



Original Article / 원저

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서 NF- κ B억제를 통한六一散 물추출물의 염증억제효과

이창욱, 박상미, 김은옥, 변성희, 김상찬*

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory Effect of Yukil-san Water Extract on LPS-induced RAW 264.7 Cells

Chang Wook Lee, Sang Mi Park, Eun Ok Kim, Sung Hui Byun, Sang Chan Kim*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Yukil-san (YIS, 六一散; Liu yi san) is composed of Talcum and Glycyrrhizae Radix, the name is said to be derived from the proportion of the two herbal components of the formula. The YIS originated from 'Formulas from the discussion illuminating the Yellow Emperor's Basic Question'(黃帝素問宣明論方; *Huang di su wen xuan ming lun fang*) written by *Liu Wan-Su* (劉完素). YIS could clear summerheat, resolve dampness, and augment the *qi*. This formula may be used to treat the common cold, influenza, acute gastroenteritis, cystitis, urethritis and bacillary dysentery. But, there is insufficient of study about the effects of YIS on the anti-inflammatory activities. The present study evaluated the anti-inflammatory effects of YIS on lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW 264.7 cells.

Methods : Cell viability was assessed by MTT assay and nitric oxide (NO) was evaluated by measuring the nitrite content in culture medium. Pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and IL-6 were quantified by ELISA kit. The expression of proteins related with nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway and inducible NO synthase (iNOS) were assessed by western blot analysis.

Results : YIS significantly inhibited the expression of iNOS increased by LPS, and thus significantly inhibited the production of NO. In addition, YIS significantly inhibited pro-inflammatory cytokines. In the regulation of inflammation, NF- κ B pathway plays a crucial role. YIS inhibited the expression of p-I κ B α and thus inhibited the translocation of NF- κ B to the nucleus.

Conclusions : These results suggest that YIS ameliorates inflammatory response in LPS-activated RAW 264.7 cells through the inhibition of inflammatory mediators, via suppression of the NF- κ B pathway. Therefore, this study provides objective evidence for the anti-inflammatory effect of YIS including the underlying mechanisms.

Key words : Yukil-san, Liu yi san, Talcum, Glycyrrhizae Radix, Inflammation, NF- κ B.

I. 서론

六一散은 劉河間(劉完素)의 〈黃帝素問宣明論方〉에 처음 기재된 方劑로 滑石과 甘草가 6:1로 구성된 方이다. 방제의 명칭은 散이지만 복용시에는 包煎하거나, 끓는 물에 溶解하여 복용한다.六一散은 祛暑利濕하는 효능이 있으며, 暑濕을 感受하여 身熱煩渴, 小便不利의 증상과 또는 泄瀉를 치료하고, 또한 膀胱濕熱로 인한 小便赤澀, 淋痛 및 砂淋 등의 증후에도 적용할 수 있다¹⁾.

현재까지六一散에 대한 연구는 극히 제한적이지만,六一散을 구성하고 있는 구성약물의 연구는 다양하게 진행되었다.

六一散 구성약물 중 甘草에 대한 연구로는 甘草의 멜라닌 생성억제효과²⁾, 항진식효과³⁾, 항산화활성 및 혈관신생 촉진효과⁴⁾, 항우울 효과⁵⁾, 알코올중독에 따른 금단 현상의 억제효과⁶⁾, 그램 양성균에 대한 항균효과⁷⁾, 궤양성 대장염 억제효과⁸⁾, 염증성 cytokine 억제효과⁹⁾, 세포자멸사 유도효과¹⁰⁾, 중금속에 대한 간보호효과^{11,12)} 등이 보고되었고, 滑石에 관한 연구로는 滑石粉末을 外用하여 褥瘡¹³⁾ 및 cyclophosphamide로 유도된 방광염¹⁴⁾ freund's complete adjuvant로 유도된 관절염¹⁵⁾에 유효함이 보고되었고, 滑石의 포제에 따른 滑石성분의 비교연구가 보고되었으며¹⁶⁾, 특히 Hwang등¹⁷⁾은 〈東醫寶鑑〉의 방제분석결과 滑石이 主藥인 方劑의 빈도는 小便門이 가장 많은 빈도수를 차지하였으며, 滑石이 主藥으로 사용된 方劑의 基本方으로六一散을 가장 널리 사용하였음을 밝혔다.

六一散에 대한 연구로는 崔¹⁸⁾가六一散이 白鼠의 高濕適應에 미치는 影響을 연구한 결과가 유일하다.

본 연구에서는六一散이 임상적으로는 傷暑와 泌尿器系感染症 및 尿路結石 등에서 身熱汗出, 口渴心煩,

小便不利 등의 증상이 있는 경우에 응용가능하고¹⁾, 또한 Hwang등¹⁷⁾의 〈東醫寶鑑〉 연구결과를 바탕으로六一散의 항염증효과와 그 기전을 살펴보고자 하였다.

이에 저자는六一散 물추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell 모델에서 NO의 생성 및 iNOS의 발현, 염증성 cytokine의 생성 및 NF- κ B 신호전달체계에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.

II. 재료 및 실험방법

1.六一散 물추출물 (YIS)의 제조

六一散 (Yukil-san; Liu yi san)의 구성 약재인 滑石과 甘草는 대원약업사 (대구, 대한민국)에서 구매하였으며, 滑石 180 g과 甘草 30 g의 혼합물에 물 1.5 L를 가하여 대용약탕기로 3시간 가열한 후,六一散 추출물을 거르로 1차 여과하고, 이 여과액을 3,000 ×g에서 3분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 조심스럽게 취하여 No.2 filter paper로 여과하고, 이 여과액을 진공 회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축된六一散액은 초저온냉동기 (Operon, Korea)에서 24시간 이상 동결하였다. 이를 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)에 넣어 동결건조하였으며, 최종적으로 동결건조물 15.18 g을 얻었다. 동결건조된 추출물은 본 실험에 사용할 때까지 -20°C이하의 냉동고에 보관하였다. YIS의 수율은 7.23%였다. 실험에서 YIS의 처치 세포배양액의 구성성분의 변화를 최소화하기 위하여 YIS를 세포배양액인 DMEM에 (Dulbecco's modified eagle's medium) 농도에 맞게 녹여 처치하였다.

