

白屈菜藥針液이 LPS로 誘導된 RAW 264.7 大食細胞에서의 抗炎症效果

박동천¹ · 박지현¹ · 이우경¹ · 이진규¹ · 서일복² · 김호현³ · 김정선⁴ · 김이화¹

세명대학교 한의과대학 ¹경혈학교실, ²해부학교실, ³생리학교실, ⁴세명대학교 한방식품영양학과

Effects of Chelidonii Herbal-acupuncture solution Anti-inflammatory in RAW 264.7 macrophages

Dong-Cheon Park¹, Ji-Hyeon Park¹, U-Kyung Lee¹, Jin-Kyu Leek¹, Il-Bok Seo², Ho-Hyun Kim³,
Jeong-seon Kim⁴, Ee-Hwa Kim¹

Dept. of ¹Meridian & Acupoint, ²Anatomy, ³Physiology, College of Oriental Medicine, Semyung University;
²Dept. of Oriental Medical Food & Nutrition, Semyung University

Abstract

Objectives : Recently, Herbal-acupuncture therapeutics has been used for the treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. Especially, we have been interested in chemical mediators concerned with inflammation such as prostaglandin, cytokine, nitrous oxide. The purpose of this study is investigated that the effect of *Chelidonii Herbal-acupuncture solution* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, performed several experimental items : those are prostaglandin E₂, nitric oxide and cyclooxygenase-2.

Methods : The cytotoxicity of *Chelidonii Herbal-acupuncture solution* in RAW 264.7 macrophages were measured by MTT-based cytotoxicity assay. In order to observe cyclooxygenase-2 mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, RT-PCR was used. Prostaglandin E₂ formation and nitric oxide production was measured by competitive enzyme immunoassay and Griess assay.

Results :

1. The MTT assay demonstrated that cytotoxic effect of *Chelidonii Herbal-acupuncture solution* in RAW 264.7 macrophages were not appeared before concentration of 1mg/ml.
2. *Chelidonii Herbal-acupuncture solution* inhibited cyclooxygenase-2 mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.
3. *Chelidonii Herbal-acupuncture solution* inhibited nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.
4. *Chelidonii Herbal-acupuncture solution* inhibited prostaglandin E₂ formation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.

• 교신저자: 김이화, 충북 제천시 신월동 산21-1 세명대학교 한의과대학
경혈학교실, Tel. 043)649-1348, Fax. 043)649-1349,
E-mail : kimeh@semyung.ac.kr

• 이 보고서는 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음
(KRF-2003-003-E00172)

• 접수 : 2004/06/01 • 수정 : 2004/06/12 • 채택 : 2004/6/16

Conclusions : On the basis of these results, It was shown that *Chelidonii Herbal-acupuncture* solution is significantly able to inhibit the production of PGE₂ and NO, as well as COX-2 mRNA expression. Our results may provide new mechanism by which *Chelidonii Herbal-acupuncture* solution accounts for its beneficial effect on accelerating wound healing and anti-inflammation.

Key words : *Chelidonii Herbal-acupuncture*, Anti-inflammatory, RAW 264.7 macrophages, PGE₂ & NO, COX-2, mRNA expression

I. 緒 論

생체 조직의 손상에 대해 반응하는 능동적인 과정으로 설명되는 염증반응은 생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 이에 대한 반응을 일으켜 손상을 극소화시키고, 손상된 부위를 수복시키려는 일련의 반응을 일으키게 된다¹⁾.

염증형성 과정에는 cytokines, prostaglandin E₂ (PGE₂), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 인자가 관여하며 생체내에서 호중구(neutrophil) 같은 염증관련 세포와 inflammatory cytokines, superoxide anion 등은 서로 복잡한 관계를 띠고 있다²⁾. Proinflammatory cytokine인 interleukin-1 β (IL-1 β)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)에 의해 호중구는 활성화되어 염증부위로 이동하며, 또한 IL-1 β 는 PGE₂ 생성유도에 의해 발열을 유발하여 TNF- α 와 함께 염증반응의 주된 매개자로 작용하는 nitric oxide(NO)를 비롯한 superoxide anion 등의 형성을 유도하는 것으로 알려져 있다³⁾.

