



Original Article / 원저

NF- κ B와 MAPK억제를 통한 柴胡疏肝湯의 항염증효과

진효정, 박상미, 김예림, 변성희, 김상찬*

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory effect of Sihosogan-tang via inhibition of NF- κ B and MAPK cascade

Hyo Jeong Jin, Sang Mi Park, Ye Lim Kim, Sung Hui Byun, Sang Chan Kim*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Sihosogan-tang (SST) is one of the traditional herbal formula and also one of the Korean medical insurance medicines. It commonly used in the treatment of hepatitis, chronic gastritis, intercostal neuralgia, pleurisy, and depression in East Asia. In the present study, we have demonstrated the anti-inflammatory effects of SST in macrophage cell line.

Methods : To investigate mechanism of the anti-inflammatory effect of SST, we examined the productions of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines, and the expressions of inducible NO synthase (iNOS), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) on RAW 264.7 cells activated by LPS.

Results : SST significantly inhibited the expression of iNOS increased by LPS, and also significantly inhibited the production of NO. In addition, SST significantly inhibited pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and interleukines. SST inhibited the expression of NF- κ B and MAPK activation.

Conclusions : These results suggest that SST ameliorates inflammatory response in LPS-activated RAW 264.7 cells through the inhibition of the NF- κ B and MAPK pathway. Therefore, this study supplies objective evidence for the anti-inflammatory effect of SST.

Key words : Sihosogan-tang (SST), Chaihu Shugan Decoction, anti-inflammation, NF- κ B, MAPK.

I. 서론

柴胡疏肝湯은 〈方藥合編〉 增補方에 柴胡疎肝散으로 기재된 方劑로 柴胡, 陳皮 各一錢二分, 川芎, 赤芍藥, 枳殼, 香附子(醋炒) 各一錢, 甘草 五分으로 구성되며, 怒火傷肝으로 인한 左脇作痛을 치료한다¹⁾. 用法으로는 水煎服으로 되어 있으므로 비록 方劑名에 제형이 散으로 되어 있더라도, 이는 煮散의 의미가 아니라 湯劑에 해당된다. 또한 본 방은 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산)으로 한방건강보험요양급여 한약 제제 중 하나이다.

본 방제는 〈證治準繩〉에 처음으로 기재되었으며, 方의 약물 구성상 기원은 四逆散에서 枳實을 枳殼으로 바꾸고, 陳皮, 川芎, 香附子を 加한 것이다. 그러므로 柴胡疏肝湯은 肝炎, 慢性胃炎, 肋間神經痛 등이 肝氣鬱滯證으로 辨證되는 경우 사용 가능하며, 또한 타박으로 인한 脇痛, 肋膜炎, 肋間神經病症, 憂鬱症 등에도 辨證에 따라 사용이 가능하다²⁾.

柴胡疏肝湯에 대한 연구로는 알콜성 근위축에 대한 연구³⁾, 간기능회복에 관한 연구⁴⁾, 담석증에 대한 연구⁵⁾, 우울증에 대한 연구^{6,7)}, 스트레스 억제 관련 연구⁸⁾, 기능성 소화불량에 대한 연구⁹⁾, 癲癇치료에 대한 동향연구¹⁰⁾ 등이 보고되었으나, 아직 항염증작용에 대한 연구는 전무한 편이다.

염증 반응은 외부 자극으로 인한 외상이나 외부 병원체의 침입 등으로 인한 조직의 손상에 대해 발열, 통증, 홍반, 부종을 수반하는 다양한 면역세포 및 신호전달 물질이 활성화되는 생체 조직의 방어 기전이다. 그러나 과도한 염증 반응이 지속되게 되면 세포와 조직을 손상시키며 염증성 질환을 유발한다¹¹⁾. 대식세포(macrophage)는 체내 염증 반응에 주로 관여하는 세포로, lipopolysaccharide (LPS) 등의 자극에 의해 활성화되어 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE₂)와 염증성 cytokine과 같은 염증매개물질 생성하여 다양한 염증 반응을 유도하고 이를 조절한다¹²⁾. LPS는 그람 음성 박테리아의 주요 외막 성분으로, 대식세포 표면의 Toll-like receptor 4 (TLR4)를 자극하여 염증매개물질 생성, 염증 관련 전사 인자 및 세포 내 신호 경로를 활성화함으로써 염증을 유발한다¹³⁾.

이에 본 연구에서는 LPS로 활성화된 RAW 264.7

cell에서 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산)의 항염증 효능을 평가하여, 柴胡疏肝湯의 효능 확대 및 활용도를 제고하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 연구에 사용한 柴胡疏肝湯은 (주)경방신약(인천, 한국)의 경방 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산)을 증류수로 용해하여 0.22 μ m syringe filter (Merck Millipore)로 여과한 뒤 실험에 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin과 streptomycin은 Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. E. coli LPS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Griess reagent는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. inducible NO synthase (iNOS)항체는 BD biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고 inhibitor κ B ($I\kappa$ B), phospho- $I\kappa$ B α (p- $I\kappa$ B α), nuclear Factor- κ B (NF- κ B), p44/42 MAPK (p44/42), phospho-p44/42 MAPK (p-p44/42), p38 MAPK (p38), phospho-p38 MAPK (p-p38), stress-activated protein kinase (SAPK)/C-Jun N-terminal kinase (JNK), phospho-SAPK/JNK (p-SAPK/JNK), β -actin, lamin A/C, HRP-conjugated anti-mouse, anti-rabbit IgGs는 Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

본 연구에 사용된 RAW 264.7 (murine macrophage cell line)세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 10% FBS, 100 U/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 모든 세포 실험에 있어서 100 mm dish에서 80-90% 정도의 confluence로 배양된 세포를 사용하였다.