2. 시약 및 기구

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)와 LPS (*Escherichia coli* 055:B5)

*Corresponding author : Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuiddae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea
Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr
•Received : March 29, 2022 / Revised : May 10, 2022 / Accepted : May 11, 2022

및 Griess reagent는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포배양시 사용된 FBS (fetal bovine serum) 및 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) 과 penicillin, streptomycin은 GibcoBRL사 (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 (株)純正化學 (Tokyo, Japan)으로부터 구입하였으며, anti-iNOS의 항체는 BD biosciences사 (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고, anti-NF- κ B 및 anti- β -actin의 항체는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, anti-phospho-I κ B α (p-I κ B α) 및 anti-Lamin A/C의 항체는 Cell Signaling Technology사 (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, 전기영동 후 단백질을 전이하기 위한 nitrocellulose (NC) membrane은 Schleicher & Schuell사 (Dassel, Germany)에서 구입하였다.

3. 세포 배양

RAW 264.7 cell은 murine macrophage cell line으로 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였으며, 세포배양액은 10%의 FBS가 함유된 DMEM에 penicillin과 streptomycin을 각각 100 U/mL, 100 μ g/mL을 넣어 구성하였다. 세포배양은 37°C, 5% CO₂가 유지되는 세포배양기 (Sanyo, Japan)에서 배양하였으며, 본 실험에 사용된 모든 세포는 세포배양 plate에 세포가 80~90%이상 배양된 경우에만 실험에 사용하였으며, 계대 배양 횟수는 20회를 넘기지 않은 세포만을 사용하였다.

4. Nitric Oxide 생성량 측정

LPS 또는 YIS가 처리된 RAW 264.7 cell에서 nitric oxide (NO)의 생성량은 Griess reagent시약으로 측정하였다. 즉, 세포배양 상등액 50 μ L와 sulfanilamide, phosphoric acid 및 α -naphthylamide를 함유한 Griess reagent 50 μ L를 96 well plate에 혼합하고 차광하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, 이를 microplate reader (Model: Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 양은 control대비 각 군의 배수 (fold)로 나타내었다. NO production (fold increase) = absorbance of treated sample/absorbance of control.

5. 세포 생존율 측정

LPS 또는 YIS가 처리된 RAW 264.7 cell에 대한 세포

독성은 RAW 264.7 cell에 YIS를 10~300 μ g/mL의 농도로 전 처리하고, 1시간 후에 LPS를 1 μ g/mL의 농도로 처리한 후 18시간 배양하였다. 배양 후 PBS (phosphate-buffered saline)에 MTT를 0.1 mg/mL의 농도로 녹여서 각 well당 50 μ L씩 넣고 4시간 추가 배양시켰다. 배양 후 생성된 formazan에 영향이 없도록 조심스럽게 배지를 제거하고 formazan crystal을 DMSO에 용해시킨 후 microplate reader (Model: Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 각 처리군의 흡광도를 백분율로 표시하였다.

Cell viability (% of control) = (absorbance of treated sample)/(absorbance of control \times 100).

6. Cytokine의 측정

염증관련 cytokine을 측정하기 위하여 RAW 264.7 cell을 6 well plate에 well당 5×10^5 cell로 분주하고 YIS를 100, 300 μ g/mL로 처리한 다음, 1시간 후에 다시 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 18시간에 상등액을 회수하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin (IL)-1 β 및 IL-6를 각각의 ELISA kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)로 측정하였으며, 각 cytokine은 표준품으로 표준곡선을 얻고, 발현량은 표준곡선에 대입하여 pg/mL로 나타내었다.

7. 단백질의 발현 분석

처치가 종료된 RAW 264.7 cell은 관찰하고자 하는 단백질의 위치에 따라 전세포 추출액 (whole cell lysate)과 핵분획 추출물 (nuclear fraction)로 분리하였으며, 다음의 방법으로 분리하였다.

전세포 추출액은 처치가 종료된 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 radioimmnoprecipitation (RIPA) buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)와 Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 혼합한 lysis buffer를 첨가하여, 4°C에서 30분 동안 반응시키고 15,000 $\times g$ 에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 본 상등액이 전세포 추출액으로 BCA protein assay kit를 이용하여 전세포 추출액의 단백질 함량을 정량하였다.

핵 분획은 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 10 mM

HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 포함한 완충액을 100 μ L 넣어 vortex하고 10분 동안 ice에 방치한 후 4°C에서 16,000 $\times g$ 로 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 세포질 추출액이 함유된 상등액은 제거하고 핵이 포함된 침전물에 다시 20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유한 완충액을 40 μ L 넣은 후 현탁시켜 ice에서 1시간 반응시킨 후 4°C에서 16,000 $\times g$ 로 10분간 원심분리한 후의 상등액을 핵분획으로 얻었다. 핵 분획은 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질 함량을 정량하였으며, 실험 시까지 -70°C에 보관하였다.

전세포추출액 및 핵분획의 단백질함량을 측정 후, 동일량의 단백질을 취하여 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법 (SDS-PAGE; sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)으로 전기영동시킨 후 nitrocellulose (NC) membrane으로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 NC membrane에 iNOS, p-I κ B α , NF- κ B, Lamin A/C 및 β -actin의 1차 antibody와 반응시킨 후, blocking, washing과정을 거치고, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시켜서 ECL detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)로 발색하여 단백질의 발현량을 평가하였다. 각 단백질의 발현량은 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하여 계량화하였으며, 각 단백질의 발현량은 control대비 각 실험군의 fold로 나타내었다.

Relative protein level (fold increase) = density of treated sample/density of control.

8. 통계적 검증

모든 데이터는 3회 이상 반복 실험 후 mean \pm SD로 나타내었으며, 각 그룹간의 통계적 유의성은 one way analysis of variance로 분석한 후, 등분산 가정의 성립 여부에 따라 Tukey honestly significant difference test 또는 Dunnett T3 test로 사후 검정하였다. 통계적 유의성은 p 값이 0.05 또는 0.01 미만을 기준으로 검정하였다.

III. 결과

1. YIS가 NO 생성량에 미치는 영향

YIS의 염증 억제효과를 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서 NO의 생성정도를 관찰하였다. LPS군에서는 control군 (1.00 \pm 0.01)에 비교하여 NO의 생성량이 4.68 \pm 0.13배 증가하여 유의성있는 NO의 증가 (P<0.01)를 나타내었다. YIS 10 μ g/mL에서는 4.81 \pm 0.17배로 유의성이 없었으나, YIS 30, 100, 300 μ g/mL에서는 각각 4.14 \pm 0.05, 2.46 \pm 0.12, 1.85 \pm 0.20 (배)로 LPS군에 비교하여 유의하게 (P<0.01) 감소하였다 (Fig. 1).

