

桂枝去芍藥加附子湯의 항염증 효과에 대한 연구

정재민* · 임승규* · 최송[†] · 김현지[†] · 최진봉*
동신대학교 한의과대학 한방재활의학교실*, 한방내과학교실[†]

A Study on the Anti-Inflammatory Effect of *Gyejigeojakyakgabuja-tang*

Jae-Min Jeong, K.M.D.*, Seung-Kyu Im, K.M.D.*, Song Choi, K.M.D.[†], Hyun-Ji Kim, K.M.D.[†],
Jin-Bong Choi, K.M.D.*

Departments of Korean Medicine Rehabilitation*, Internal Medicine[†], College of Korean Medicine, Dongshin University

RECEIVED March 18, 2024
REVISED May 7, 2024
ACCEPTED May 20, 2024

CORRESPONDING TO

Jin-Bong Choi, Department of
Korean Medicine Rehabilitation,
College of Korean Medicine,
Dongshin University, 14 Gyooyuk-gil,
Naju 58326, Korea

TEL (061) 338-7815
FAX (061) 338-7888
E-mail jy1907@gmail.com

Copyright © 2024 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study was conducted in *in vitro* environments to investigate the anti-inflammatory effect and expression mechanism of *Gyejigeojakyakgabuja-tang* (GJBT).

Methods In the experiment, an inflammatory response was induced with lipopolysaccharide in macrophage RAW 264.7 cells treated with GJBT, and the production of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), and cytokines were measured, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were measured. The intracellular gene and protein expression levels of cytokines were measured.

Results *In vitro*, GJBT significantly reduced intracellular NO, PGE₂, and cytokine production in a concentration-dependent manner. The intracellular iNOS, COX-2, and Cytokine gene expression levels were significantly decreased, and the intracellular iNOS, COX-2, and cytokine protein expression levels were significantly decreased in a concentration-dependent manner.

Conclusions These results show that GJBT has an anti-inflammatory effect. (*J Korean Med Rehabil* 2024;34(3):1-11)

Key words *Gyejigeojakyakgabuja-tang*, Anti-inflammatory agents, Herbal medicine

서론»»»»

생체는 전염성 병원균과 같은 외부의 침입자나 생체 내 손상된 조직을 제거하기 위해 염증반응을 이용 한다¹⁾. 염증반응은 내독소로 알려진 lipopolysaccharides (LPS)가 toll-like receptor 4에 결합하면서 시작되며²⁾, 염증반응에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂ (PGE₂)등의 염증 인자들이 관여된다³⁾. 그리고, COX-2와 PGE₂는 nuclear factor-κB (NF-κB)를 활성화하면서, 조직 내에 과량의

NO와 PGE₂를 생성하여 염증을 일으키게 된다. 그러나, 이러한 염증반응이 지나치게 오랜 기간 지속하거나, 반복된 염증반응의 발현은 NO와 PGE₂의 과잉생산을 가져오게 되고, 이들 NO와 PGE₂에 의해 전 염증성 cytokine의 생성을 유도하여 염증 주변 조직의 손상 및 중앙 조직의 생성이 유발될 수 있다⁴⁾. 비스테로이드성 소염진통제는 염증 인자의 생성을 억제하여 염증반응이 지나치게 발현되는 것을 조절하는 역할을 하지만, COX-1과 COX-2에 대해 비 선택적인 저해를 하게 됨으로써, COX-1과 관련된 위장관 부작용이 필연적으로 나타나게 되며, COX-2에 대해서만 선택적인 저해를 하는 경우 COX-1과 COX-2 생성에 관여된 전구물질이 모두

COX-1을 생성함으로써, COX-1 과발현에 의한 심혈관계 부작용이 초래되는 문제점이 있다⁵⁾. 이러한 상황에 따라 항염증 반응이 있는 생약 기원 제재에 관한 연구가 지속해서 이뤄지고 있다⁶⁾. 본 실험에서 사용된 桂枝去芍藥加附子湯 (Gyejigeojakyakgabuja-tang, GJBT)은 《傷寒論》에서 최초로 기술된 처방으로 太陽病, 下之後, 脈促胸滿者, 桂枝去芍藥湯主之, 若微惡寒者, 去芍藥方中加附子湯主之⁷⁾라고 하여, 發熱, 惡寒의 증상이 있는 신경통과 관절염에 사용할 수 있다⁸⁾. 각각의 약재별 선행연구에서 桂枝는 추출물이 iNOS 및 COX-2 활성을 감소시키고 NO와 PGE₂의 생성을 억제하는 항염 효과가 있다⁹⁾고 하였으며, 附子는 경구 투여 시 interleukin 6 (IL-6)와 tumor necrosis factor alpha (TNF-α)을 억제하는 항염 효과가 있다¹⁰⁾고 하였으며, 약침 투여 시 IL-1β와 TNF-α, IL-6, interferon gamma, immunoglobulin G, immunoglobulin M 등을 억제하는 항염 효과가 있다¹¹⁾고 하였다. 生薑은 경구 투여 시 면역세포, 특히 비장 세포의 증식과 대식세포의 활성화를 유도하여 체내 면역기능을 증강시킬 수 있다¹²⁾고 하였으며, 生薑 클로로포름 분획이 뇌 신경교세포의 활성화로 인한 뇌 염증반응을 억제해서 항염 효과만 아니라, 신경보호 효과도 있다¹³⁾고 하였다. 大棗는 피부 염증에 대한 항염 효과¹⁴⁾와 항산화 및 항암 효과¹⁵⁾가 있다고 하였다. 甘草는 혈장 내 히스타민의 생성을 유의성 있게 감소시키며 폐 조직 내 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13의 생성을 감소시켜서 allergy 반응 억제 효과¹⁶⁾가 보고된 바 있다. 각각의 한약재에 대한 항염증 효과는 확인된 바 있으나, 해당 약재들이 혼합된 상태에서의 항염 효과 및 기전에 관한 연구는 시행된 바 없었다. 본 연구에서는 GJBT가 염증반응에 어떤 유의한 효과를 나타내는지 알아보기 위해 *in vitro* 실험을 진행하였고 이와 관련하여 유의한 결과를 얻어서 보고하는 바이다.