NO는 생체내 면역체계 내에서 활성산소종(reactive oxygen species) 또는 활성산소중간매개물(reactive oxygen intermediates)로 작용하여 박테리아 등에 감염된 세포가 자체 방어기전을 나타낼 때 생성되는 물질이다. 그러나 NO는 superoxide anion과 함께 높은 세포손상 활성을 가진 과산화질소(peroxynitrite)를 형성한다⁴⁾. Cyclooxygenases (COX)-2는 arachidonic acid

대사에서 중요한 역할을 수행하는 효소로 COX-1이 구조적 성분임에 비해 염증성 자극 등에 의해 유도되며 prostaglandin (PG) 형성에 관여하며, arachidonic acid는 혈소판(platelet)에 의한 NO 합성을 촉진시킨다⁵⁾.

한편, 白屈菜 (*Chelidonii Herba*)는 救荒本草에 처음으로 기록된 罂粟科의 多年生 草本인 *chelidonium majus* Linne의 全草^{6,7)}이며, 山黃連 地黃連⁷⁾ 假黃連 牛金花 雄黃草⁸⁾ 등의 異名을 가지고 있고, 性味는 微溫 有小毒, 苦辛하고 歸經은 肺, 胃, 大腸이며 理氣止痛, 止咳, 利水消腫, 解瘡毒 등의 효능이 있어 위궤양, 급만성위염, 간경화복수, 頑癬, 疥癬 등에 다방면으로 응용할 수 있다고 하였다^{6,9)}.

한의학회에서는 최근 침구 및 약물 등의 한의학적 치료방법이 염증반응 형성과정에서 증가되는 물질의 생성에 어떠한 영향을 미치는지, 급만성 염증, 염증에 따른 진통 등에 응용할 수 있는지에 대한 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 白屈菜 藥鉞液이 LPS (lipopolysaccharide)로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증반응에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰한 결과 약간의 知見을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 材料

白屈菜 200 g을 증류수 500 ml에 가열 추출하여 이를 여과한 다음, 이를 rotary evaporator로

감압 농축하였다. 이를 동결 건조하여 정제된 건조추출물 20g(회수율 10%)을 얻어 사용하였다.

2. 方法

1) 세포배양

Macrophage cell line인 RAW264.7 cell을 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 용액에서 37 °C, 5% CO₂-95% O₂ 조건으로 배양하고, 배양액은 2일마다 교환하였다.

2) 시약

배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 등은 GibcoBRL (USA)에서 구입하며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)은 Sigma (USA)에서 구입하고, PGE₂ assay kit는 Amersham pharmacia (USA)에서 구입하였다. 또한 NO detection kit는 Intron Biotechnology (Korea)에서 구입하였고, 그 외 일반 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

3) 白屈菜의 세포독성 검사

白屈菜의 농도에 따른 세포독성을 검사하기 위하여 MTT-based cytotoxicity assay를 시행한다. 이는 세포배양에서 세포의 수를 측정하는 방법으로써, 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 것이며, 흡광도 (Optical density)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하였다. 세포독성 지수는 다음의 산출식에 따라 %로 나타내었다.

$$\text{세포독성지수(CI, \%)} = \left(1 - \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Macrophage cell을 10% FBS가 함유된 DMEM 용액에서 5% CO₂-95% O₂, 37 °C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 그리고 두 세포를 각각 96 well plate에 well당 2.0 × 10⁴의 세포수가 되도록 분주하고, 배양액 100 μl를 첨가하였다. 白屈菜의 최종농도가 0.1 μg/ml, 1 μg/ml, 10 μg/ml, 그리고 100 μg/ml이 되도록 처리하고, 白屈菜를 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 12시간동안 5% CO₂-95% air, 37 °C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양한 후, MTT용액 (MTT in phosphate buffered saline)을 50 μl 가한 뒤 알루미늄 호일로 덮어 빛에 노출되지 않게 하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 DMSO 100 μl를 첨가하여 침전물을 용해시킨 다음 ELISA reader로 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RNA 분리

배양된 macrophage cell에 白屈菜과 LPS를 24 시간동안 처리한 후 배양액을 제거하였다. 다음에는 trypsin을 이용하여 세포를 배양접시 바닥에서 분리시킨 후, 원심 분리하여 상층액을 제거하고 세포만 test tube로 옮겼다. 각각의 세포를 homogenization 시키기 위하여 각 tube에 1 ml의 RNazol B를 첨가하였다. Chloroform 100 μl를 가하고 15초 동안 잘 혼합한 다음 5분간 방치하였다. 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상층액에 같은 양의 isopropanol을 가한 후 4 °C에서 15분간 방치하였다. 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 75% ethanol로 washing 후 다시 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 total RNA를 추출하였다. RNA 측정은 260/280 nm로 측정하였다.

5) RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

대식세포로부터 total RNA를 분리하고, 분리한 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후 COX-2 유전자 증폭을 위한 primer를 가지고 PCR을 시행하여 cDNA의 일부를 대량으로 증폭하였다. Total RNA 1 μ g에 random hexamer 2 μ l를 넣어 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 AMV 역전사 효소 1 μ l, RNasin 1 μ l, 10 mM dNTP 5 μ l, 10 \times buffer 5 μ l, 50 mM MgCl₂ 및 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 50 μ l로 하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성하게 하였다. PCR은 PCR 자동화 기계 (Perkin Elmer 9600, USA)에서 template로 희석된 cDNA 1 μ l, Taq polymerase 2 unit, 2.5 mM dNTP 1 μ l, sense primer 10 pM 1 μ l, anti-sense 10 pM 1 μ l, 10 \times buffer 3 μ l 및 탈이온수를 첨가하여 총 30 μ l가 되게 하여, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 1회, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 30회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 1회 시행하여 1.2 % 한천 겔에서 전기영동 하였다. Internal standard로는 cyclophilin 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 COX-2 유전자 발현정도를 보정하였다. 각각의 primer는 gene bank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였다.

COX-2 primer

Sense :

5'-TGCATGTGGCTGTGGATGTCATCAA-3'

Anti-sense :

5'-CACTAAGACAGACCCGTCATCTCCA-3'

Cyclophilin primer

Sense : 5'-ACCCACCGTGTCTTCGAC-3'

Anti-sense :

5'-CATTGCCATGGACAAGATG-3'

COX-2 및 cyclophilin의 크기는 각각 583 bp, 299 bp로 하였다.

6) Prostaglandin E2 (PGE2) 분비량 측정

PGE₂의 분비량을 측정하기 위하여 competitive enzyme immunoassay 법을 시행하였다. 96 well plates에 대식세포를 1일간 배양한 후, 白屈菜을 첨가하여 24 시간동안 배양하였다. 세포를 용해하기 위하여 각 well에 buffer A를 20 μ l씩 넣고 잘 흔든 뒤 실온에서 10분간 방치한 후, 세포가 용해된 용액 50 μ l를 goat anti-mouse Ig가 coating된 측정용 plate에 옮겼다. 항체와 conjugate 용액을 각각 50 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 방치한 후, wash buffer로 4번 세척하고 발색 용액 150 μ l/well를 넣고 실온에서 정확히 30분간 반응시킨 뒤 630 nm에서 측정하였다.

7) Nitric oxide (NO) 분비량 측정

NO의 분비량을 측정하기 위하여 Griess assay (Green et al., 1982)를 사용하여 NO의 분비량을 측정하였다. 96well plates에 macrophage cell을 1일간 배양한 후, 白屈菜藥液을 첨가하여 24 시간동안 배양하였다. 그 다음 세포의 배양액을 100 μ l씩 수확하여, griess reagent (1 % sulphanilamide + 2 % phosphoric acid, 0.1 % naphthylethylene diamide dihydrochloride) 50 μ l씩 각각 첨가한 후, 실온에서 10분동안 방치한 후, 550 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)를 희석하여 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 작성하여 얻었다.

8) 통계처리

實驗結果는 SPSS Window program (Ver. 10.0)을 利用하였으며, 모든 測定값은 平均값±標準誤差 (Mean±standard error)로 나타내었고, 유의성은 $p < 0.05$ 로 하였다. 白屈菜藥針液의 效果를 判定하기 위한 統計학적 分析은 Student's t-test¹⁶⁾를 실시하였다.

III. 결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

白屈菜藥針液을 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml 및 10 mg/ml의 농도로 배양한 대식세포의 생존률을 관찰한 결과 대조군에 비해서 $97.66 \pm 6.57 \%$, $95.11 \pm 7.49 \%$, $86.43 \pm 5.54 \%$, $62.99 \pm 6.28 \%$, 그리고 $61.11 \pm 5.97 \%$ 로 나타났다. 이러한 결과로 白屈菜藥針液은 1 mg/ml의 농도까지 RAW 264.7 대식세포에서 統計학적으로 유의한 ($p < 0.05$) 독성이 없음을 확인하였다 (Table I, Fig. 1).