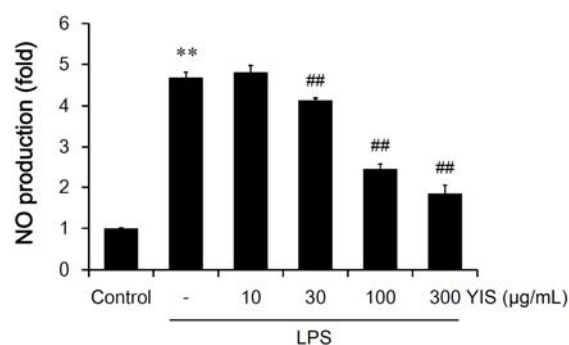


Fig.1. Effects of YIS on NO in LPS-activated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with 10 ~ 300 μ g/mL of YIS dissolved in DMEM for 1 h before the treatment of LPS (1 μ g/mL), and then the cells were incubated for 18 h. The concentration of nitric oxide in culture medium was evaluated as described in materials and methods part. Values represent the mean \pm SD with four separate experiments for each condition. *: vs. control, ** p <0.01, #: vs. LPS alone, ## p <0.01.

2. YIS가 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell의 세포생존율에 미치는 영향

YIS가 30과 100, 300 μ g/mL의 농도에서 LPS에 의한 NO를 유의하게 감소시켰다. 이러한 감소의 원인이 YIS와 LPS의 세포생존율 억제에서 기인한 것인지를 관찰하기 위하여, YIS + LPS를 처리하고 18시간 후에 MTT assay로 세포생존율을 구하였다.

LPS군에서는 control군 (100.00 \pm 1.67)에 비교하여 71.15 \pm 2.50 %의 세포생존율을 나타내었으나 (P<0.01),

LPS와 YIS (10 ~ 300 μ g/mL)를 처리한 군에서는 각각 68.81 ± 1.63 , 73.92 ± 4.68 , 70.14 ± 4.61 , 78.26 ± 3.30 (%)로 LPS군에 비교하여 유의한 세포생존율의 저하는 나타내지 않았다 (Fig. 2).

이러한 NO생성 억제 결과 (100, 300 μ g/mL)와 세포생존율의 결과 (10, 100, 300 μ g/mL)를 바탕으로 이후의 기전 연구는 YIS 100과 300 μ g/mL의 농도에서 실험을 진행하였다.

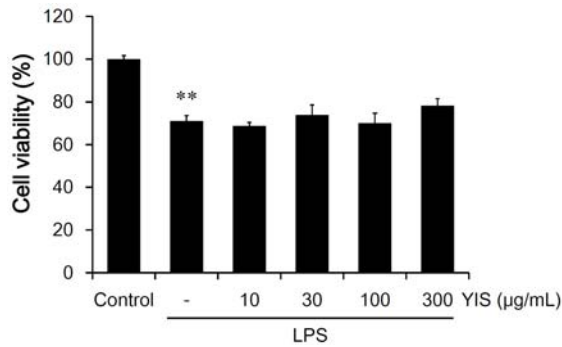


Fig. 2. Effects of YIS on cell viability in LPS-activated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with 10 ~ 300 μ g/mL of YIS dissolved in DMEM for 1 h before the treatment of LPS (1 μ g/mL), and then the cells were incubated for 18 h. After the incubation, the cells were treated with MTT solution. Values represent the mean \pm SD with four separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$

3. YIS가 iNOS의 발현에 미치는 영향

YIS 100과 300 μ g/mL 농도에서 NO를 유의하게 억제한 것이 NO의 합성을 담당하는 핵심 효소인 iNOS 단백질의 조절과 관련이 있을 가능성을 평가하기 위해, 전세포추출액에서 iNOS의 발현을 평가하였다.

LPS군에는 iNOS의 발현이 control (1.00 ± 1.22) 대비 33.15 ± 2.36 배로 유의하게 증가되었으나, YIS 100 μ g/mL의 농도에서는 16.95 ± 8.65 배로 LPS군과 비교하여 유의성 있게 ($P < 0.05$) 감소하였으며, YIS 300 μ g/mL에서도 16.95 ± 8.65 배로 LPS군에 대비하여 유의성있게 ($P < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 3A, B). 이러한 연구결과는 YIS가 NO를 억제함에는 YIS가 iNOS발현

의 억제와 연관성이 있음을 나타낸다.

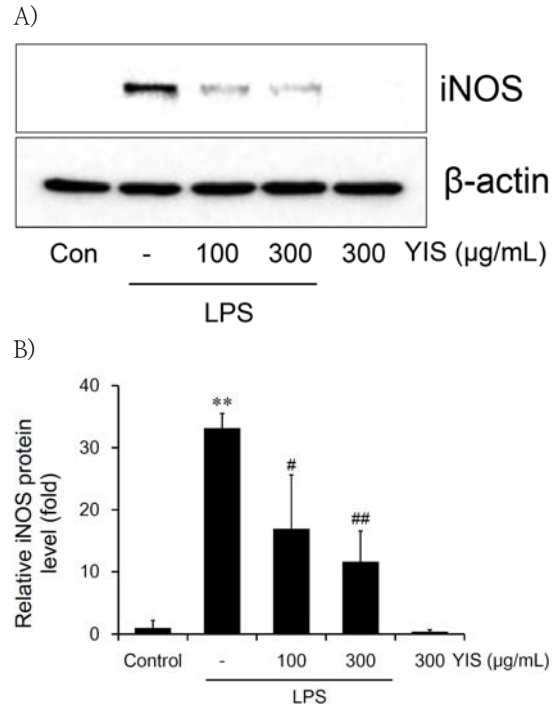


Fig. 3. Effect of YIS on iNOS expression in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The levels of iNOS protein were evaluated 18 h after treatment of LPS (1 μ g/mL) with or without YIS (100, 300 μ g/mL) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE. β -actin was used as an equal loading control (A). The relative density level of the protein was measured by scanning densitometry (B). Values represent the mean \pm SD with three separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

4. YIS가 TNF- α 의 생성량에 미치는 영향

Macrophage에 LPS를 처리하면 TNF- α 를 포함한 cytokine을 다량으로 생성 및 분비한다. YIS가 100과 300 μ g/mL 농도에서 NO 및 iNOS를 억제한 것 외에 이러한 염증성 cytokine을 억제하는지를 평가하였다. 본 연구에서는 아무런 처치도 하지 않은 control군에서는 TNF- α 가 368.52 ± 28.45 pg/mL이었으나, LPS군

에서는 3741.33 ± 31.48 pg/mL로서 control군에 비교하여 유의하게 ($P < 0.01$) 증가하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 TNF- α 의 증가는 YIS 100 μ g/mL에서 3475.30 ± 123.86 pg/mL으로 유의성있게 ($P < 0.05$) 감소하였으며, 300 μ g/mL에서도 2487.44 ± 73.98 pg/mL으로 유의성있게 ($P < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 4).