재료 및 방법》》》》

1. 재료

1) 시료

본 연구에 사용된 桂枝去芍藥加附子湯 (GJBT)의 구성 약재는 한약재 유통업체인 (주)옵니허브에서 검수된 한약재를 구입하여 사용하였으며, 각 처방의 구성은 아래와 같다(Table 1).

2) 시약

본 연구에서 trypan blue, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였으며, ethanol과 methanol은 Merck 제품을 사용하였고 EZ-Cytox는 DoGenBio 제품을 사용하였다. Dulbecco's modified eagle's medium, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin은 Welgene 제품을 사용하였으며, nitric oxide plus detection kit, easy-spin total RNA extraction kit, acrylamide-bis solution 30%, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10X Tris-glycine-sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer, 10X transfer buffer, GangNam-STAIN prestained protein ladder, miracle-star western blot detection system, 10X Tris-buffered saline (TBS) with Tween 20은 iNtRON Biotechnology 제품을 사용하였고, accupower® cyclescript RT premix (dT20)와 DEPC-DW는 Bioneer 제품을 사용하였다.

Table 1. The Prescription of GJBT

Herbal medicine name	Scientific name	weight (g)
桂枝	<i>Cinnamomum cassia Presl</i>	6
生薑	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	6
大棗	<i>Zizyphus jujuba Miller var.</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer</i>	4
附子	<i>Aconitum carmichaeli Debeaux</i>	2
Total amount		24

2. 방법

1) 시료 추출

GJBT (48 g) 2첩 분량을 3시간 동안 1 L의 증류수를 넣고 100 °C에서 가열하여 추출하였으며, 추출물은 여과지를 사용하여 여과하였다. Rotary vacuum evaporator를 사용하여 여과된 추출물을 감압 농축하고 freeze dryer를 사용하여 농축된 추출물을 동결건조하였다. 동결건조 완료 후, 9.09 g (수득률, 18.94%)의 분말을 얻어서, -20 °C에 냉동 보관한 후 실험 당일 나누어서 증류수에 용해하여 사용하였다.

2) 세포 배양

RAW264.7 세포(생쥐 유래 대식 세포주)는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하였고, 세포 배양기에서(37 °C, 5% CO₂) fetal bovine serum가 10% 추가된 Dulbecco's modified Eagle medium 배지를 사용하여 배양하였다. 2~3일 주기로 세포의 계대 배양을 진행하였다.

3) 세포 생존율 측정

2×10⁴ cells/well로 분주한 RAW264.7 세포를 48 well plate에 24시간 동안 배양하고 GJBT를 100, 200, 400, 600 µg/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 세포의 배양이 종료된 후 EZ-Cytox 용액을 배양액 100 µl 당 10 µl씩 첨가한 후 세포 배양기에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, micro plate reader의 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

4) 세포 검체 준비

분석에 사용할 세포 검체를 준비하기 위해 RAW264.7 세포를 1×10⁵ cells/well로 6 well plate에 분주한 후 24시간 배양하고 GJBT를 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 주입한 후 LPS를 200 ng/ml 추가하여 다시 24시간 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후, 세포배양액과 세포를 분리하였으며, 분리한 검체는 초저온 냉동고(-80 °C)에 보관하면서 분석에 사용하였다.

5) NO 생성량 측정

준비한 세포배양액을 96 well plate에 200 µl씩 분주하고 N1 buffer 100 µl를 추가한 후 상온에서 10분간 반응시켰고, N2 buffer 100 µl를 추가한 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, micro plate reader의 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 LPS군에 대한 NO 생성량을 백분율로 표시하였다.

6) Cytokine 생성량 측정

준비한 세포배양액 및 동물 혈청을 분석용 kit에 동봉된 96 well plate에 100 µl씩 넣고 상온에서 2시간 반응시켰고, plate의 시약은 버리고 washing buffer를 사용하여 4회 세척하였다. 세척 후에 detection antibody를 100 µl씩 추가한 후 상온에서 2시간 동안 반응시키고 plate에 streptavidin-horseradish peroxidase 100 µl씩 추가한 후 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 pink-ONE 용액 or tetramethylbenzidine를 100 µl씩 각 well에 주입 후 15분 동안 반응시킨 후 100 µl stop solution을 추가하여 micro plate reader의 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 후 standard curve를 기준으로 생성량을 분석하였다.

7) PGE₂ 생성량 측정

준비한 세포배양액을 분석용 kit에 동봉된 96 well plate에 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 conjugate를 50 µl씩 추가하여 상온에서 2시간 반응시킨다. 그 후 plate 안의 시약은 폐기하고 washing buffer를 사용하여 3회 세척 하였다. 세척 후 substrate solution을 200 µl씩 추가하여 상온에서 30분 반응시킨 후 stop solution을 100 µl씩 추가하여 micro plate reader의 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 후 standard curve를 기준으로 생성량을 분석하였다.