*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, Hanuidae-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 : May 9, 2023 / Revised : May 17, 2023 / Accepted : May 18, 2023



3. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 세포를 24 well plates에 2×10^5 cells/well로 분주하여 FBS가 포함된 DMEM 배지에서 12시간 배양하였다. FBS가 포함되지 않은 배지에서 농도별로 SST를 처리하여 24시간 배양한 후, MTT (0.5 mg/mL)용액을 넣고 추가적으로 4시간 배양하였다. 배지를 제거하고 생성된 formazan을 DMSO로 용해시켜 automated microplate reader (Infinite M200 Pro Nano, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

또한 LPS (2 μ g/mL)와 SST가 처리된 세포의 생존율도 30-300 μ g/mL의 SST를 1시간 동안 전처리하고 LPS를 처리하여 18시간 배양한 후, 동일한 방법으로 구하였다. 세포 생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [cell viability (%) = $100 \times (\text{absorbance of treated cell}) / (\text{absorbance of control cell})$]

4. NO 생성량 측정

LPS (2 μ g/mL)처치에 의해 Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. 30-300 μ g/mL의 SST를 1시간 전처리한 후, LPS를 18시간 동안 처리하여 세포 배양액 50 μ L에 동량의 Griess reagent를 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 뒤 automated microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 control cell에 대한 비율로 나타내었다.

5. 염증성 cytokine 측정

염증성 cytokine 측정을 위해 24 well plate에 세포를 분주하고 농도별로 SST를 전처리한 후, 1시간 뒤에 LPS (2 μ g/mL)를 처리하고 이후 18시간 배양하였다. 세포의 배양액을 회수하여 염증성 cytokine인 interleukin (IL)-1 β , IL-6와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 ELISA kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 먼저, ELISA kit에 세포배양액을 cytokine의 종류에 따라 50-100 μ L를 넣고, 바로 Biotin-conjugate를 100 μ L 처리하여 cytokine의 종류에 따라 30분 또는 2시간 반응시킨 후 washing solution으로 3회 세척하였다. 이후 streptavidin-horseradish peroxidase를 100 μ L 처리하고 1시간 반응시킨 후 역시 washing solution으로 3회 세척하였다. 이후 substrate solution 100 μ L를 추가하

여 최종반응을 완료한 후 automated microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 cytokine의 용량은 표준품을 이용한 표준곡선을 도출하여 최종적으로 ng/mL로 표시하였다.

6. 전세포 추출액, 핵 분획의 제조 및 immunoblot 분석

전세포 단백질 추출액 (whole cell lysates)은 6-well plate에 배양하여 처치가 완료된 Raw 264.7 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후, protease 및 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)이 포함된 radioimmunoprecipitation assay buffer를 이용하여 4°C에서 10분마다 교반하며 40분간 반응시켜 용해한 뒤, $15,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액으로 사용하였다.

핵 분획 (nuclear fraction)은 처치가 완료된 세포를 수거하여 제조사의 방법에 따라 NER-PER™ Nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 핵 분획을 포함하고 있는 상등액을 얻었다. Bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 함량을 정량하였다. 이후 immunoblot 분석을 위해 동량의 단백질을 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동을 통해 분리한 후, NC membrane으로 전이시켰다. 이 membrane을 5% skim milk로 상온에서 2시간 blocking한 후, 1차 항체와 4°C에서 12시간 이상 반응시켰다. Horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 상온에서 반응시켜 enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Amersham, UK)와 image analyzing system (Imager 600, Amersham Biosciences)와 Image J software (NIH; <http://imagej.nih.gov/ij>)을 이용하여 각 단백질 발현 정도를 분석하였다.

7. 통계분석

모든 실험 결과는 SPSS version 27.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였으며 mean \pm standard deviation (S.D.)로 나타내었다. 그룹 간의 통계적 유의성은 one way analysis of variance를 이용하여 검정하였으며, Tukey HSD test 또는 Dunnett T3 test를 수행하여 사후검정을 실시하였

다. 통계적 유의한 차이는 유의수준이 $P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$ 인 경우를 기준으로 판단하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. SST의 NO 생성에 대한 억제 효능

먼저 SST의 세포독성을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 30-1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 SST를 단독으로 24시간 동안 처치한 후 MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 확인하였다. 무처리 control군은 $100 \pm 8.02\%$ 로 SST 30 $\mu\text{g/mL}$ ($97.80 \pm 10.31\%$), 100 $\mu\text{g/mL}$ ($96.61 \pm 6.53\%$), 300 $\mu\text{g/mL}$ ($100.81 \pm 5.70\%$), 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($103.45 \pm 5.11\%$) 농도의 처치군에서 유의한 세포독성을 나타내지 않았으므로, 본 실험에는 고농도 1000 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외하고 30, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 SST를 사용하였다 (Figure 1A). LPS와 SST 동시 처치된

세포의 생존율의 경우, LPS 단독 처치군에서 무처리 control군 대비 $56.15 \pm 1.55\%$ 로 유의하게 감소하였지만, 30-300 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 SST 전처치군에서는 LPS에 의하여 감소한 세포 생존율을 변화시키지 않았다 (Figure 1B). LPS로 유도된 NO 생성에 대한 SST의 억제 효능을 확인하기 위해 30, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 SST를 1시간 전처치한 세포에 LPS를 추가적으로 18시간 처치하여 회수한 세포 배양액을 Griess reagent와 반응시켜 배양액 내 NO 생성량을 측정하였다. 무처리 control군 대비 LPS 처치군에서는 2.84 \pm 0.13배로 NO 생성이 증가했으나, SST 300 $\mu\text{g/mL}$ 처치군에서는 1.82 \pm 0.14배로 LPS 단독처치군과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Figure 1C). 이러한 결과를 통하여 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 SST는 RAW 264.7 세포의 독성과 무관하게 LPS에 의하여 증가한 NO 생성에 대해 억제 효과가 있음을 나타낸다.