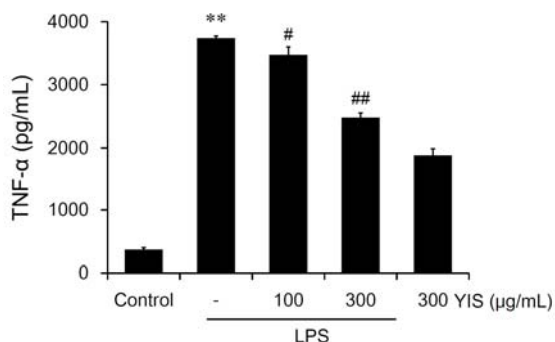


Fig. 4. Effect of YIS on TNF- α in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The concentration of TNF- α was evaluated in the medium of RAW 264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/mL) in the presence or absence of YIS for 18 h. The amount of TNF- α was measured by ELISA kit as described in materials and methods part. Values represent the mean \pm SD with three separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

5. YIS가 IL-1 β 의 생성량에 미치는 영향

LPS에 의해 macrophage에서 분비되는 IL-1 (IL-1 α 및 IL-1 β)은 강력한 전염증성 물질로 TNF와 유사하게 감염과 염증자극에서 숙주의 염증반응에 주된 매개체로 작용한다^{19,20}.

본 연구의 결과 control군에서는 IL-1 β 가 1.08 ± 0.70 pg/mL이었으나, LPS군에서는 250.33 ± 12.31 pg/mL로서 control군에 비교하여 유의하게 ($P < 0.01$) 증가하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 IL-1 β 의 증가는 YIS 100과 300 μ g/mL에 각각 188.58 ± 19.14 과 157.69 ± 14.28 pg/mL으로 유의성있게 ($P < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 5).

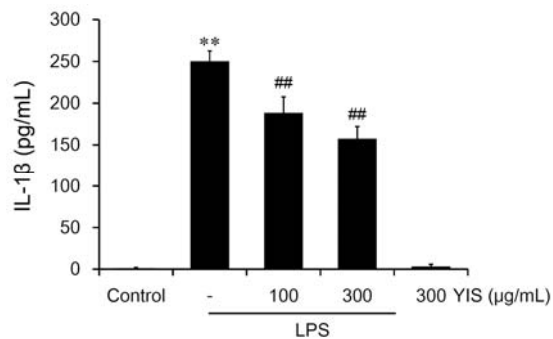


Fig. 5. Effect of YIS on IL-1 β in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The concentration of IL-1 β was evaluated in the medium of RAW 264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/mL) in the presence or absence of YIS for 18 h. The amount of IL-1 β was measured by ELISA kit as described in materials and methods part. Values represent the mean \pm SD with three separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, ## $p < 0.01$

6. YIS가 IL-6의 생성량에 미치는 영향

IL-6는 주로 macrophage, endothelial cell, T cell에서 분비되며, B cell을 활성화하여 항체의 생성을 촉진하고, 또한 염증 부위에서 높은 수치를 나타낸다^{19,21}.

본 연구의 결과 control군에서는 IL-6가 5.88 ± 0.33 pg/mL이었으나, LPS군에서는 1604.90 ± 5.01 pg/mL로서 control군에 비교하여 유의하게 ($P < 0.01$) 증가하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 IL-6의 증가는 YIS 100과 300 μ g/mL에 각각 1102.69 ± 37.08 과 848.08 ± 5.07 pg/mL으로 유의성있게 ($P < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 6).

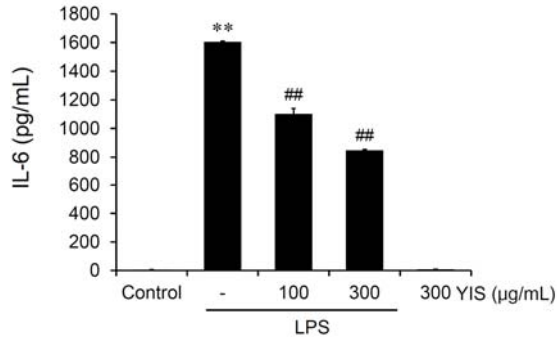


Fig. 6. Effect of YIS on IL-6 in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The concentration of IL-6 was evaluated in the medium of RAW 264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/mL) in the presence or absence of YIS for 18 h. The amount of IL-6 was measured by ELISA kit as described in materials and methods part. Values represent the mean \pm SD with three separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, ## $p < 0.01$

7. YIS가 I κ B α 의 인산화에 미치는 영향

LPS가 macrophage의 염증반응을 활성화시키는 데에는 NF- κ B pathway가 중요한 역할을 한다¹⁹⁾. NF- κ B의 억제단백질인 I κ B α 의 인산화가 NF- κ B를 활성화시키므로 I κ B α 의 인산화형태인 p-I κ B α 의 발현을 평가하였다.

LPS군에는 p-I κ B α 의 발현이 control군 (1.00 \pm 0.06)에 비교하여 2.00 \pm 0.13배로 유의하게 증가되었다. YIS 100 μ g/mL의 농도에서는 2.06 \pm 0.19배로 LPS군과 비교하여 감소하지 않았으며, YIS 300 μ g/mL에서는 1.20 \pm 0.07배로 LPS군에 대비하여 유의성있게 ($P < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 7A, B).

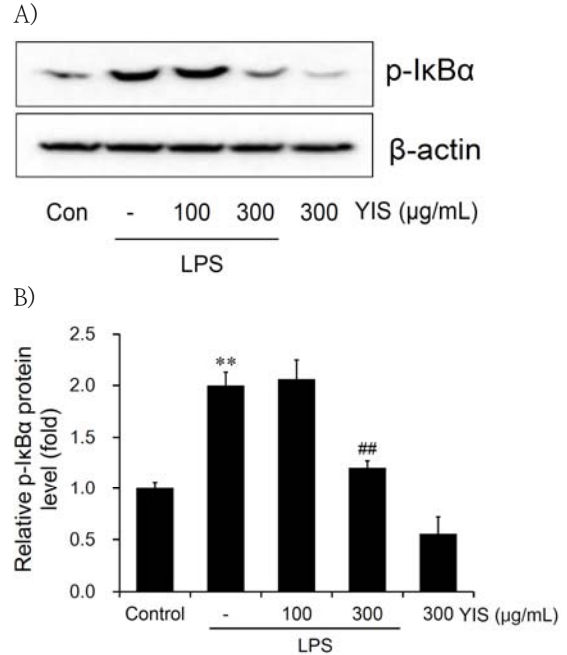


Fig. 7. Effect of YIS on p-I κ B α expression in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The levels of p-I κ B α protein were evaluated 1 h after treatment of LPS (1 μ g/mL) with or without YIS (100, 300 μ g/mL) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE. β -actin was used as an equal loading control (A). The relative density level of the protein was measured by scanning densitometry (B). Values represent the mean \pm SD with three separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, ## $p < 0.01$

8. YIS가 핵에서 NF- κ B의 발현에 미치는 영향

YIS가 LPS로 활성화된 macrophage에서 p-I κ B α 의 발현을 감소시킴에 따라, 핵분획에서 NF- κ B의 발현량을 평가하였다.