8) 유전자 발현량 측정

준비된 세포에서 RNA를 total RNA prep kit를 사용하여 추출하였고, 추출한 RNA는 reverse transcription premix와 혼합한 후 polymerase chain reaction (PCR) cycler 장비를 사용하여 45 °C에서 60분간, 95 °C에서 5분 동안 반응을 시켜 cDNA를 합성하였다. real-time

PCR을 진행하여 합성된 cDNA로부터 특정 유전자를 증폭시켜 확인하였으며, cDNA와 특정 유전자에 맞는 SYBR green premix와 primer를 혼합하여 95 °C에서 2분간 반응시킨 후 62.5 °C 30초, 95 °C 5초의 과정을 40회 반복하여 특정 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량은 LPS군의 유전자 발현량을 기준으로 상대 정량 하였다.

9) 단백질 발현량 측정

준비된 세포에 radio-immunoprecipitation assay buffer (protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II, III 포함)를 넣어 단백질을 추출하였다. Bicinchoninic acid protein assay kit를 이용하여 추출한 단백질을 정량하였고, sample loading buffer와 섞어 준비하였다(95 °C, 5분간 반응). 10 % acrylamide gel을 사용하여 준비한 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis한 후 크기별로 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane에 이동시킨 후 3% bovine serum albumin에 담가 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 단백질은 TBS-T buffer를 이용하여 세척한 후 primary antibody를 넣어 반응(4 °C에서 16시간)시킨 후 다시 3회 세척하여 secondary antibody를 넣어 반응(상온에서 1시간)시켰다. 이후 다시 세척하여 ECL solution으로 단백질을 발색시켰다. 발색시킨 단백질의 단백질 발현량은 chemidoc fusion FX으로 분석하였다.

10) 통계처리

연구 결과는 mean±standard deviation으로 나타내었으며, SPSS 21.0 (IBM Corp.)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 정상군과 LPS 유발군간 비교는 independent sample t-test를 수행하였으며, LPS 유발군과 농도를 달리한 GJBT 투여군 간의 비교는 analysis of variance (ANOVA)를 수행하였다. ANOVA 결과에 따라, tukey's HSD test를 통해 사후검정을 시행하였다. 통계분석결과 는 p-value 0.05, 0.01, 0.001로 나누어 표기하였다.

결과»»»»

1. 세포 생존율

세포 생존율의 측정 결과, GJBT는 400 µg/ml 이하의 농도에서는 세포에 대한 독성이 나타나지 않았고, 600 µg/ml 이상의 농도에서 세포 독성을 확인하여 이후 전체 실험에서는 400 µg/ml 농도까지 진행하였다(Fig. 1).

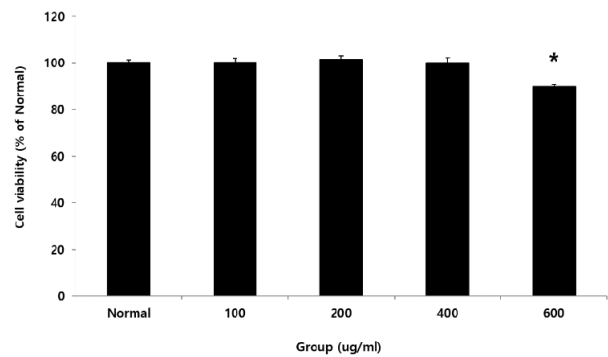


Fig. 1. Cell viability of GJBT in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). Normal: non GJBT-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400, 600: GJBT (100, 200, 400, 600 µg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by ANOVA and tukey's HSD test.

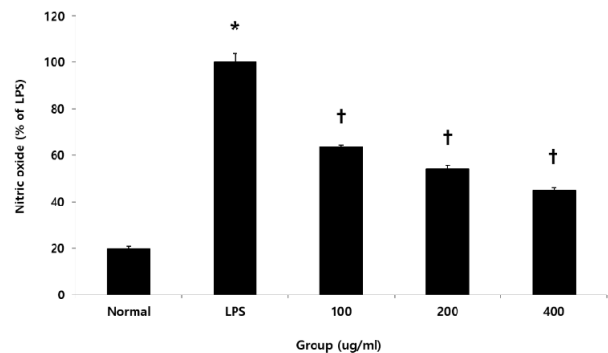


Fig. 2. Effect of GJBT on NO level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, NO: nitric oxide, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

2. 세포 내 NO 및 PGE₂ 생성량

세포 내 NO 및 PGE₂ 생성량을 측정한 결과, NO는 GJBT의 100 μg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고(Fig. 2), PGE₂는 GJBT의 200 μg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

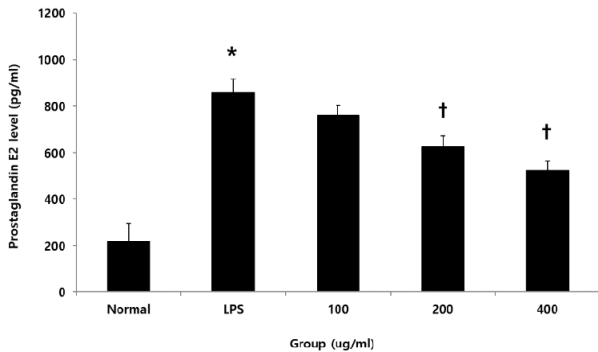


Fig. 3. Effect of GJBT on PGE₂ level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, PGE₂: prostaglandin E2, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