2. COX-2 mRNA 발현에 대한 영향

白屈菜藥針液이 COX-2에 대한 RT-PCR를 시

Table I. The cytotoxic effect of *Chelidonii Herba* on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay

Group	Average Viability
Control	100.00 ± 5.65 ^{a)}
0.1 mg/ml C. H.	97.66 ± 6.57
0.5 mg/ml C. H.	95.11 ± 7.49
1 mg/ml C. H.	86.43 ± 5.54
5 mg/ml C. H.	62.99 ± 6.28 [*]
10 mg/ml C. H.	61.11 ± 5.97 [*]

^{a)} : Mean ± standard error
^{*} : Statistically significant value compared with control group
 C. H. : *Chelidonii Herba*

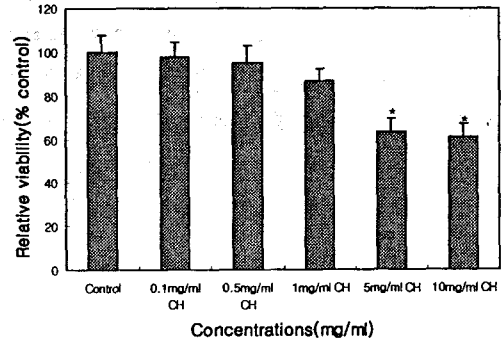


Fig. 1. The cytotoxic effect of *Chelidonii Herba* on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay

행하여 COX-2의 mRNA 발현에 대한 效果를 상대적으로 평가하였다. 본 연구에서 대조군은 1로 하여 실험군의 COX-2 mRNA 발현수준을 측정하였다. 측정결과 5 µg/ml 농도의 LPS를 처리한 군에서는 10.24 ± 2.12 로 나타나서 統計학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 반면에 5 µg/ml 농도의 LPS 및 0.1 mg/ml 白屈菜藥針液을 처리한 군에서는 6.85 ± 0.68 , 5 mg/ml 농도의 LPS 및 1 mg/ml 白屈菜藥針液을 처리한 군에서는 5.14 ± 0.71 로 나타나 LPS 처리한 군에 비해서 統計학적으로 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Table II, Fig. 2-1, 2-2).

Table II. Effects of *Chelidonii Herba* on expression of COX-2 mRNA

Group	mRNA expression (O.D.)
Control	1
LPS	10.24 ± 2.12 ^{a)}
LPS + 0.1mg/ml C. H.	6.85 ± 0.68 [#]
LPS + 1mg/ml C. H.	5.14 ± 0.71 [#]

^{a)} : Mean ± standard error
^{*} : Statistically significant value compared with control group
[#] : Statistically significant value compared with LPS treated group
 C. H. : *Chelidonii Herba*

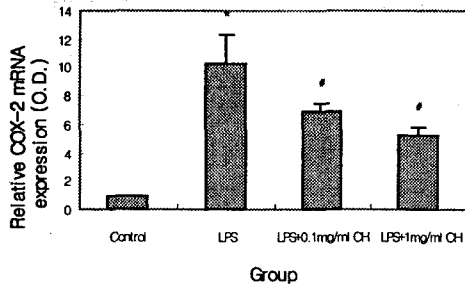


Fig. 2-1. Effects of *Chelidonii Herba* on expression of COX-2 mRNA

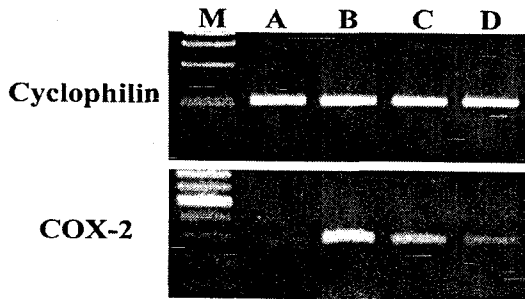


Fig. 2-2. Effects of *Chelidonii Herba* (CH) on expression of COX-2 mRNA. RAW 264.7 cells were exposed to LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS + 0.1 mg/ml C. H. and LPS + 1mg/ml C. H...
 M : Size Maker
 A : Control
 B : LPS
 C : LPS + 0.1 mg/ml C. H.
 D : LPS + 1 mg/ml C. H.