LPS군에는 NF- κ B의 발현이 control (1.00 ± 0.04)에 비교하여 1.88 ± 0.21 배로 유의하게 증가되었다. YIS 100 μ g/mL의 농도에서는 1.98 ± 0.24 배로 LPS군과 비교하여 감소하지 않았으며, YIS 300 μ g/mL에서는 1.23 ± 0.12 배로 LPS군에 대비하여 유의성있게 ($P < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 8A, B).

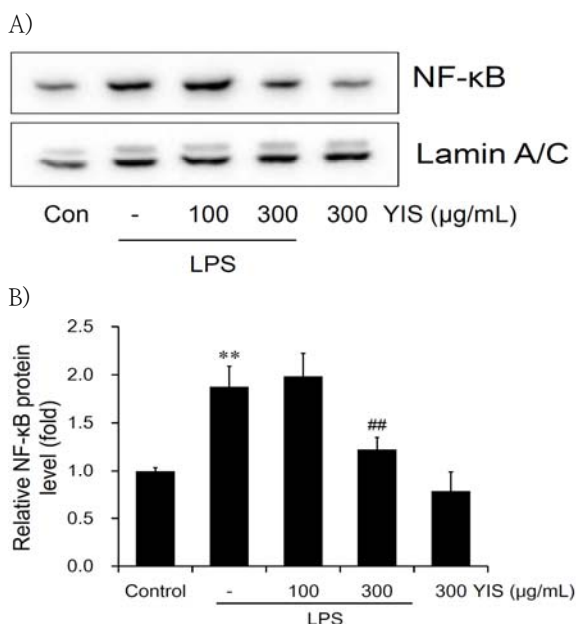


Fig. 8. Effect of YIS on NF- κ B expression in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The levels of NF- κ B protein in nuclear fraction were evaluated 1 h after treatment of LPS (1 μ g/mL) with or without YIS (100, 300 μ g/mL) pretreatment (i.e. 1h before LPS). Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE. Lamin A/C was used as an equal loading control (A). The relative density level of the protein was measured by scanning densitometry (B). Values represent the mean \pm SD with three separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, ## $p < 0.01$

IV. 고찰

六一散은 滑石 六兩과 甘草 一兩으로 구성된 방으로 <黃帝素問宣明論方>에 처음 기재되었다. 滑石과 甘草를 細末하여 내복으로는 매번 3錢씩 服用하며, 외용으로는 분말을 환처에 도포한다. 六一散은 清暑利濕의 효능이 있어 전통적으로는 暑濕證으로 身熱煩渴, 小便不利 또는 嘔吐泄瀉에 사용되기도 한다. 또한 膀胱濕熱로 인한 小便赤澀 및 淋痛, 砂淋 等に 사용되기도 하며, 皮膚濕疹, 濕瘡, 汗疹에 사용되기도 한다. 근래에 六一散은 泄瀉, 胃腸型感冒, 胃腸炎, 中暑, 藥物不良反應, 膀胱炎, 尿道炎, 泌尿系結石, 手術後尿道症候群, 手術後包皮水腫 및 濕疹, 黃水瘡, 癩子등에 사용되기도 한다²²⁾.

六一散의 구성약물중 甘草 (Glycyrrhizae Radix)는 豆科에 屬한 多年生 草本인 甘草와 脹果甘草 및 光果甘草의 根 및 根莖을 乾燥한 것으로, 性은 平無毒하고 味는 甘하며, 心, 肺, 脾, 胃經에 주로 작용한다. 補中益氣(炒用)의 효능으로 脾胃虛寒, 心陽不振, 心悸, 結代脈을 치료하며, 潤肺止咳(炒用)의 효능으로 肺痿咳嗽를 치료한다. 더불어 清熱解毒(生用)의 효능으로 咽喉腫痛, 藥物中毒을 치료하며, 緩急止痛(生用)의 효능으로 腹中急痛, 腹皮急縮, 臟躁를 치료한다^{23,24)}. 근래까지 甘草에 대한 연구로, Kim²⁾은 甘草 물추출물이 B16 mouse melanoma세포에서 tyrosinase와 dopachrome tautomerase 활성을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킴을 보고하였고, Lee등⁴⁾은 甘草추출물이 항산화활성을 가지며 또한 혈관신생을 촉진하여 상처치료에 유의한 효과가 있음을 규명하였으며, Ko등⁵⁾은 甘草가 HPA axis의 억제를 통하여 항우울에 효과가 있음을 보고하였다. 또한, Kwak등⁶⁾은 甘草 100과 400 mg/kg의 투여가 알코올중독에 따른 금단 현상을 억제함을 밝혔으며, Kim등⁷⁾은 甘草 95% EtOH추출물이 그람 양성균, 그람 음성균, 효모 등에 대하여 항균활성을 가지며 특히 그람 양성균에 대하여 탁월한 항균효능을 나타냄을 보고하였다. 甘草와 염증에 대한 연구로, Kwak등³⁾은 甘草가 喘息모델 생쥐에서 IL-4, -5, -13 및 IgE의 생성을 유의성 있게 감소시킴을 보고하였으며, Lee등⁸⁾은 甘草초임계추출물이 1 ~ 100 mg/kg의 농도에서 Dextran Sulfate Sodium로 유도된 마우스 궤양성 대장염을 억제함을 밝혔다. Yoon등⁹⁾은 甘草추출물의 용매별 (H₂O,

MeOH, EtOH, 70% EtOH, 85% EtOH, n-Hexane) 염증성 cytokine 억제효능을 연구한 결과 MeOH추출물이 다른 용매 추출물보다 우수한 항염증 작용이 있음을 보고하였으며, Lee등¹⁰⁾은甘草물추출물이 인체방광암세포 T24에서 caspase(-3/-8/-9)의 발현과 IAP family의 발현을 억제하여 암세포를 apoptosis로 유도함을 규명하였다. 또한 Kim등¹¹⁾과 Lee등¹²⁾은甘草가百藥의毒을解毒함을 기반으로甘草물추출물이 cadmium으로 유도된 간독성을 억제함을 각각 *in vitro*와 *in vivo*에서 밝혔다.