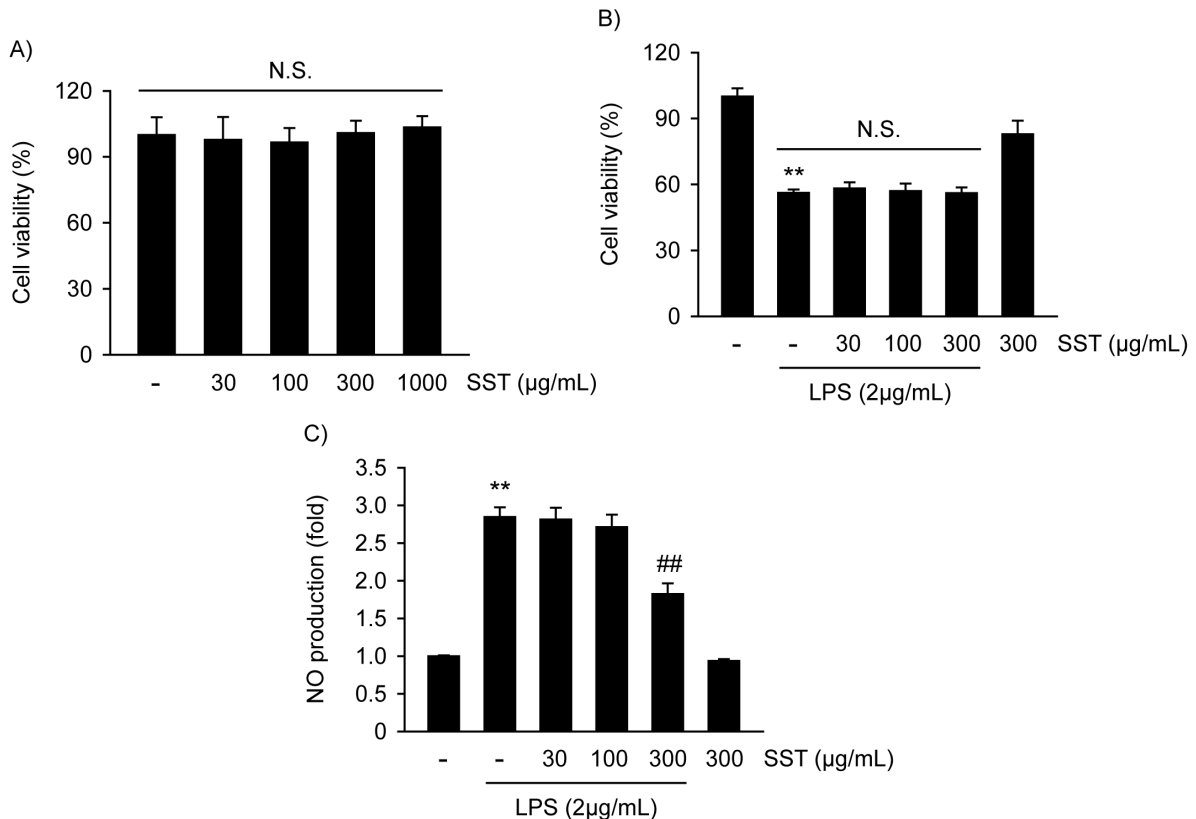


Fig. 1. The inhibitory effects of SST on LPS-mediated NO production.

RAW 264.7 cells were treated with 30-1000 $\mu\text{g/mL}$ SST for 24 hours, and cell viability was measured to investigate the cytotoxicity of SST (A). Cell viability of SST plus LPS (2 $\mu\text{g/mL}$) was measured by MTT assay (B). To measure NO production, Griess reagent assay was performed with the culture media

of cells treated with SST 30–300 μ g/mL, (1 h) and LPS (2 μ g/mL, 18 h) (C). Values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments for each condition (significant compared to the untreated control, $**P < 0.01$; significant as compared to LPS alone, $##P < 0.01$; N.S., not significant).

2. SST의 iNOS 발현 억제 효능

iNOS는 면역 활성화 및 염증의 핵심 매개 물질인 NO의 생성에 관여하는 효소이다¹⁴⁾. 그러므로 SST의 NO 생성 억제가 iNOS 단백질의 조절과 관련되는지 확인하기 위해 immunoblot 분석을 수행하였다. RAW

264.7 세포에서 LPS 처치는 iNOS의 발현을 무처리 control군 대비 15.40 ± 2.05 배로 유의하게 증가시켰으나, SST 300 μ g/mL의 전처치는 증가된 iNOS의 발현을 8.79 ± 0.92 배로 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Figure 2A, B).

