化痰의 약성⁵⁾을 가지므로, 淸肺瀉肝湯은 전체적으로 크게 熱과 濕痰을 제거하는 효능²⁰⁾을 지니고 있다고 판단할 수 있다. 염증반응은 한의학에서 濕熱邪로 초래되는 일련의 증상들과 유사한 속성을 띠므로⁴⁾, 상기 효능을 지닌 본 처방은 항염증 효과를 지니고 있을 것으로 사료되어 본 실험을 수행하였다.

Macrophage는 lipopolysaccharide (LPS) 뿐만 아니라 수많은 병원체 유래 인자들에 의하여 활성화되며, 외래 인자의 탐식을 위하여 NO, prostanoid 등의 지방대사체, IL-6, IL-1 β , TNF- α 등의 전염증성 cytokine 및 chemokine 등과 같은 염증매개인자를 분비함으로써, 외래 인자 제거를 위한 내재면역계의 효능세포로서 중대한 역할을 수행 한다¹⁾. RAW 264.7 cell은 murine macrophage cell line으로 항염증 효과를 지닌 약물들의 효능을 검증하고, 전구염증매개인자들의 유도를 초래하는 신호전달경로에 대해 억제하는 효능을 가진 약물을 평가하기 위한 항염증실험의 기본모델로 보편적으로 이용되고 있다²¹⁾. 먼저 RAW 264.7 cell의 생존 및 증식에 해가 되지 않는 CP의 농도를 조사한 결과, CP 처리군은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 전 농도에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

Nitric oxide synthases (NOS) 효소군은 inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS)와 같은 3가지의 형태로 존재하며 인체의 생리학적 합성과 조절에 있어 중대한 역할을 수행한다²²⁾. 그 중 inducible NOS (iNOS)는 염증조절을 일으키는 전구염증매개 효소로서, 염증성질환 환자의 대식세포에서 대량의 NO를 생성하여 세균의 침입을 막거나, T cell proliferation을 억제함으로써 국소부위의 염증반응을 저하시키는 방어기전에 있어 주요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다²³⁾. 그러나 과도한 iNOS의 발현은 NO 생성량을 과하게 증가시켜 자체적인 독성 효과로 인한 주변 세포 손상을 초래한다²⁴⁾. 본 연구에서 NO 생성에 대한 CP의 효능을 확인한 결과, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 전 농도에서 유의성 있는 저하 효과를 확인할 수 있었으며, 또한 CP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 iNOS 단백질 생성과 CP 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 iNOS mRNA 발현도 대조군에 비해 유의성 있게 억제됨을 확인할 수 있었다.

iNOS와 함께 주요 전구염증매개 효소 중 하나인 cyclooxygenase (COX)는 인체 내에 존재하는 arachidonic acid를 대표적 염증매개인자인 prostaglandin으로 전환시킨다. 보통 COX는 COX-1과 COX-2로 인체 내에서 존재하는데, 그 중

COX-2는 정상적 생체 조건 하에서는 거의 발현되지 않으나 LPS, 박테리아 독소, cytokines 등과 같은 염증 자극 인자에 의해 발현되어 다량의 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성함으로써 염증을 유도한다²⁵⁻²⁸⁾. 본 연구를 통하여 PGE₂ 생성에 대한 CP의 효능을 확인한 결과, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의성 있는 PGE₂ 생성 저하 효과를 확인할 수 있었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 CP 처리군의 경우 COX-2의 단백질 생성 및 mRNA 발현 또한 대조군에 비해 유의성 있게 억제됨을 확인할 수 있었다.

염증 신호는 인체 내에서 다양한 신호전달 분자들을 활성화시킨다. LPS는 생체에서 염증을 유발하는 inflammagen으로 염증반응 병원체의 주요 인자이며, 펩티드성 염증인자인 cytokine의 생성을 촉진한다^{22,29)}. LPS 자극시 대식세포는 IL-6, IL-1 β , TNF- α 를 포함한 다양한 proinflammatory cytokine을 분비하여 혈관투과성을 변화시키고 염증세포를 염증부위로 불러들여 염증반응을 가속화시킨다. 이러한 cytokine은 자연면역에서 있어 염증 반응의 조절을 수행하는 매개 조절자로서 역할을 담당하고 있으며, 획득면역에 있어서도 특정항원을 인식하여 염증반응을 촉진시키거나 특수화시키는 등의 역할을 담당함으로써 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 수행 한다³⁰⁻³²⁾. 본 연구에서는 CP의 염증성 질환에 대한 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS를 처리한 후 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현을 유도한 후 CP의 효과를 확인하는 실험을 진행하였다.

IL-6는 선천면역과 후천면역에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 cytokine으로, 간질환의 급성기반응 및 발열반응을 촉진하는 주요 인자이며, 단핵구, 섬유모세포, 피부각질세포, B세포, T세포 등을 포함한 여러 종류의 세포에서 분비된다. IL-6는 LPS, virus, cytokines 등에 의해 상승되며, 감염성 질환을 비롯하여 다양한 종류의 악성종양이나 자가면역질환 등에서도 증가되어 있다³³⁾.