六一散의 다른 구성약물인滑石(Talcum)은硅酸鹽類의鑛物인滑石으로,性은寒無毒하고味는甘淡하며,膀胱,肺,胃經에 주로 작용한다.清熱解暑의 효능으로暑熱煩渴,感冒腹瀉,餘熱未退를 치료하며,利尿通淋의 효능으로熱淋,石淋,尿酸澱痛을 치료하며,祛濕斂瘡의 효능으로濕熱毒瘡,濕脚氣,疥子,濕疹을 치료한다^{23,24)}. 근래까지滑石에 관한 연구로, Cho등¹³⁾은〈景岳全書〉에서甘草粉과滑石을等分으로하여天疱濕熱에 가루를 도포함과,〈太平聖惠方〉에서는瘡의 치료,〈瀕湖簡方〉에서는足趾間潰瘍에 응용되었음을 근거로褥瘡발생시 발생하는熱感과分泌物의 제거목적으로滑石분말을外用으로 처치하여 유의한 효과를 거두었음을 보고하였다.滑石과 염증에 대한 연구로, Seo등¹⁵⁾은滑石 열수추출물이 Freund's complete adjuvant로 유도된 관절염에 효능이 있음을 보고하였으며, Ryu등¹⁴⁾은 cyclophosphamide로 유도된 방광염에서滑石이 비감염성 방광염에 유의한 효과가 있음을 밝혔다. Cyclophosphamide는 nitrogen mustard계 항암제로 이의 대사산물은 DNA 파괴를 초래하여 세포를 손상시키며, cyclophosphamide를 다량 투여했을 때에는 구토, 설사 출혈 등의 부작용을 나타내며, 더불어, 비림프기관증 특히 방광에서 출혈성 방광염을 유발한다¹⁴⁾. 또한 Hwang등¹⁷⁾은〈東醫寶鑑〉에서滑石의 배합연구를 통하여,滑石이主藥으로構成된方劑의治療領域에 따른 처방빈도는小便門이 가장 많은 빈도수(35.2%)를 차지하였으며,滑石이主藥으로 사용된處方の病因病理증熱,暑,風熱이 다수를 차지함을 보고하였다. 근래까지六一散에 대한 연구는 극히 제한적으로崔¹⁸⁾의六一散이白鼠의高溫適應에 미치는影響을 연구한 결과가 유일하다.

위와 같이六一散은 임상적으로胃腸炎,膀胱炎,尿道炎,泌尿系結石,手術後尿道症候群,濕疹,黃水瘡 등

에 활용될 수 있고, 실험적으로도滑石에 대한 관절염, 방광염에 대한 연구가 진행되었으나,六一散에 대한 항염증효과의 기전연구는 이루어지지 않았다. 이에 본 연구에서는六一散의 항염증효과 및 그 기전을 *in vitro*에서 연구하였다.

염증(inflammation)은 세균이나 이물질에 대한 인체의 국소적 방어반응을 말한다. 외부방어기전의 존재에도 불구하고 손상된 피부나 점막을 통하여 체내로 세균이나 바이러스가 침입하게 되면 이에 대항하여 체내에서는 염증반응이 일어나게 되는데 염증은 침입한 병원균을 제거하는 효과가 있을 뿐만 아니라 병원균이 다른 신체부위로 이동하는 것을 차단시킴으로서 다른 조직으로 손상이 확산되는 것을 억제시켜주는 기능도 한다. 염증이 일어나면 통증(pain), 발적(redness), 열(fever), 부종(edema), 기능상실(loss of function) 등과 같은 증상이 나타난다. 염증 반응에서의 유해한 자극은 직접적으로 해당부위에 작용해 손상을 일으키기도 하지만, 대부분은 내인성의 염증매개물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다^{25,26)}.

본 연구에서는 *in vitro*연구로 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell을 이용하였으며, LPS는 염증반응을 유발하는 강력한 인자로 macrophage의 TLR과 결합하여 cytokine을 포함한 다양한 염증매개물질을 생성시키므로 염증 연구에서 빈용된다²⁷⁾.

Macrophage는 단핵구(monocyte)가 혈관벽을 통과하여 조직에서 전환된 것으로 대부분의 조직에서 발견된다. 조직에서 macrophage는 활성화 또는 분화하여, 중추신경계에서는 microglial cell이 되며, 간에서는 kupffer cell, 폐에서는 alveolar macrophage가 되며, 뼈에서는 osteoclast가 된다¹⁹⁾. Macrophage의 주된 기능은 식균작용(phagocytosis)이며 미생물이나 입자가 외부로부터 유입되는 상피조직인 피부, 호흡기관의 내부표면 및 소화기에 다량 존재한다²⁸⁾.

LPS는 그램 음성균의 외벽 절편 복합물로서, lipid component와 polysaccharide moiety로 구성되어 있다. lipid component는 내재면역을 활성화시키고, polysaccharide는 획득면역을 활성화한다¹⁹⁾.

LPS는 본 실험에 사용된 RAW 264.7 cell과 같은 macrophage의 강력한 activator로, LBP/CD14/mammalian TLR4 system에 관여한다. 즉, LPS는 혈액이나 세포외액(extracellular fluid)에 존재하는 soluble LBP(LPS-binding protein)와 결합하고, 이 LPS-LBP 복합

체는 복합체중의 LPS가 CD14에 결합을 하도록 촉진하고, LPS가 CD14에 결합되면 LBP는 분리된다. 다시 LPS-CD14 복합체중 CD14는 세포외에 존재하는 MD2와 결합하여 TLR4에 결합한다. LPS/CD14/TLR4는 IRAK (IL-1 receptor-associate kinase)의 인산화, TRAF6 (TNF receptor-associate factor 6)의 활성화를 통하여 NF- κ B pathway, MAPK pathway를 활성화하여 염증반응을 유도한다¹⁹⁾. 본 연구에서는 NF- κ B pathway를 중심으로 六一散추출물의 항염증효과를 평가하였다.