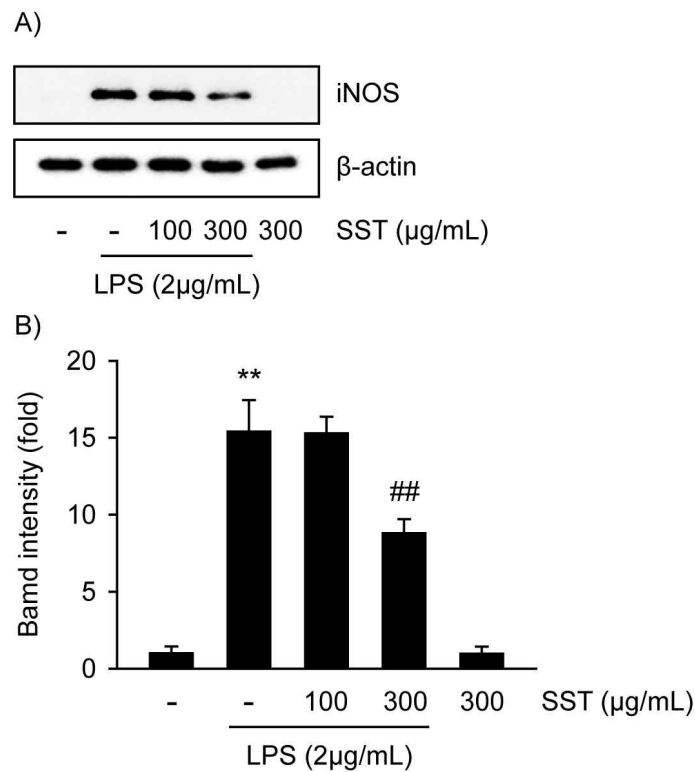


Fig. 2. The inhibitory effects of SST on LPS-mediated iNOS expressions.

To confirm the expression of the iNOS protein, RAW 264.7 cells were pretreated with 100, 300 μ g/mL of SST of 1 h before LPS (2 μ g/mL, 18 h) treatment. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE and β -actin was used as an immunoblot loading control (A). The iNOS intensity was determined by scanning densitometry (B). Values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments for each condition (significant compared to the untreated control, $**P < 0.01$; significant as compared to LPS alone, $##P < 0.01$).

3. SST의 염증성 cytokine 생성 억제 효능

SST가 LPS로 유도된 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타내는지 조사하였다. Raw 264.7 세포에 100, 300 μ g/mL SST를 1시간 전처리하고 LPS를 18시간 처리한 세포 배양액 내 염증성 cytokine 수준을 ELISA kit를 이용하

여 측정된 결과, 무처리 control군 대비 LPS 단독 처리군에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 모두 유의하게 증가하였다. 그러나 SST 100, 300 μ g/mL 전처리는 LPS에 의해 증가한 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Figure 3A, B, C).

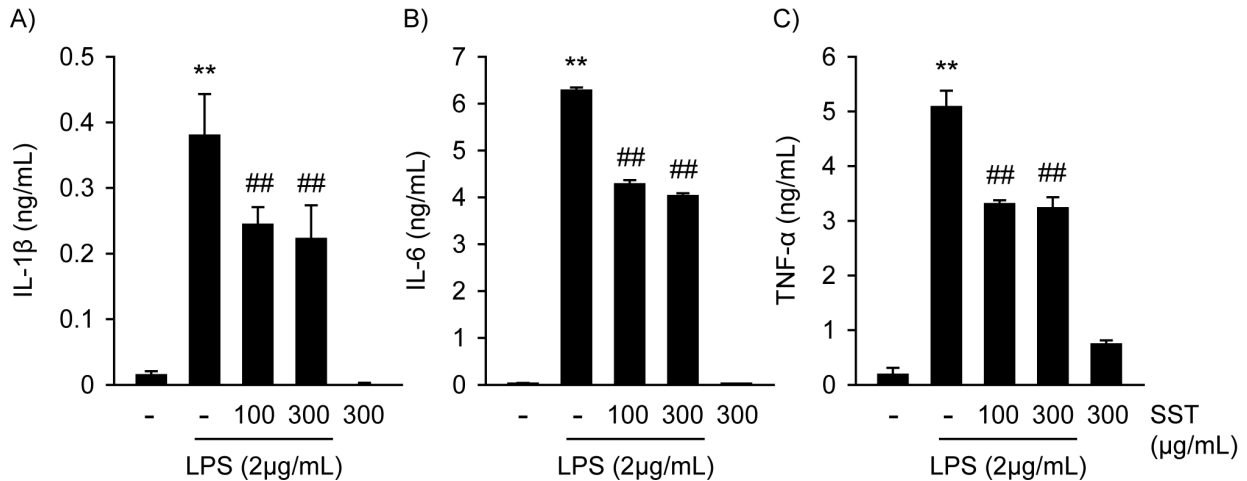


Fig. 3. The inhibitory effects of SST on LPS-mediated pro-inflammatory cytokines production.

Raw 264.7 cells were pretreated with 100, 300 μ g/mL of SST for 1 h and further incubated with LPS (2 μ g/mL) for 18 h. The concentrations of IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) in culture media were evaluated by ELISA kits as described in materials and methods part. Values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments for each condition (significant compared to the untreated control, ** $P < 0.01$; significant as compared to LPS alone, ## $P < 0.01$).