IL-1 β 는 염증반응의 주요 중재자로서, 중추신경계에서 cyclooxygenase-2 유도를 통해 염증성 통증 과민증을 초래하거나 시상하부에서 발열반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이 cytokine은 단핵구나 대식세포에서 주로 분비되며 비만세포를 자극하여 histamine 유리를 통한 혈관투과성을 변화시키고 혈관 내피세포와 백혈구의 부착단백질 발현을 증가시키거나, 다양한 lymphokine을 분비시키고, B 세포와 T 세포를 활성화시키며, 세포 증식과 분화 및 세포 사멸을 포함한 다양한 세포활동에 관여한다³⁴⁾.

TNF- α 는 염증성 cytokine 생성의 주조절자(master regulator)로서 많은 염증성 질환의 cytokine cascade에서 중추적인 역할을 담당하고 있다. 세포 증식, 생존, 분화, 세포사멸, 괴사 등에 관여하며 혈관 투과성을 증가시키고 류마티스성 관절염, 죽상동맥경화증, 크론병, 건선, 패혈증, 당뇨 및 비만 등을 비롯한 여러 가지 질병의 발생과 관련이 있는 것으로 알려져 있다³⁵⁾.

본 연구에서 CP는 농도 의존적으로 LPS에 의한 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA 발현을 억제하는 경향을 나타내었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP 처리군의 경우 통계적으로 유의성을 보였다. 이상의 결과는 CP가 염증매개인자 생성에 관여하는 세포내 공통 신호회로의 조절을 통해 염증 억제 효과를 가질 수 있음을 시사한다.

기존에 발표된 Kim & Park¹⁵⁾의 in vivo 연구에서는 LPS로

유발된 관절염 생쥐에 CP 1첩을 100 mL로 농축한 추출액을 3.3 mL/kg/day로 투여한 후 윤활 관절막의 면역 조직 화학적 염색을 실시하여 COX-2, TNF- α , IL-2 양성반응세포의 양적 변화를 관찰하였는데 이는 동물실험을 통해 최종적으로 발현된 염증 상황에서 CP의 염증 감소 효능을 확인한 연구로, 본 저자는 염증 초기 세포 반응 단계에서 CP가 초래하는 항염증 기전상의 변화에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료되어 전구염증매개인자들의 유도를 초래하는 신호전달경로에 대한 효능 평가 연구의 기본실험모델인 RAW 264.7 cell²¹⁾을 이용하여 in vitro 실험을 진행하였다.

본 연구에서는 CP 1첩의 유효성분을 정량한 뒤 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 다양한 농도로 실험을 진행함으로써 유의성 있는 항염증 효과를 나타내는 CP의 용량을 확인하였고, 항염증 효과를 확증하기 위해 기존 연구에서는 진행되지 않았던 염증매개인자인 NO와 PGE₂의 분비량 변화를 관찰하였다. 또한 PGE₂의 생성에 영향을 미치는 전구염증매개 효소인 COX-2의 단백질 및 mRNA 발현에 대한 재확인 실험에 추가하여 NO 생성을 촉진하는 것으로 알려진 iNOS의 단백질 및 mRNA 발현도 확인하였으며, 기존 연구에서 확인된 cytokine인 TNF- α 뿐만 아니라 IL-6, IL-1 β 의 mRNA 발현 변화까지 살펴보았다. 결과적으로 본 실험에서는 CP가 RAW 264.7 cell에서 LPS 자극으로 유도되는 NO 및 PGE₂ 생성을 억제하고, iNOS와 COX-2의 단백질 및 mRNA 발현 뿐 아니라, IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 mRNA 발현도 억제시킴을 확인할 수 있었다.

이러한 결과들을 통해 CP는 iNOS와 COX-2의 생성과 유전자 발현 저하 및 cytokines의 유전자 발현 저하를 통한 항염증 효과를 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 CP는 각종 염증성 질환을 치료하는 효과적인 한약제제로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

CP가 염증과 관련된 여러 인자들에 미치는 영향을 알아보기 위하여, LPS로 활성화시킨 RAW 264.7 cell을 사용하여 NO 및 PGE₂ 생성량, COX-2와 iNOS의 발현에 미치는 효과 및 주요 cytokines에 미치는 영향에 대해 실험한 결과, 본 저자는 다음과 같은 결론을 얻었다.

CP는 NO 및 PGE₂의 생성을 억제하였다.

CP는 COX-2와 iNOS의 단백질 및 mRNA 발현을 감소시켰다.

CP는 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 mRNA 발현을 감소시켰다.