본 연구를 위해 먼저, YIS의 NO (nitric oxide)억제 효과와 세포생존율을 측정하였다. NO는 L-arginine-nitric oxide pathway를 통하여 생성되는데, L-arginine은 NOS (nitric oxide synthase)에 의하여 NO와 L-citrulline이 생성된다. NO는 강력한 내인성(endogenous) 혈관확장인자로서 혈소판의 부착이나, 응고를 억제하며, 또한 vascular smooth muscle의 증식을 억제한다²⁹⁾. 생체내 지속적인 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, 염증반응 유발에 의한 조직의 손상을 초래할 수 있다³⁰⁻³²⁾. RAW 264.7 cell에서 LPS의 처치는 NO를 control군에 비교하여 유의하게 증가시켰으나, YIS는 30, 100, 300 μ g/mL의 농도에서 모두 LPS로 증가된 NO를 유의하게 ($P<0.01$) 감소시켰으며, YIS + LPS의 처치는 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. NO는 NOS에 의하여 형성되므로, YIS가 iNOS의 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

포유류에서 NOS는 neuronal-, inducible-, endothelial-NOS의 3가지 형태가 있다. nNOS (or type I)는 neuron에서 처음 발견되었으며, 주로 신경전달에 관여하며, NO를 pmole수준으로 생성하며 constitutive하게 존재한다. 성호르몬이나, 신경, 뇌의 손상에서는 증가한다. iNOS (or type II)는 macrophage에서 처음 발견되었으며, 면역세포독성 (immunocytotoxicity)에 관여하며, NO를 nmole수준으로 생성하며 cytokine이나, endotoxin에 의하여 활성화된다. eNOS (or type III)는 endothelium에서 처음 발견되었으며, 주로 혈관평활근의 이완 (relaxation of vascular smooth muscle)에 관여하며, NO를 pmole수준으로 생성하며 constitutive하게 존재한다. 성호르몬이나 shear stress에서 증가한다^{33,34)}.

본 연구에서 LPS군에는 iNOS의 발현이 유의하게 증가되었으며, 이러한 증가는 YIS 100과 300 μ g/mL의

농도에서는 유의성있게 감소하였다. 이러한 연구결과는 YIS가 iNOS의 발현을 억제하여 NO의 생성을 억제함을 나타낸다.

LPS는 염증반응을 유발하는 강력한 인자로 macrophage의 TLR (Toll-like receptor)와 결합하여 다량의 pro-inflammatory cytokine, iNOS, NO를 생성하며, macrophage가 염증반응시 분비하는 과도한 TNF- α , IL-1 β 는 숙주에 불리한 결과를 초래할 수도 있다^{35,36)}. TNF는 항원에 의해 활성화된 T cell, NK cell, mast cell 등에서 분비되지만, 활성화된 mononuclear phagocyte에서 다량 분비된다. macrophage에서 LPS는 TNF의 분비를 활성화시키는 가장 강력한 자극제이다. TNF는 endothelial cell, neutrophil을 활성화시키고, hypothalamus에 작용하여 발열을 유도하고, 많은 세포에서 apoptosis를 유도한다¹⁹⁾. 또한 근래 연구결과로 COVID-19 감염자의 다양한 염증매개물질, 즉 interleukin류 (IL-1 β , IL-1RA, IL-7, -8, -9, -10), interferon gamma (IFN- γ), IFN- γ inducible protein (IP-10), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophages inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), platelet-derived growth factor (PDGF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α)중, IL-2, -7, -10, G-CSF, MIP-1 α , MCP-1과 TNF- α 가 특징적으로 높게 나타남이 보고되었다³⁷⁾. IL-1은 TNF와 유사하게 감염과 염증자극에서 숙주의 염증반응에 주된 매개체로 작용하며, 활성화된 mononuclear phagocyte에서 다량 분비된다. 또한 endothelial cell을 활성화시키고, hypothalamus에 작용하여 발열을 유도한다. IL-1은 IL-1 α 와 IL-1 β 의 2가지가 있으며, 30%이하의 상동성을 가지고 있지만, 동일한 세포의 receptor에 결합하여 동일한 생물학적 특성을 나타낸다. 그러나 체내에 순환하는 IL-1의 대부분이 IL-1 β 이다¹⁹⁾. 한편 IL-6는 주로 macrophage, endothelial cell, T cell에서 분비되며, B cell을 활성화하여 항체의 생성을 촉진한다¹⁹⁾. 본 연구에서 YIS는 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cell에서 증가된 TNF- α 및 IL-1 β , IL-6의 생성량을 유의성있게 감소시켰다.

LPS는 LPS/CD14/TLR4 복합체를 통하여 NF- κ B 신호전달 경로를 활성화시키므로¹⁹⁾, YIS가 NF- κ B 신호전달 경로를 억제할 수 있는지 평가하였다. 세포가 일반적인 상황에서 NF- κ B는 세포질에서 억제단백질인

inhibitory- κ B (I κ B)와 결합하여 존재하지만, LPS의 자극에 의해 염증반응이 활성화되면 I κ B의 인산화가 진행되면서 NF- κ B가 핵으로 전위하여 염증매개물질의 전사를 유도한다. I κ B 단백질의 종류는 α , β , ε 등이 있지만, 세포에서 가장 풍부한 종류는 I κ B α 이다³⁸⁾.

본 연구에서는 전세포추출액에서는 p-I κ B α 의 발현 및 핵내에서는 NF- κ B의 발현을 평가하였다. 전세포추출액에서 p-I κ B α 는 LPS 처치시 유의하게 증가하였으나, YIS를 처치한 실험군에서는 유의하게 감소하였으며, 또한 핵분획에서의 NF- κ B 역시 LPS에 의해 유의하게 증가하였으나, YIS에 의해 유의하게 감소하였다.

이러한 연구결과는 YIS가 I κ B α 의 인산화를 억제하여 NF- κ B가 핵으로 전위되는 것이 억제되며, 이에 따라 NO, iNOS, cytokine 등의 염증매개물질의 증가가 억제됨을 나타낸다.

본 연구는 임상적으로六一散이 胃腸炎, 膀胱炎, 尿道炎 등에 활용될 수 있음에 대하여 *in vitro* 수준에서 항염증효과와 그 기전을 제시하였다. 그러나六一散이 滑石과 甘草의 배합이므로, 滑石-甘草배합에 따른 항염증작용의 상승효과가 존재하는지 존재하지 않는지, 항염증효과에서六一散 방제의 구성비율(滑石:甘草 = 6:1)이 최적비율인지는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되며, 또한 NF- κ B 신호전달경로 외에 다른 염증매개신호전달 경로에는 어떠한 영향을 미치는지에 대해서도 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

六一散추출물(YIS)의 염증억제효능을 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서 NO의 생성량, iNOS의 발현 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 cytokine 및 염증억제 기전을 살펴본바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS는 NO의 생성량을 유의성있게 증가시켰으며, YIS 30, 100, 300 μ g/mL의 농도에서는 증가된 NO를 유의하게 억제하였다. 또한 YIS + LPS는 LPS단독 처리군에 비교하여 세포독성을 나타내지 않았다.
2. LPS는 iNOS 단백질의 발현을 유의성있게 증가시켰으며, YIS는 100, 300 μ g/mL의 농도에서 증가된 iNOS 단백질의 발현을 유의성있게 감소시켰다.
3. LPS는 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 전염증성 cytokine을

유의성있게 증가시켰으며, YIS는 100, 300 μ g/mL의 농도에서 증가된 TNF- α , IL-1 β , IL-6를 유의성있게 감소시켰다.