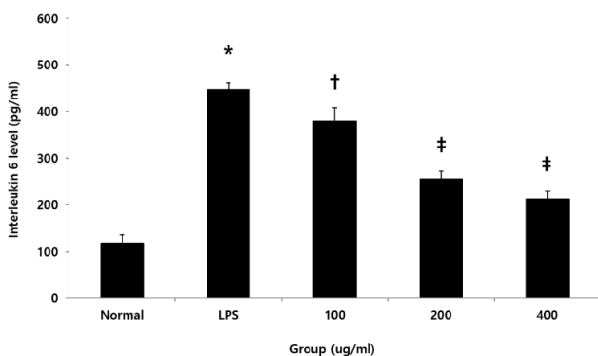


Fig. 5. Effect of GJBT on IL-6 level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, IL-6: interleukin 6, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.05 vs LPS, ‡p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

3. 세포 내 Cytokine 생성량

1) IL-1β, IL-6, TNF-α

세포 내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량을 측정한 결과, IL-1β, TNF-α는 GJBT의 200 μg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고 IL-6은

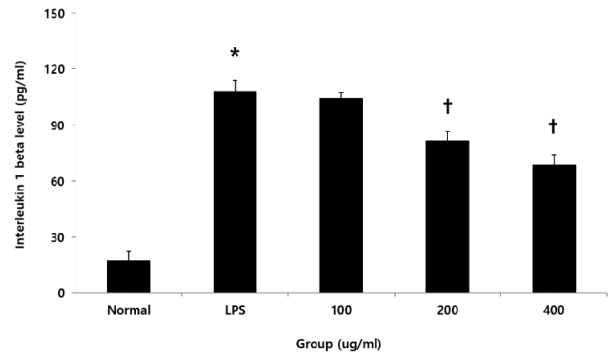


Fig. 4. Effect of GJBT on IL-1β level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, IL-1β: interleukin-1 beta, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

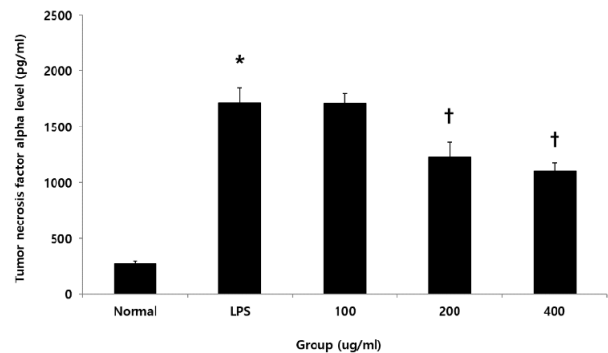


Fig. 6. Effect of GJBT on TNF-α level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, TNF-α: tumor necrosis factor-α, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

GJBT의 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Figs. 4-6).

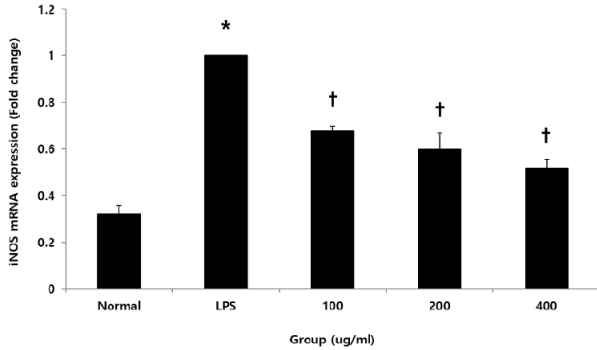


Fig. 7. Effect of GJBT on iNOS mRNA expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, iNOS: inducible nitric oxide synthase, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. * $p<0.01$ vs Normal compared to normal by t-test, † $p<0.01$ vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

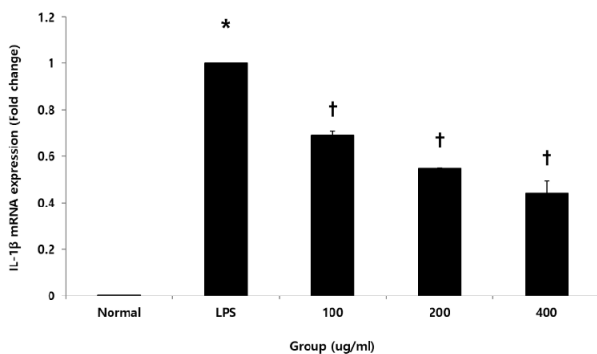


Fig. 9. Effect of GJBT on IL-1 β mRNA expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, IL-1 β : interleukin-1 beta, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. * $p<0.01$ vs Normal compared to normal by t-test, † $p<0.01$ vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

4. 세포 내 유전자 발현량

1) iNOS, COX-2

세포 내 iNOS, COX-2 유전자 발현량을 측정한 결과, GJBT는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로

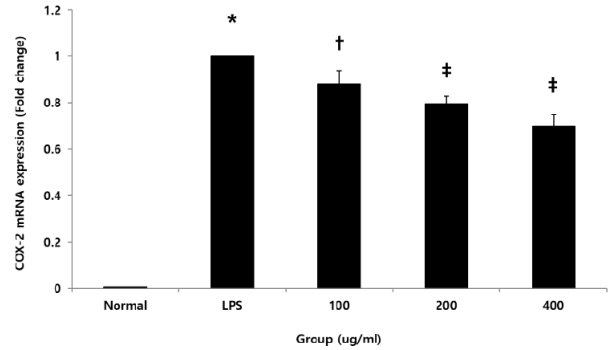


Fig. 8. Effect of GJBT on COX-2 mRNA expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, COX-2: cyclooxygenase-2, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. * $p<0.01$ vs Normal compared to normal by t-test, † $p<0.05$ vs LPS, ‡ $p<0.01$ vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