3. Prostaglandin E2 생성에 미치는 영향

대조군에서의 Prostaglandin 생성을 조사한 결과 정상군에서는 $118 \pm 21.11 \text{ pg/well}$ 농도로 나타난 반면, LPS 처리군에서는 $311 \pm 19.5 \text{ pg/well}$ 로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다. 또한 LPS에 白屈菜藥鉞液을 0.1 mg/ml 및 1 mg/ml로 처리한 군에서는 307 ± 16.35 및 259 ± 20.11

Table III. Effects of *Chelidonii Herba* on PGE₂ synthesis

Group	Prostaglandin E ₂ (pg/well)
Control	$118 \pm 21.11^{\text{a}}$
LPS	$311 \pm 19.50^*$
LPS + 0.1 mg/ml C. H.	$307 \pm 16.35^{\#}$
LPS + 1 mg/ml C. H.	$259 \pm 20.11^{\#}$

^{a)} : Mean \pm standard error

* : Statistically significant value compared with control group

[#] : Statistically significant value compared with LPS treated group

C. H. : *Chelidonii Herba*

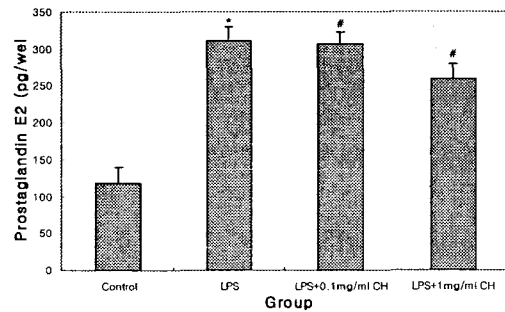


Fig. 3. Effects of *Chelidonii Herba* on PGE₂ synthesis

로 나타나 LPS군에 비해서 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다 (Table III, Fig. 3).

4. Nitric oxide 생성에 미치는 영향

대조군에서의 nitric oxide 생성을 조사한 결과 정상군에서는 $0.98 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 농도로 나타난 반면, LPS군에서는 $16.02 \pm 2.27 \mu\text{M}$ 로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다. 또한 LPS에 白屈菜藥鉞液을 0.1 mg/ml 및 1 mg/ml로 처리한 군에서는 $10.54 \pm 2.75 \mu\text{M}$ 및 $7.41 \pm 1.98 \mu\text{M}$ 로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 나타나 LPS 처리군에 비하여 감소하였다 (Table IV, Fig. 4).

Table IV. Effects of *Chelidonii Herba* on NO synthesis

Group	Nitric Oxide Synthesis (μ M)
Control	0.98 \pm 0.02 ^{a)}
LPS	16.02 \pm 2.27 [*]
LPS + 0.1 mg/ml C. H.	10.54 \pm 2.75 [#]
LPS + 1 mg/ml C. H.	7.41 \pm 1.98 [#]

a) : Mean \pm standard error

* : Statistically significant value compared with control group

: Statistically significant value compared with LPS treated group

C. H. : *Chelidonii Herba*

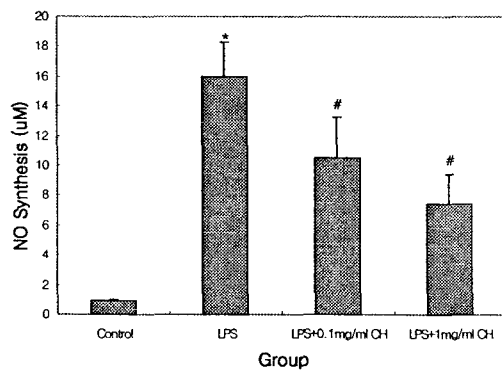


Fig. 4. Effects of *Chelidonii Herba* on NO synthesis

IV. 考 察

염증은 인체에 발생하는 가장 흔한 질환 중의 하나로서 생체 조직이 손상에 대해 반응하는 능동적인 과정으로 설명된다. 생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 이에 대한 반응을 일으켜 손상을 극소화시키고, 손상된 부위를 수복시키려는 일련의 국소적 반응을 일으키게 된다^{2,3)}.