4. SST의 p-I κ B α 및 NF- κ B 발현 억제 효능

NF- κ B는 면역체계조절 및 염증 반응조절 등에 관련된 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자이다. NF- κ B는 I κ B와 결합하여 세포질 내에서 비활성 상태로 존재하지만, 외부에 의해 세포가 자극되면 NF- κ B는 I κ B의 인산화 과정을 통해 분리된다. I κ B가 분리된 NF- κ B는 핵막을 통과해 핵 내로 이동하여 DNA와 결합, 유전자 전사를 조절한다¹⁵⁾. 따라서 SST의 염증 억제 효과가 NF- κ B 신호 경로에 관여되는지 확인하기 위하

여 immunoblot 분석을 통해 세포질 내에서 I κ B α 와 p-I κ B α 및 핵 내에서 NF- κ B 발현을 관찰하였다. I κ B α 는 LPS 처리에 의해 감소하였으나 300 μ g/mL의 SST 전처리군에서는 발현 정도가 증가하였다 (Figure 4A). 이와 더불어 SST 300 μ g/mL 처리는 LPS로 인해 증가된 p-I κ B α 발현을 감소시켰다 (Figure 4B). 또한 SST는 LPS 처리에 의해 증가된 NF- κ B 발현을 감소시켰다 (Figure 4C).

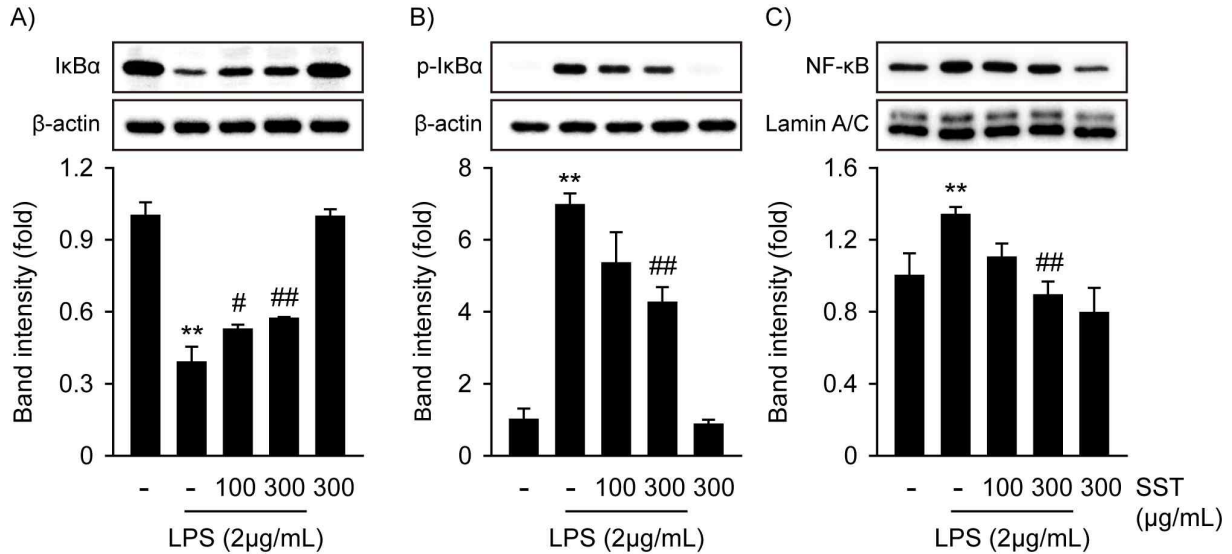


Fig. 4. The inhibitory effects of SST on LPS-mediated p-I κ B α and NF- κ B expressions.

RAW 264.7 cells were pretreated with 100, 300 μ g/mL of SST of 1 h before LPS (2 μ g/mL) treatment. The levels of (A) I κ B α (15min in the cytoplasmic fraction), (B) p-I κ B α (30min in the cytoplasmic fraction) and (C) NF- κ B (30min in the nuclear fraction) were monitored by scanning densitometry. β -actin and lamin A/C were used as an immunoblot loading controls. Values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments for each condition (significant compared to the untreated control, ** $P < 0.01$; significant as compared to LPS alone, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$).

5. SST의 MAPK 인산화 저해 효능

Mitogen-activated protein kinases (MAPK)는 광범위한 생리학적 과정을 조절하는 중요한 역할을 하며, p44/42, p38, JNK 신호 전달 경로가 존재한다¹⁶⁾. 본 연구에서는 SST에 의한 항염증 효과가 MAPK 발현 조절과 관련 있는지 조사하기 위해 p44/42, p38 및 JNK 단백질 발현을 immunoblot 분석하였다 (Figure 5A).

LPS 단독 처치군에서 p44/42, p38 및 JNK의 인산화가 무처리 control군 대비 각각 4.12 ± 0.32 배, 2.36 ± 0.29 배, 6.99 ± 0.52 배 증가하였으나 300 μ g/mL의 SST 전처치로 인해 증가한 MAPK의 인산화를 모두 순서대로 3.33 ± 0.28 배, 1.56 ± 0.44 배, 5.66 ± 0.21 배 유의하게 감소시켰다 (Figure 5B).