4. LPS는 p-I κ B α 단백질의 발현을 유의성있게 증가시켰으며, YIS는 300 μ g/mL의 농도에서 증가된 p-I κ B α 단백질의 발현을 유의성있게 감소시켰으며, 또한 LPS에 의해 증가된 핵분획에서의 NF- κ B 발현 역시 YIS는 300 μ g/mL의 농도에서 증가된 NF- κ B의 발현을 유의성있게 감소시켰다.

이러한 결과로 보아, YIS는 I κ B α 의 인산화를 억제하고, 또한 NF- κ B의 핵으로의 전위를 억제하여, 항염증효과를 나타냄을 나타낸다.

Acknowledgement

This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No.2018R1A5A2025272)

References

1. Kim SC, Kim SH, Rho SH, Park SD, Byun SH, Seo BI, et al. Herbal Formulations, Younglimsa:Seoul. 1999:222-3.
2. Kim J. Inhibitory Effect and Mechanism on Melanogenesis of Radix Glycyrrhizae Water Extract. Graduate School of Wonkwang University. PhD thesis. 2002.
3. Kwak SG, Park YC. Effects of Gamcho on Cytokine Production in Asthma Model Mouse. Kor J Orient Physiol Pathol. 2004;18(2):463-67.
4. Lee YK, Roh SS. The experimental study of glycyrrhiza uralensis on wound healing by antioxidant effect. Journal of Daejeon University Institute of Oriental Medicine. 2016;25(1):145-53.
5. Ko SY, Kim DH, Lee TH. Effect of Glycyrrhizae Radix Water Extract on the depression induced by LPS in Rats. Kor. J. Herbology. 2014 ; 29(5) : 9-16.
6. Kwak JI, Kim KJ. Effect of Glycyrrhizae Radix on Alcohol Intake and Alcohol Withdrawal Syndrome. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2007;

- 21(1):33-8.
- Kim SS, Shin JY, Park YM, Chung KM, Lee JH, Kweon DH. Investigation of Antimicrobial Activity and Stability of Ethanol Extracts of Licorice Root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J Food Sci Technol.* 2006;38(2):241-8.
 - Lee KH, Rhee KH. Anti-Inflammatory Effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne Extract in a Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mouse Model. *Korean J Food & Nutr.* 2010;23(4):435-9.
 - Yoon TS, Cheon MS, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Chun JM, et al. Evaluation of Solvent Extraction on the Anti-Inflammatory Efficacy of *Glycyrrhiza uralensis*. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2010;18(1):28-33.
 - Lee KW, Kim JI, Lee SY, Choi KM, Oh YT, Jeong JW. Induction of Apoptosis by Water Extract of *Glycyrrhizae radix* in Human Bladder T24 Cancer Cells. *Korean J Plant Res.* 2019;32(4):255-63.
 - Kim SC, Byun SH, Yang CH, Kim CY, Kim JW, Kim SG. Cytoprotective effects of *Glycyrrhizae radix* extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). *Toxicology.* 2004;197(3):239-51.
 - Lee JR, Park SJ, Lee HS, Jee SY, Seo J, Kwon YK, et al. Hepatoprotective Activity of Licorice Water Extract against Cadmium-induced Toxicity in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009;6(2):195-201.
 - Cho GI, Yang MR, Choi JY, Shin HS, Jung YJ, Kim KS, et al. Two cases of Pressure sore treated by Talcum(滑石) powder. *Korean J Orient Int Med.* 2001;22(4):709-15.
 - Ryu JW, Hong ES, Choi YH, Lee YT, Choi BT. Effects of Talc on Cyclophosphamide-Induced Cystitis in the Rat. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2005;19(2):429-33.
 - Seo BI, Jung KY, Lee ES. A efficacy of Talcum on arthritis induced by freund's complete adjuvant. *The Journal of Applied Oriental Medicine.* 2004;4(1):51-60.
 - Kook YB. Study for the Standardization of Talcum and Comparison Property before and after Talcum Processing Method. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription.* 2004;12(1):225-46.
 - Hwang HT, Ryu SH, Kim GM, Yun YG. A Study on Applications of Talcum Mainly Blended Prescriptions in Dongeuibogam. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription.* 2008;16(2):31-45.
 - Choi BE. A Study on the Effects of Saengmaek-san and Yukil-san on High Temperature Adaptation in Rats. *Kyung Hee University Master's Thesis.* 1989.
 - Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman. *Cellular and Molecular Immunology.* 5th Ed. Saunders:Philadelphia. 2003:25, 243-55, 282-8, 493, 507.
 - Ramadan DE, Hariyani N, Indrawati R, Ridwan RD, Diyatri I. Cytokines and Chemokines in Periodontitis. *Eur J Dent.* 2020 Jul;14(3):483-95.
 - Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol.* 1989;142(1):144-7.
 - Herbal Formula Textbook Compilation Committee. *Herbal Formula Science in Korean Medicine.* Koonja Publisher:Paju. 2020:439-48.
 - Lee SI. *Herbology.* Suseowon:Seoul. 1981:58-60, 274-6.
 - Shin MK. *Clinical Traditional Herbology.* Younglimsa:Seoul. 1997:172-5, 672-3.
 - Cho YH. *Concepts of Human Physiology.* Bummoon Education:Seoul. 2011:202.
 - The Korean Society of Pathology. *Pathology.* Komoonsa:Seoul. 1995:71-104.
 - Alam MB, Ju MK, Kwon YG, Lee SH. Protopine attenuates inflammation stimulated by carrageenan and LPS via the MAPK/NF-kappaB pathway. *Food Chem Toxicol.* 2019;131:110583. doi: 10.1016/j.fct.2019.110583. Epub 2019 Jun 17.
 - Min HS, Jang KJ, Kwon OR, Lee SY, Lee HM, Kim HA. *Human Physiology.* 2nd Ed. Yangseowon:Paju. 2015:277-9.
 - Jeremy S Paige, Samie R Jaffrey. *Pharmacologic manipulation of nitric oxide signaling: targeting*

- NOS dimerization and protein-protein interactions.
Curr Top Med Chem. 2007;7(1):97-114.
30. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, et al. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 2001;76:119-23.
31. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 2001;69:625-35.