염증에서 일어나는 조직 반응의 기전은 혈관 변동, 세포성분 변동, 화학적 매개체, 림프관 림

프질 및 망내계의 역할 등으로 설명할 수 있다. 우선 혈관변동은 세동맥의 일시적 수축, 혈관확장 및 혈류의 증가, 혈류 속도의 감소, 혈관벽 투과성의 증가, 백혈구의 邊緣趨向 및 유주의 순서로 나타나며, 세포성분의 변동은 백혈구 삼출, 탐식작용, 단핵 식세포계, 백혈구 생성물의 세포의 유출, 백혈구 기능장애 등이 있다. 염증의 화학적 매개체 (chemical mediators of inflammation)는 혈관활성 아민류 (vasoactive amines), 혈장단백 분해효소 (plasma protease), 아라키돈산 대사물 (prostaglandin and leukotriene), 리소솜 성분 (lysosomal constituents), 산소 유래 유리기 (oxygen-derived free radical), 혈소판 활성화인자 (platelet activating factor, PAF), cytokine, NO 등과 같이 분류한다¹⁾.

최근 류마티스 관절염이나 만성 염증질환, 혹은 급성염증 질환은 많은 환자와 심각한 증세에도 불구하고 아직 적절한 치료법이 부족한 상황이다. 현재 이러한 질환의 치료에 많이 사용되고 있는 glucocorticoid와 같은 약제의 경우, 그 작용이 비선택적으로 나타나고 그 부작용이 크므로 장기간 치료에 사용될 수 없으며 또한 비스테로이드 항염제 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 진통작용에 효과적이기는 하지만 위궤양과 같은 부작용을 초래하기 때문에 세계적으로 부작용이 없는 강력한 항염효과를 나타내는 치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행 중이다¹⁰⁻¹⁴⁾. 이에 부응하여 한의학계에서도 鍼灸 및 藥物 등의 한의학적 치료방법으로 화학적 매개체와의 관계에 대한 연구가 이루어지고 있다. 藥鍼요법의 진통 및 소염 효과에 대한 연구를 살펴보면 구¹⁵⁾는 秦艽藥鍼이, 강¹⁶⁾은 草烏藥鍼이, 송¹⁰⁾은 加味疎風活血湯藥鍼이, 장¹⁷⁾은 牛膝藥鍼이 각각 관절염에 유효함을 보고하였고, 이¹⁸⁾는 防風藥鍼이 진통 소염 및 鎮驚

작용이 있음을, 정¹⁹⁾은 附子藥鍼이, 정²⁰⁾은 木通藥鍼이, 김²¹⁾은 鹿茸藥鍼이 각각 진통 소염 효과가 있음을 보고하였다.

PG는 염증의 화학적 매개체 중 약리 및 생리학적으로 중요한 물질로 세포막에 존재하는 인지질에서 유래된 불포화지방산의 대사산물이며, PG는 phospholipid A₂, COX 및 hydroperoxidase가 관여하는 일련의 산화반응에 의해 생성된다²²⁾. 이중 PGE₂는 내인성 발염물질로 알려진 IL-1 β , IL-8 및 TNF- α 에 의해 생성이 유도되어 bradykinin과 같은 강력한 발염물질의 작용을 강화시켜 염증 질환, 자가면역 질환 그리고 종양성 질환의 병리에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 시상하부의 체온조절중추에 작용하여 체온상승을 유발한다. 또한 PGE₂는 골수세포에 작용하여 파골세포 (osteoclast)의 전구세포 (preosteoclast)를 유도하는 작용이 있다고 알려져 있다²³⁾.

COX는 arachidonic acid를 불안정한 중간물 (intermediate)인 PGG₂와 PGH₂로 변환시키는데, 이 효소는 현재 COX-1과 COX-2의 두가지 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. COX-1은 조직의 구성 요소이며 위장관계를 포함한 조직에 산재한다. 각 조직에서 혈류의 유지, 세포 분화 (cell division), 점액 (mucus)과 중탄산염 (bicarbonate)의 생성 등에 관여하는 국소적인 prostaglandin의 양을 조절한다. 이러한 COX-1의 활성화를 NSAIDs가 저해함으로써 통증은 억제하지만 위장관과 신장의 부작용 및 항혈소판 작용 (antiplatelet activity)이 나타난다. 반면에 COX-2는 뇌와 신장에서 주로 발견되며 일부 염증성 세포 (inflammatory cell)에서도 발견되고, 특히 염증부위에서 유도된다. 그 염증부위에서 고농도의 prostaglandin은 염증과 통증의 매개물질로서 중요한 역할을 한다. COX-1은 염