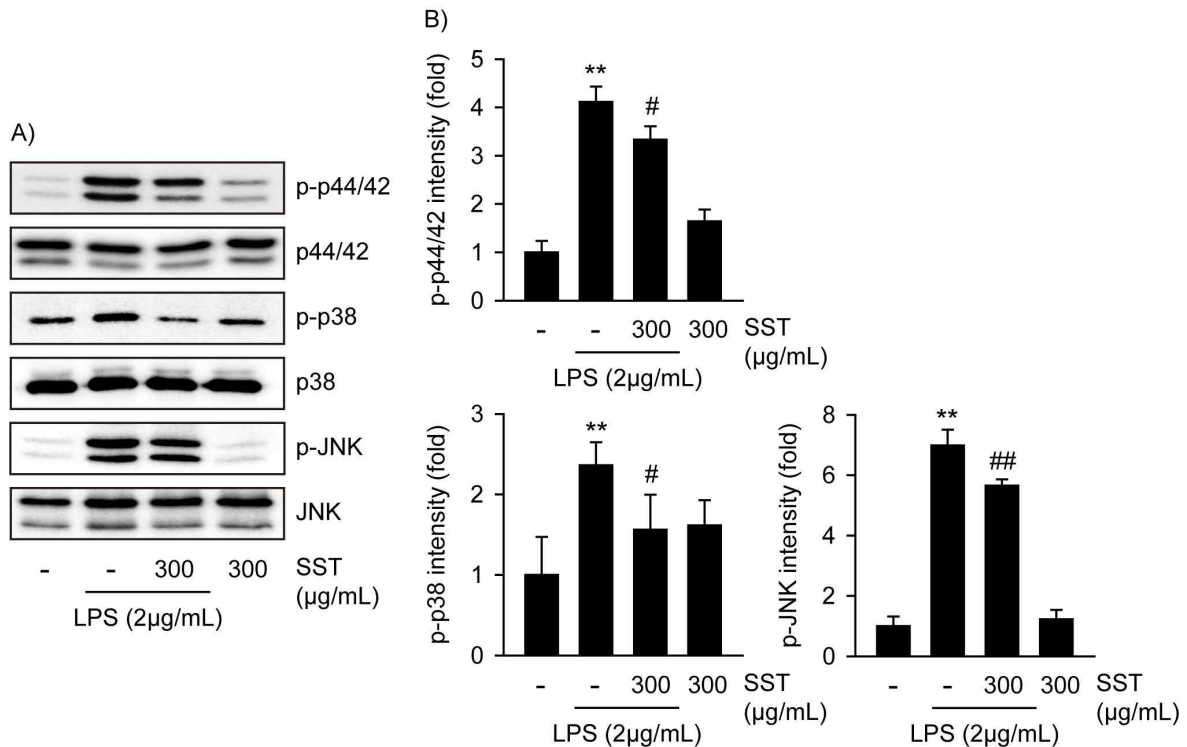


Fig. 5. The inhibitory effects of SST on LPS-mediated phosphorylation of MAPK.

The cells were pretreated with 300 µg/mL of SST for 1 h and followed by incubated with LPS (2 µg/mL) for 1 h. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE. The levels of MAPK expression were determined using specific p-p44/42, p-p38 and p-JNK antibodies. β-actin was used as an immunoblot loading control (A). The phosphorylation of MAPK intensity was determined by scanning densitometry (B). Values represent the mean ± S.D. of three independent experiments for each condition (significant compared to the untreated control, ** $P < 0.01$; significant as compared to LPS alone, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$).

IV. 고찰

본 연구에서 사용된 柴胡疏肝湯은 한방건강보험요양 급여 한약 제제 중 하나인 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산)으로, <方藥合編> 增補方에 柴胡疎肝散으로 기재되어 있다¹⁾.

柴胡疏肝湯은 肝炎, 慢性胃炎, 肋間神經痛, 타박으로 인한 脇痛, 肋膜炎, 肋間神經痛症, 憂鬱症 등에도 辨證에 따라 사용이 가능하다²⁾. 柴胡疏肝湯에 대한 연구로는 알콜성 근위축³⁾, 간기능회복⁴⁾, 담석증⁵⁾, 우울증^{6,7)} 스트레스⁸⁾ 소화불량⁹⁾ 癲癇¹⁰⁾ 등에 대한 연구는 보고되었으나, 아직 항염증작용의 분자적 기전에 대한 연구는 전문한 편이다. 이에 본 연구에서는 LPS로 활성화된

murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell에서 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산)이 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하고, 항염증 효능을 규명하고자 하였다. 대식세포는 단핵구가 혈관 벽을 통과하여 조직에서 전환된 것으로, 중추신경계에서는 microglial cell, 간에서는 kupffer cell, 폐에서는 alveolar macrophage, 뼈에서는 osteoclast가 되며¹⁷⁾, 인체 내 염증반응에서 NO, PGE2, 염증성 cytokine과 같은 염증매개물질의 생성에 관여하고 조절한다¹²⁾.

NO는 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 산화되어 L-citrulline과 함께 생성된다¹⁸⁾. NOS 중에 iNOS는 대식세포, 간세포, 성상세포 등에서 LPS, TNF-α, IL-1과 같은 특정 자극에 의해 전사되어 발현되며, 많은 양의 NO를 장시간 생성한다¹⁹⁾. 생체에서



지속적인 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 손상 및 염증 유도로 인한 조직의 손상을 초래할 수 있다²⁰.

먼저 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산; SST)의 단독 세포독성은 RAW 264.7 세포에 30-1000 μ g/mL을 24시간 처치한 후 세포 생존율을 통해 확인하였다. 실험에 사용된 30-1000 μ g/mL의 농도에서 SST는 유의한 세포독성을 나타내지 않았고, 또한 LPS+SST의 세포독성은 LPS 단독 처치군에 비교하여 30-300 μ g/mL에서 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 세포독성이 없는 30-300 μ g/mL에서 300 μ g/mL의 SST는 LPS에 의하여 증가한 NO의 생성을 유의하게 억제하였다. SST 300 μ g/mL에서의 NO 생성 억제를 확인하고, iNOS 단백질의 발현을 평가한 결과, SST 300 μ g/mL의 전 처치는 LPS에 의해 증가된 iNOS의 발현을 57% (8.79/15.4)수준으로 유의하게 감소시켰다. 위의 결과는 SST는 SST 단독 또는 SST+LPS에서 어떠한 세포독성도 없이 iNOS의 발현을 억제하고, 이로 말미암아 NO를 억제함을 나타낸다.