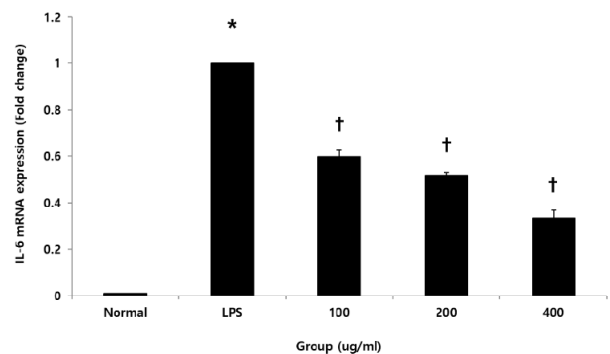


Fig. 10. Effect of GJBT on IL-6 mRNA expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, IL-6: interleukin 6, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. * $p<0.01$ vs Normal compared to normal by t-test, † $p<0.01$ vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Figs. 7, 8).

2) IL-1 β , IL-6, TNF- α

세포 내 IL-1 β , IL-6, TNF- α 유전자 발현량을 측정함

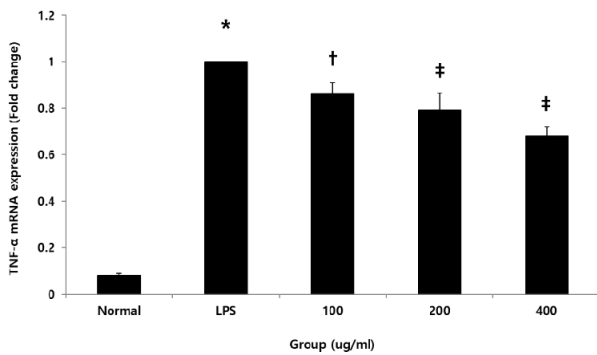


Fig. 11. Effect of GJBT on TNF- α mRNA expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μ g/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, TNF- α : tumor necrosis factor- α , LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.05 vs LPS, ‡p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

결과, GJBT는 100 μ g/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Figs. 9~11).

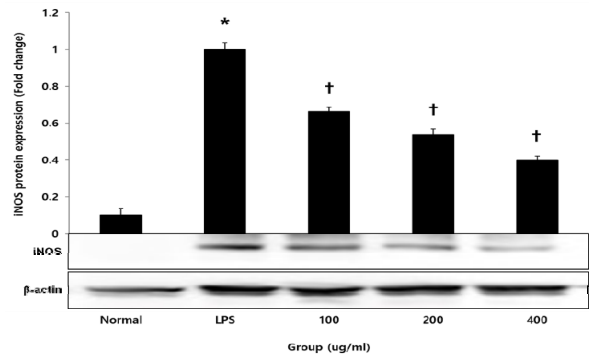


Fig. 12. Effect of GJBT on iNOS protein expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). The band images were obtained using western blot analysis, and β -actin was used as a loading control. Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μ g/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, iNOS: inducible nitric oxide synthase, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

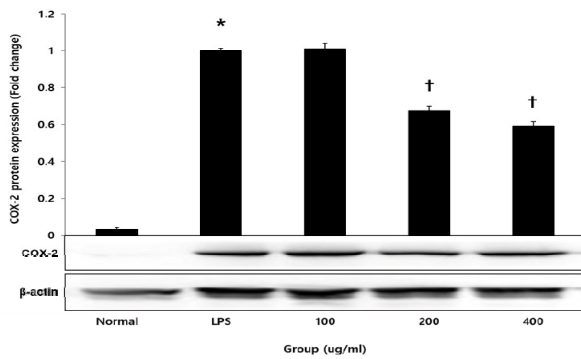


Fig. 13. Effect of GJBT on COX-2 protein expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). The band images were obtained using western blot analysis, and β -actin was used as a loading control. Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μ g/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, COX-2: cyclooxygenase-2, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

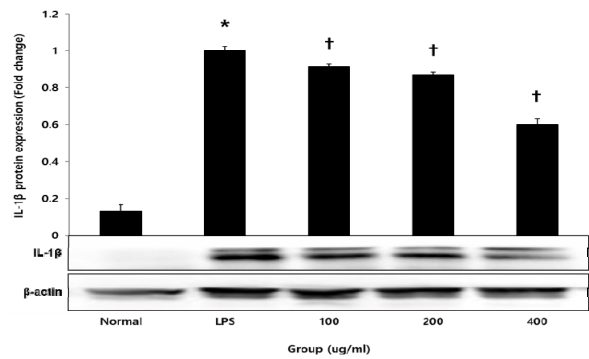


Fig. 14. Effect of GJBT on IL-1 β protein expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard deviation of mean (n=3). The band images were obtained using western blot analysis, and β -actin was used as a loading control. Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 μ g/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, IL-1 β : interleukin-1 beta, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

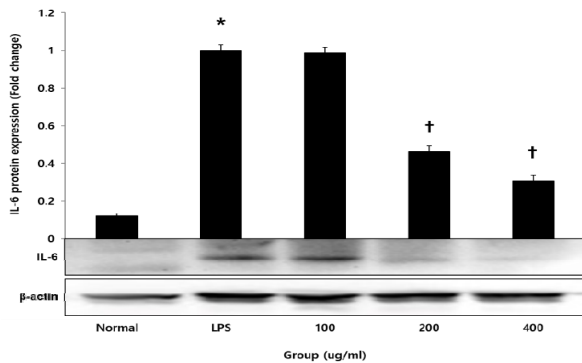


Fig. 15. Effect of GJBT on IL-6 protein expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). The band images were obtained using western blot analysis, and β-actin was used as a loading control. Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, IL-6: interleukin 6, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