증부위에서 거의 유도되지 않으므로 COX-1의 억제 작용은 거의 없는 선택적인 COX-2 저해제를 고안하게 되었다. 선택적인 COX-2 저해제는 염증과 통증을 감소시킬 수 있는 반면에 COX-1에는 영향을 끼치지 않기 때문에 위장관계에서는 안전한 것으로 제시된다⁵⁾. 현재 사용되는 거의 대부분의 NSAIDs는 COX-1과 COX-2를 비선택적으로 억제하거나 또는 구성요소인 COX-1에 약간의 선택성을 갖고 있는 제제들이다²⁵⁾. NSAIDs는 가장 흔히 처방되는 제제 중의 하나이지만, 이 NSAIDs의 사용으로 인하여 부작용이 빈번하게 발생한다. 따라서, NSAIDs의 항염증 효과 및 진통 효과와는 비슷한 효능을 가지면서도 이러한 NSAIDs에서 흔히 나타나는 위장관 부작용은 없는 선택적인 COX type 2 저해제 (selective inhibitors of COX-2)가 이미 개발되어 임상에서 사용되고 있다^{11,13)}.

산화질소 (NO)는 신경계통 조직에서 신경전달물질, 신경조절물질 또는 이차전령물질 (second messenger)로 작용하는 것으로 알려진 free radical이다. 과거에는 endotheliumderived relaxing factor (EDRF)로 알려졌지만 현재는 기체임이 확인되었다. NO는 중추신경계통, 말초신경계통, 심장혈관계통에서 작용을 나타냄이 보고되어 왔다. NO의 형성은 흥분성 아미노산 수용체에 대한 자극과 관련이 있으며 일단 산화질소가 생성되면 수용성 guanylate cyclase가 자극된다. 산화질소는 산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase, NOS)에 의하여 arginine으로부터 합성되며 이때 NADH와 tetrahydrobiopterin이 조효소로 작용하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. NO는 자유롭게 확산하는 가스로서 신경계, 혈관계 및 면역계에서 세포사이의 작용을 매개하는 메신저물질로 중요한 역할을 하는데 1990년 초에 동물세포에서 세포간의 메신저

물질로 생성된다는 것을 발견하였고 혈압, platelet adhesion, neutrophil의 집성뿐만 아니라 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되어졌다. 즉 NO는 혈소판 내에서 혈소판의 응집을 억제하며 대식세포에서 세포독성을 매개하는 작용을 하며 일부 인체조직에서는 혈관확장을 매개하는 물질로도 알려져 있다. 혈관확장을 매개하는 물질로서 뇌조직에서는 확인되지 않았으나 대뇌 혈류 순환은 NO에 의해 조절되며 NO는 내피세포 뿐만 아니라 혈관주위 신경섬유에서 나오는 것으로 확인되었다²⁷⁾. 이 NO가 적게 만들어지면 고혈압, 성교불능, 동맥경화 등의 증상을 나타내고 균에 감염되기 쉽다. 반면 NO가 필요 이상으로 생성되면 자가면역성 당뇨병, 동맥류, 뇌졸중, 감염성 대장병, 류마티즘, 압, septic shock, 복합경화증을 나타내고 이식 거부반응도 나타나게 된다. 요컨대 NO는 낮은 농도에서만 신호로 작용하고 높은 농도로 존재하면 독성을 나타내기 때문에 NO의 합성은 아주 조심스럽게 조절 되어야만 하며 신체상태에 따라 균형이 잘 맞아야 한다²⁸⁾. 그러므로 NO 생성저해제는 septic shock, 당뇨, 동맥경화등의 만성질환 치료제로의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 이런 질병에 대한 치료제를 개발할 목적으로 최근에는 천연물로부터 NO 생성저해제를 찾으려는 연구가 진행되고 있다¹¹⁻¹²⁾.