이후 LPS로 인해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등과 같은 염증성 cytokine의 생성을 SST가 억제하여 항염증 효능을 나타내는지 조사하였다. IL-1은 주로 macrophages, monocytes, fibroblasts 및 endothelial cell에 의해 분비되는 것으로, IL-1에는 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 가지 주요 형태가 있으며, 이들의 서열 상동성은 25%에 불과하지만, 모두 IL-1R에 결합하여 유사한 생물학적 기능을 나타낸다. 이들은 발열, 면역 반응, 염증 반응, 손상 촉진, 상처 치유 및 반흔의 형성에도 관여한다. IL-1 α 는 IL-1 β 와는 달리 핵으로 전위되어 IL-1 β 와 관련된 염증 및 섬유화 경로를 돕는 전사활성화인자로 작용 될 수도 있다^{17,21}. 한편 IL-6는 fibroblasts, keratinocytes, mesangial cells, vascular endothelial cells, mast cells, macrophages, dendritic cells, T cells, B cells 등 다양한 cell에서 분비되며, IL-6의 dysregulation은 염증, 자가면역질환, 종양 등을 유도하기도 한다²². TNF는 자가면역질환에 결정적으로 관여하는 전염증성 cytokine으로, 처음에는 solid tumour의 necrosis를 유도하는 내인성 인자로 인식되었으나, 점차 immunopathogenesis에 관여하는 pro-inflammatory cytokine으로서의 중요성이 증가되었다. 간에서 TNF는 hepatocyte의 apoptosis 및 necroptosis, 간염, 자가면역, hepatocellular carcinoma로의 진행을 유도하는 것으로 알려져 있다²³. 본 연구에서는 LPS로

인하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성이 유의성 있게 증가하였으며, 100, 300 μ g/mL의 SST는 증가된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 모두 유의하게 감소시켰다. 따라서 SST에 의한 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 저해함으로써 항염증 효능을 나타내는 것임을 확인할 수 있었다.

NF- κ B는 면역체계조절 및 염증 반응조절 등에 관련된 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자이다. NF- κ B는 1986년 Ranjan Sen과 David Baltimore에 의해 처음 발견되었으며, 이름처럼 활성화된 B 세포의 immunoglobulin κ light chain enhancer에 결합하여 세포 주기, 분화, 활성화 및 세포자멸사에 관여하는 여러 표적 유전자의 유도를 조절한다. NF- κ B는 RelA(p65), RelB, c-Rel, p105 및 p100의 5가지 NF- κ B 하위 유형이 있으며, 특히 p65와 p50은 NF- κ B 신호 전달 경로의 일반적인 (canonical) 활성화에 관여하며, 선천 면역을 조절한다. 그러나 NF- κ B의 과도하고 통제되지 않은 활성화는 염증성 병변의 발생 및 진행을 유발한다²⁴. NF- κ B는 I κ B와 결합하여 세포질 내에서 비활성 상태로 존재하지만, 외부에 의해 세포가 자극되면 NF- κ B는 I κ B의 인산화 과정을 통해 분리된다. I κ B가 분리된 NF- κ B는 핵막을 통과해 핵 내로 이동하여 다양한 염증 관련 유전자들의 전사를 촉진한다¹⁵. 따라서 NF- κ B의 활성화 및 핵 내로의 이동에 대한 조절은 항염증 연구에 있어서 중요하다. 본 연구에서는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서 I κ B α 의 발현은 감소하였으며, p-I κ B α 발현 및 핵 내의 NF- κ B의 발현은 증가하였으나, SST에 의해 I κ B α 의 발현은 유의성 있게 증가하였고, p-I κ B α 발현 및 핵 내의 NF- κ B의 발현은 유의성 있게 감소되었다. 이는 SST 처치로 인해 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B의 신호 경로를 억제할 수 있음을 나타낸다.

MAPK는 p44/42, p38, JNK 신호 전달 경로로 이루어져 있으며¹⁶, NF- κ B를 포함한 염증 관련 전사 인자들의 활성화에 관여한다²⁵. 많은 연구에서 염증 및 암 발달에서 MAPK가 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었다²⁶. 본 연구에서는 SST의 염증매개물질 생성 억제 및 NF- κ B의 활성 저해가 MAPK 신호 전달의 조절에 따른 것인지 평가하기 위하여 p44/42, p38 및 JNK 단백질 발현을 immunoblot 분석을 통해 조사하였다. LPS 단독 처치로 p44/42, p38 및 JNK의 인산화는 유의성 있게 증가하였으나, SST는 LPS에 의해 인산화된 MAPK

를 유의하게 감소시켰다. 이는 SST가 LPS에 의해 활성화되는 MAPK 신호전달을 조절하여 항염증 효능을 나타냄을 의미한다.

이러한 SST의 연구결과는 본 연구실에서 기 보고한 淸上防風湯의 열수추출물²⁷⁾ 및 桑葉의 EtOH추출물²⁸⁾이 LPS에 의해 활성화된 염증반응을 억제하는 기전과 매우 유사한 결과를 나타내었다.