이러한 결과를 바탕으로 CP는 항염증효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임

References

- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Innate immunity :
- Tenney S. Kuby Immunology. 6th ed. New York:Freeman press;2007. p. 52-73.
- Jou IL. Chronic Inflammatory Disease Research Center. Seoul:Ajou University;2012. 122 p.
- Yun HJ, Hoe SK. Anti-inflammatory Effect of Injinho-tang in RAW 264.7 cells. Kor J Herbol. 2008;23(2):169-78.
- Textbook Compilation Committee of Pathology in Korean Medicine. Pathology in Korean Medicine. 3rd ed. Yongin:Hanuimunhwasa;2017. p. 54-7, 60, 70.
- National College of Korean Medicine Collaborative Textbook Compilation Committee. Herbology. Seoul:Younglim Publishing Inc;2000. p. 127, 131, 518, 534, 540, 583.
- Lee JM. Dongeuisusebowon. Seoul:Henglim Publishing Inc;1986. p. 7-13, 115, 137-8.
- Hwang JH, Jang ES, Yoo JH, Lee SW. Clinical study on the utilization of Yeoldahanso-tang and Cheongpyesagan-tang. Korean Inst Orient Med. 2008;14(2): 101-6.
- Choi DJ, Jung WS, Moon SK, Cho KH, Kim YS, Bae HS. The clinical efficacy of Chungpyesagan-tang on acute stroke. J Korean Orient Med. 2002;23(4):9-14.
- Jeong CG, Kim EY, Shin JW, Sohn YJ, Lee HS, Jung HS, et al. Effect of Chungpaesagan-tang on ischemic damage induced by middle cerebralartery occlusion in diabetic rats. J Korean Orient Med. 2005;26(2):217-30.
- Kim JY, Shin MR, Heo WY, Kim DR, Weon JJ. The effects of Chungpyesagan-tang on the recovery of liver function in rat injured by CCl4. J Sasang Const Med. 2005;17(1):130-41.
- Ahn HM, Han SY, Kim JH, Rho TW, Chong MS, Kim YK. Effects of Cheongpyesagan-tang and YKK012 on in vitro and in vivo colon cancer cell growth with and without CPT-11. Kor J Herbol. 2015;30(1):33-43.
- Park YJ, Kim SJ, Yang GE, Lee MJ, Lee JS, Kang DH, et al. Anti-platelet aggregation effect of Cheongpyesagan-tang in vitro. Korean J Orient Int Med. 2010; 31(4):714-21.
- Hong SG, Joo KB, Jin KY, Mo KS, Wuk CD. Protective effects of Chungpesagan-tang against ischemia/reperfusion induced cell injury. Korea Inst Orient Med. 2000;54(1):111-7.
- Kim DL, Song YB. An experimental study of the effect by Chongshimyonjatang and Chongpyesagantang on immune response and anti-allergic reaction to rats and mice. J KyungHee Orient Med Coll. 1991;14:131-60.
- Kim JH, Park SS. The Effect of Chungpyesagantang on Lipopolysaccharide induced Arthritis in Mice. J Sasang Const Med. 2002;14(3):114-31.
- Koo JS. Effects of Chungpyesagantang on the diabetic

- rats induced by streptozotocin. *J Korean Orient Pediatr.* 1997;11(1):227-48.
17. Song MY, Kim SS, Shin HD. The clinical study about the effect of Chugpaesagan-tang and Taeumjou-tang on Taeumin obesity after fasting therapy. *J Orient Rehab Med.* 1998;8(1):34-56.
 18. Kim EY, Sul YK, Choi JJ, Jeon SH, Kim H, Kim JW. Effect of Cheongpesagan-tang on the change of inhibitory effect against lipase activity and weight loss, plasma and UCP1, 2mRNA expression in db/db mouse. *J Sasang Const Med.* 2007;19(1):171-85.
 19. Bae JH, Lee JS, Chung SH, Kim SS, Shin HD. Effect of Cheongpesagan-tang on the changes of the weight, plasma and UCP mRNA expression in obese SD rats induced high fat feed. *J Orient Rehabil Med.* 2002;12(1):133-56.
 20. Huh SY, Kang HS. Experimental study on the effect of Chungpesagantang in obese rats. *J Orient Rehabil Med.* 1998;8(2):106-18.
 21. Kim BH, Lee YT, Kang KH. Codonopsis Lanceolata Inhibits Inflammation through Regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Physiol Pathol Korean Med.* 2010;24(1):80-4.
 22. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 1992;32:297-311.
 23. Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur J Neurosci.* 2002;16(11):2103-12.
 24. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002;40(2):140-55.
 25. Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene.* 2001;20(29):3921-6.
 26. Marina L, Kamal RM, Andrew F, Gary B, Jeremy S, Andrew RC. Regulation of Cyclooxygenase 2 mRNA Stability by the Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Signaling Cascade. *Mol Cell Biol.* 2000;20(12):4265-74.
 27. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochemical Pharmacology.* 1995;50(10):1535-42.
 28. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, Van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):4-13.
 29. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor- α by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 1998;273(2):974-80.
 30. Lee BJ, Heo H, Oh SC, Lew JH. Comparison study of Korean and Chinese ginsengs on the regulation of Lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Ginseng Res.* 2008;32(3):250-6.
 31. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(5):617-20.
 32. Lazarov S, Balutsov M, lanev E. The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic(endotoxin) shock. *Vutr Boles.* 2000;32(4):33-40.
 33. Berek JS, Chung C, Watson JM, Knox RM, Martinez-Maza O. Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(4):1038-42.
 34. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* 2011;30:4701-11.
 35. Narayanan P, Sonika P. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103.