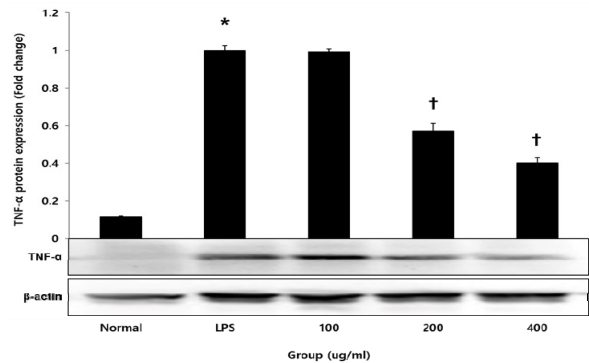


Fig. 16. Effect of GJBT on TNF-α protein expression level in LPS-induced RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard deviation of mean (n=3). The band images were obtained using western blot analysis, and β-actin was used as a loading control. Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. LPS: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells. 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and GJBT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells. GJBT: Gyejigeojakyakgabuja-tang, TNF-α: tumor necrosis factor-α, LPS: lipopolysaccharides, ANOVA: analysis of variance. *p<0.01 vs Normal compared to normal by t-test, †p<0.01 vs LPS compared to LPS by ANOVA and tukey's HSD test.

5. 세포 내 단백질 발현량

1) iNOS, IL-1β

세포 내 iNOS 단백질 발현량을 측정한 결과, GJBT는 100 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Figs. 12, 13).

2) COX-2, IL-6, TNF-α

세포 내 COX-2 단백질 발현량을 측정한 결과, GJBT는 200 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Figs. 14~16).

고찰»»»»

桂枝去芍藥加附子湯 (GJBT)은 《傷寒論》에 처음 언급되는데 太陽病, 下之後, 脈促胸滿者, 桂枝去芍藥湯主之, 若微惡寒者, 去芍藥方中加附子湯主之라는 언급이 있다⁷⁾. 太陽中風의 兼證에 대한 조문으로 ‘太陽病에 瀉下한 後’라 했으니 誤下로 인해 太陽의 邪氣가 裏로 들어간 상

황이다. 太陽의 表는 胸과 밀접하여, 邪氣가 裏로 들어 가려면 가장 먼저 胸부터 시작한다. 桂枝湯에서 酸味로서 血分과 陰分에 들어가 胸陽之氣에 불리한 芍藥을 빼면 남는 것은 모두 辛甘한 약재가 된다⁸⁾. 桂枝와 炙甘草는 心陽을 補하는 작용이 있으며^{19,20)} 心陽을 보하는 것은 바로 胸中の 陽을 고무시키는 역할을 하는 것이다. 大棗와 生薑은 榮衛를 조화시키면서 扶正을 겸하여 보조적인 역할을 한다. 이렇게 辛甘한 약을 사용하여 邪氣가 胸中으로부터 表로 나오게 하는 작용을 하게 된다. 微惡寒하다는 것은 胸陽이 부진할 뿐 아니라 陽氣가 이미 虛衰 하다는 것을 뜻한다. 이런 경우 桂枝去芍藥湯으로는 역부족이고 附子를 넣어서 心胸의 陽氣를 강화한다²¹⁾. 이와 같이 胸陽이 虛하고 陰寒之氣가 왕성할 경우 GJBT는 胸中の 陽을 補하여 胸陽之氣를 고무시키는 효과가 있다. GJBT는 桂枝 3兩, 甘草 2兩, 生薑 3兩, 大棗 12枚, 附子 1枚로 구성되어 있고²²⁾ LPS에 의해 염증이 유발된 백서 모델로 각각의 약재들에 관한 선행연구가 시행되었는데 약재들의 경구 투여 또는 약침 주사에 항염 효과가 있는 것으로 보고되었다. LPS는 염증반응의 초기에 생체 세포의 toll-like receptor 4에 결합하여 mitogen-activated protein kinase (MAPKs) 및 NF-κB 등의

신호 전달 경로를 활성화하여 염증을 유발한다.

GJBT는 전임상 연구에서 항염 효과가 입증된 약제들로 구성이 된 처방으로, 출전 상 관절과 신경의 염증에 대한 항염 효과가 있을 것으로 기대가 되지만, GJBT의 항염 효과와 기전 연구는 시행된 바 없었다. 이에 GJBT에 대한 항염증 치료 효과 및 기전을 규명하기 위해 *in vitro* 실험을 기획하였다.

in vitro 실험에서 GJBT의 세포 내 항염증 효과에 대해 알아보기 위하여 생쥐 유래 대식 세포주인 RAW 264.7 세포를 사용하였다. 우선 GJBT을 100, 200, 400, 600 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 세포 생존율을 측정하였다. 실험결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포에 대한 독성이 나타나지 않았으며 600 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 독성이 나타나 이후 실험에서는 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 진행하였다. 분석에 사용할 세포에 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 GJBT를 처리하고 LPS를 200 ng/ml 추가하여 다시 24시간 동안 배양한 후 세포배양액과 세포를 분리하여 분석한 후 염증 관련 지표를 평가하여 그 효능과 기전을 알아보고자 하였다.