본 연구는 임상적으로 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산)이 한방건강보충요양급역 한약 제제 중 하나로서 접근성이 높고 또한 肝炎, 慢性胃炎, 肋膜炎 등에 활용될 수 있음²⁾에 근거하여 *in vitro* 수준에서 항염증 효능과 그 기전을 제시하였다. 그러나 본 연구는 柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산)의 구성 약물 중, 각각의 구성 약재 또는 기 항염증 효능이 알려진 芍藥甘草湯²⁹⁾, 四逆散 중 특별히 뛰어난 항염증 효능이 있는 구성성분에 의해 항염증 효능을 나타내었는지는 연구되지 않았고, 또한 혼합단미엑스산의 柴胡疏肝湯과 복합추출물의 柴胡疏肝湯의 대비적 항염증 효능은 연구되지 않았으므로, 향후 추가적 연구를 통해 활용도를 제고할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

柴胡疏肝湯(혼합단미엑스산; SST)의 염증억제효능을 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서 NO의 생성량, iNOS의 발현 및 염증성 cytokine의 생성 억제 기전을 살펴본바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SST는 세포독성을 나타내지 않았고, LPS에 의해 증가된 NO를 유의성있게 억제하였다.
2. LPS는 iNOS 단백질의 발현을 유의성있게 증가시켰으며, SST는 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 iNOS의 발현을 유의성있게 감소시켰다.
3. TNF- α , IL-1 β , IL-6는 LPS에 의해 유의성있게 증가하였으며, SST는 100과 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6를 유의성있게 감소시켰다.
4. LPS는 NF- κB 및 MAPK를 유의성있게 활성화시켰으며, 이들은 모두 SST에 의해 유의성있게 활성이 억제되었다.

Acknowledgement

This study was supported by the National Research

Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No.2018R1A5A2025272)

References

1. Hwang DY. Bangyakhappyeon. Seoul:Namsandang, 1985:324.
2. Herbal Formula Textbook Compilation Committee. Herbal Formula Science in Korean Medicine (Special). Paju:Koonja Publisher, 2023:745-747, 1313.
3. Kim BH. The Effects of Shihosogan-san on Alcohol-induced Muscle Atrophy in Rats. Herbal Formula Science, 2016;24(4):311-321.
4. Koo LB, Choi DY. Experimental Study on the Recovery Shihosogan-San on the Injury of Liver Rat Induced by Stress. J of Oriental Medical Pathology, 1988;3:63-70.
5. Ban SH, Choi SH, Ahn KS. The Effect of Sihosogansan, Sihosogansan and Desmodi Herba and Sihosogansan and Curcumac Tuber on the Cholecytolithiasis induced with Gallstone-trigger Diet in Mice. J of Oriental Medical Pathology, 1991;6:145-157.
6. Jung MH, Lee TH. Anti-stress effects of Sihosogansan in the passive avoidance test and the forced swimming test. Kor. J. Herbology, 2007; 22(2):127-135.
7. Li Z, Zheng HL. Observation of Therapeutic Effect on Depression Treated by Chaihu Shugan Decoction. Journal of Practical Traditional Chinese Medicine, 2009;25(10):652-653.
8. An SJ, Lee TH. Effect of Chaihushugansan and Chaihu yigantang on the change of Monoamine Contents in the Hypothalamus of Mice induced by the Immobilization Stress. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription, 2003;11(1):99-114.
9. Tan ZH, Yang B, Hu HS, Xie LH, Duan JL. Clinical Observation of Chaihu Shugan Decoction in Treating Functional Dyspepsia. Proceeding of Clinical Medicine, 2010;19(1):41-42.
10. Lu L, Diao LM, Li H, Liao XQ. Research status of Chaihu Shugan Decoction in treating



- epilepsy. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-cerebrovascular Disease*. 2021;19(19): 3351-3354.
11. Nathan C. Points of control on inflammation. *Nature*. 2002;420:846-852.
 12. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol*. 1990;144:1425-1431.
 13. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol*. 2007;8:1-17.
 14. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal research reviews*, 2020; 40(1):158-189.
 15. Solt LA, MAY MJ. The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling. *Immunologic research*, 2008;42:3-18.
 16. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298(5600): 1911-1912.
 17. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman. *Cellular and Molecular Immunology* (5th Ed). Saunders: Philadelphia, 2003;25, 243-288, 493, 507.
 18. 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.
 19. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*. 2000;47:6-9.
 20. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69:625-635.
 21. Wang H, Wu J, Ma L, Bai Y, Liu J. The role of interleukin-1 family in fibrotic diseases. *Cytokine*. 2023;165:156161.
 22. Aliyu M, Zohora FT, Anka AU, Ali K, Maleknia S, Saffarioun M, Azizi G. Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. *Int Immunopharmacol*. 2022;111:109130.
 23. Tiegs G, Horst AK. TNF in the liver: targeting a central player in inflammation. *Semin Immunopathol*. 2022;44(4):445-459.
 24. Jang WY, Hwang JY, Cho JY. Ginsenosides from Panax ginseng as Key Modulators of NF- κ B Signaling Are Powerful Anti-Inflammatory and Anticancer Agents. *Int. J. Mol. Sci*. 2023; 24:6119.
 25. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298: 1911-1912.
 26. Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell*. 2010;1(3):218-226.
 27. Kim SY, Park SM, Hwangbo M, Lee JR, Byun SH, Ku SK, Cho IJ, Kim SC, Jee SY, Park SJ. Cheongsangbangpung-tang ameliorated the acute inflammatory response via the inhibition of NF- κ B activation and MAPK phosphorylation. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):46.
 28. Park SM, Kim SC, Byun SH, Kim YW, Chi IJ. Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide - activated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology*. 2012;27(3):31-38.
 29. Kim BW. Anti-inflammatory Effect of Jakyakgamcho-tang. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2010;31(2) 365-371.