염증이 유도되면 다양한 염증성 매개물질이 발현되는 것으로 보고²³⁾되었으며, NOS는 iNOS로부터 합성되는 염증 지표 물질로, 다양한 염증 질환에서 관찰되는 지표이고²⁴⁾, PGE₂는 혈관 확장, 부종, 발열 및 동통 등을 매개하여²⁵⁾ Th2 type 면역반응을 촉진하고 Th1 type 면역반응은 억제하며 대식세포에서 염증성 cytokine의 생성을 억제하고 항염증성 cytokine의 생성을 촉진하는 역할이 최근의 많은 연구에서 밝혀졌다²⁶⁾. RAW264.7 cell의 세포 내 NO 생성량을 측정한 결과 GJBT는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고, PGE₂ 생성량을 측정한 결과 GJBT는 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다. 실험 결과에 따르면, GJBT는 염증 반응을 나타내는 지표인 PGE₂의 조절에 있어서 NOS의 조절보다 더 높은 농도가 필요함을 보여 준다. 이는 환자가 경험할 수 있는 혈관 확장, 부종, 발열 및 동통과 같은 염증 증상을 조절하는 데 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 더욱 뚜렷한 염증 억제 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

다음으로 RAW264.7 cell의 세포 내 cytokine의 생성량을 측정하였다. 염증반응에서 cytokine은 염증 매개

역할을 하는 데²⁷⁾ cytokine의 발현량이 줄어들수록 염증 반응이 조절된다고 볼 수 있다. IL-6는 조직 손상에 대한 발열을 일으키고 IL-1 β 는 COX-2 유도과정과 lymphokine 분비에 관여하며, TNF- α 는 IL-6의 발현 유도에 작용할 뿐만 아니라 종양 발생과 염증을 동반하는 질병에서 높은 수치를 띠는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 이러한 기능을 가진 전 염증성 cytokine은 활성화된 NF- κ B와 MAPKs 등의 전사인자에 의해 촉진되며 자가면역 질환 및 염증반응을 매개한다²⁹⁾. 세포 내 cytokine 생성량에 대한 GJBT 실험 결과 IL-1 β , TNF- α 생성량은 GJBT 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다. IL-6 생성량은 GJBT 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다. 실험 결과에 따르면, GJBT는 다양한 농도에서 cytokine의 생성을 조절한다. IL-6은 조직 손상에 대한 발열 과정에 관여하며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 GJBT 농도에서 그 생성량이 감소한다. IL-1 β 와 TNF- α 는 각각 COX-2 유도과정과 IL-6의 발현 유도에 관여하는데, 이들 cytokine의 생성량은 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 GJBT 농도에서 감소한다. 이는 염증 반응을 조절하기 위해 cytokine 종류에 따라 다른 농도의 GJBT가 필요함을 알 수 있다.

다음으로 GJBT의 세포 내 항염 작용을 알아보기 위하여 iNOS, COX-2, cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 유전자 발현량 및 단백질 발현량을 측정하였다. iNOS, COX-2는 LPS에 의해서 분비되는 대표적인 염증 유발 물질이다³⁰⁾. NOS는 inducible NOS, endothelial NOS, neuronal NOS 등으로 나눌 수 있으며, 그 중 iNOS는 LPS나 cytokine, 세균에 의해 발현되어 NO 생성에 관여하여 조직 손상에 영향을 준다^{31,32)}. 그리고 염증반응 부위에서 발현되는 COX-2는 통증을 유발하고 prostaglandin 생성에 관여한다³³⁾. 세포 내 유전자 발현량을 측정한 결과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 GJBT 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다. iNOS, COX-2는 GJBT 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다. 세포 내 단백질 발현량을 측정한 결과 iNOS, IL-1 β 단백질 발현량은 GJBT 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고, COX-2, IL-6, TNF- α 단백질 발현량은 GJBT 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도

에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다.

in vitro 실험 결과를 살펴보면 LPS는 모든 항목의 생성량을 유의성 있게 증가시켰으며 GJBT는 모든 항목에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의한 감소를 하였다. 염증 매개물질인 NO, PGE₂ 및 다양한 cytokine의 생성량과 단백질 발현량, 유전자 발현량도 유의한 감소를 하였다.

위의 실험 결과를 종합하여 볼 때, GJBT는 iNOS의 생성을 억제하여 NOS의 생성을 억제하고, COX-2의 발현 및 활성을 억제하여 PGE₂의 생성을 유의성 있게 감소시키고, cytokine 생성량, 유전자 발현량, 단백질 발현량을 유의하게 감소시켜 항염증 작용에 유의성이 있다고 볼 수 있다. 그 결과 GJBT의 세포 내 항염증 효과는 관절염, 천식, 자가면역 질환 등 다양한 염증 관련 질환의 치료에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만, 구성 약물 간의 상호작용에 관한 연구가 미비하여, 어떤 약물이 항염증 효과가 있는지에 대한 확인이 부족하다는 제한점이 있다. 또한, 본 연구를 통해 GJBT의 효능을 단정적으로 평가하는 것은 무리가 있으므로, 앞으로 추가적인 전임상 연구를 통해 양성 대조군과의 비교연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론»»»»

GJBT의 항염증 효과를 알아보기 위해 *in vitro* 실험을 진행하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GJBT는 400 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 세포 독성이 나타나지 않았다.
2. GJBT의 세포 내 NO 생성량을 측정된 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다.
3. GJBT의 세포 내 PGE₂ 및 cytokine (IL-1 β , TNF- α)의 생성량을 측정된 결과 LPS군에 비해 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였고, IL-6의 생성량은 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.
4. GJBT의 세포 내 iNOS, COX-2의 유전자 발현량을

측정한 결과 LPS군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였고, cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 발현량은 LPS군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.

5. GJBT의 세포 내 단백질 발현량을 측정된 결과 iNOS, IL-1 β 의 발현량은 LPS군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였고, COX-2, IL-6, TNF- α 의 단백질 발현량은 LPS군에 비해 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.

이상의 결과를 바탕으로 GJBT가 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

References»»»»

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia:Saunders/Elsevier. 2011:31-2.
2. Choi HJ, Eun JS, Park YR, Kim DK, Li R, Moon WS, Park JM, Kim HS, Cho NP, Cho SD, Soh Y. Ikariside a inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappa signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*. 2008;601(1-3): 171-8.
3. Tao MQ, Ji CL, Wu YJ, Dong JY, Li Y, Olatunji OJ, Zuo J. 1,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyxanthone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages by suppressing TLR4/NF- κ B signaling cascades. *Inflammation*. 2020;43(5):1821-31.
4. Lee HA, Song BR, Kim HR, Kim JE, Yun WB, Park JJ, Lee ML, Choi JY, Lee HS, Hwang DY. Butanol extracts of *Asparagus cochinchinensis* fermented with *Weissella cibaria* inhibit iNOS-mediated COX-2 induction pathway and inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;14(5):4986-94.
5. George MD, Baker JF, Leonard CE, Mehta S, Miano TA, Hennessy S. Risk of nonunion with nonselective NSAIDs, COX-2 inhibitors, and opioids. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2020;102(14):1230-8.
6. Cui J, Jia J. Natural COX-2 inhibitors as promising an-

- ti-inflammatory agents: an update. *Current Medicinal Chemistry*. 2021;28(18):3622-46.
7. Liu DZ. Liu Duzhou's shanghanlun jiangyi. Paju: Fishwood. 2014:96.
 8. Lee JH. Han prescription for diagnosis and treatment. Wonju:Euibang publisher. 2007:117-8.
 9. Park HJ, Lee JS, Lee JD, Kim NJ, Pyo JH, Kang JM, Choe IH, Kim SY, Shim BS, Lee JH, Lim SB. The anti-inflammatory effect of Cinnamomi ramulus. *Journal of Korean Oriental Medicine*. 2005;26(2):140-51.
 10. Koh DK, Yun JM, Lee TH. Effects of Aconiti tuber on the change of interleukin-6 and TNF- α level induced by LPS ICV injection in mice. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*. 2004;12(1):195-208.
 11. Kim YH, Yim YK, Lee H. The effects of herbal-acupuncture with Aconiti lateralis Preparata radix solution on collagen-induced arthritis. *The Korean Journal of Meridian & Acupoint*. 2006;23(2):137-54.
 12. Ryu HS, Kim J, Park SC, Kim HS. Enhancing effect of Zingiber officinale Roscoe extracts on mouse spleen and macrophage cells activation. *The Korean Journal of Nutrition*. 2004;37(9):780-5.
 13. Seo UK, Jung HW, Park YK. Chloroform fraction of zingiberis rhizoma recens modulates the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2008;23(3):73-83.
 14. Al-Reza SM, Yoon JI, Kim HJ, Kim JS, Kang SC. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from Zizyphus jujuba. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(2):639-43.
 15. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of Zizyphus jujuba var. inermis Rehder. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2006;38(1):128-34.
 16. Pak JP, Son JH, Kim YM, Lee EY, Leem KH, Kim EH. Suppression of inflammatory macrophage response by glycyrrhiza uralensis herbal acupuncture extract. *Korean Journal of Acupuncture*. 2011;28(4):49-58.
 17. Hu XS. Hu XS's shanghanlun jiangyi. Paju:Fishwood. 2019:60.
 18. Cheng W. Zhujieshanghanlun. Beijing:People's Medical Publishing House. 1996:60.
 19. National Oriental Medicine College Collaborative Textbook Compilation Committee. *Herbology*. Seoul: Young Lim Publishing. 2004:156-7, 287-8, 465-6.
 20. Lee YS, Kim HC, Whang EH, Jo SK, Lim IG, Han JH. Study on the effect of Jakyakgamcho-tang. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 2003;17(2):493-8.
 21. Zhang X. Yixuezhongzhongcanxilu. Shijiazhuang:Hebei Science & Technoloy Press. 1985:97.
 22. Kim SW. A study on jeungjuryujeunghwalinseo [Doctoral dissertation]. Wonkwang University; 2013.
 23. Yoon TJ, Jo SY. Effect of acanthopanax senticosus extracts on alcohol degradation and anti-inflammatory activity in mice. *The Korean Journal of Food and Nutrition*. 2010;23(4):542-8.
 24. Lowenstein CJ, Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of Cell Science*. 2004;117(Pt 14):2865-7.
 25. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(7):4705-8.
 26. Ninnemann JL. Prostaglandins in inflammation and disease. *Immunology Today*. 1984;5(6):173-5.
 27. Meydani SN. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions. *Nutrition Reviews*. 1990;48(10):361-9.
 28. Kiemer AK, Hartung T, Huber C, Vollmar AM. Phyllanthus amarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Journal of Hepatology*. 2003;38(3):289-97.
 29. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*. 2002;23(3):144-50.
 30. Kim JA, Nagappan A, Park HS, Saralamma VV, Hong GE, Yumnam S, Lee HJ, Raha S, Kim EH, Young PS, Kim GS. Proteome profiling of lipopolysaccharide induced L6 rat skeletal muscle cells response to flavonoids from Scutellaria baicalensis Georgi. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2014;14:379.
 31. Kim DH, Hwang EY, Son JH. Anti-inflammatory activity of Carthamus tinctorious seed extracts in Raw 264.7 cells. *Journal of Life Science*. 2013;23(1):55-62.
 32. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Critical Reviews in Neurobiology*. 1996;10(3-4):291-316.
 33. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(8):3228-32.