白屈菜 (*Chelidonium Herba*)는 救荒本草에 처음으로 기록된 罂粟科의 多年生 草本인 *Chelidonium majus* Linne의 全草^{6,7)}이며, 山黃連 地黃連⁷⁾ 假黃連 牛金花 雄黃草⁸⁾등의 異名을 가지고 있고, 性味는 微溫 有小毒, 苦辛하고 歸經은 肺, 胃, 大腸이며 理氣止痛, 止咳, 利水消腫, 解瘡毒등의 효능이 있어 위궤양, 급만성위염, 간염 화복수, 頑癬, 疥癬등에 다방면으로 응용할 수

있다고 하였다⁶⁻⁹⁾. 그 성분 및 약리 작용에 대한 연구로는 chelidonine, protopine, stylopine, allocryptoline, berberine 등이 家兔 小腸의 평활근에 대한 작용, 중추신경 억제작용, 항암작용, 항균작용, 심혈관계에 대한 작용^{7,29)}, 장운동⁸⁾ 및 진통효과³¹⁾에 대한 연구 보고가 있었다.

白屈菜藥鍼液에 대한 연구는 많지 않은데 김³²⁾ 등은 白屈菜의 위궤양치료 효과를 실험적으로 설명하기 위해 中脘, 天樞에 鍼刺를 시행하여 위액분비량, 위액산도, 혈청 gastrin, 혈청 pepsinogen 및 혈청 secretin 함량에 있어 모두 유의성 있는 억제 효과가 나타났다고 보고하였다.

이에 저자는 白屈菜의 소염, 진통작용에 착안하여 LPS로 유도된 macrophage cell line인 RAW264.7 cell을 선정하여 白屈菜 藥鍼液을 처리한 후 白屈菜의 세포독성에 대해 관찰하기 위해 MTT 반응실험을 하였고, 또한 白屈菜 藥鍼이 염증 반응에 있어서 아라키돈산 대사에 관여되어지고 있는 COX-2, PGE₂와 NO에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 관찰하였다. COX-2의 mRNA 발현 양상의 관찰은 RT-PCR을 시행하였고, PGE₂의 분비량을 측정하는데는 competitive enzyme immunoassay 법을 시행하였으며, Griess assay를 사용하여 NO의 분비량을 측정하였다. 이 연구에서 이용한 RAW 264.7 cell은 대식세포주로서 IL-1 또는 INF- γ 등과 같은 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어 일반적으로 세포독성을 갖는 물질들의 독성검정을 위해 유용하게 사용되고 있다³³⁾. 한편 RAW 264.7 cell의 활성화는 실험실에서 흔히 사용되는 LPS를 이용하였는데, LPS는 동물에 각종의 실험적 자가 면역병을 유발하는 물질로³⁴⁾, 대식세포를 자극하여 IL-1의 분비를 유발하여 T림파구 응답을 촉진시키고³⁵⁾, 염증반응 매개물질인 TNF- α 의 분비를

유발시키며³⁶⁾, PGE₂의 생성도 증가시켜서³⁷⁾, 일과성의 급성염증을 유발할 수 있는 것으로 알려졌다.

白屈菜藥鍼液의 세포독성을 조사하기 위해 白屈菜藥鍼液 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml 및 10 mg/ml의 농도로 배양한 세포의 생존율을 관찰한 결과 대조군에 비해서 97.66±6.57 %, 95.11±7.49 %, 86.43±5.54 %, 62.99±6.28 %, and 61.11±5.97 %로 나타났다. 이러한 결과로 白屈菜藥鍼液은 1 mg/ml의 농도까지 RAW 264.7 대식세포에서 통계학적으로 유의한($p < 0.05$) 독성이 없음을 확인하였다.

白屈菜藥鍼液이 COX-2에 대한 RT-PCR을 시행하여 COX-2의 mRNA발현에 대한 효과를 상대적으로 평가하였다. 본 연구에서 실험군의 COX-2 mRNA 발현수준을 측정한 결과 LPS를 처리한 군에서는 10.24±2.12로 나타나서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면에 5 μ g/ml 농도의 LPS 및 0.1 mg/ml 白屈菜藥鍼液을 처리한 군에서는 6.85±0.68, 5 mg/ml 농도의 LPS 및 1 mg/ml 白屈菜藥鍼液을 처리한 군에서는 5.14±0.71로 나타나 LPS로만 처리한 군에 비해서 통계학적으로 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 나타내었다.

白屈菜藥鍼液이 PGE₂ 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 5 μ g/ml의 LPS를 처리하고 나서 PGE₂ 생성율을 조사한 결과 대조군에서는 118 ±21.11 pg/well 농도로 나타난 반면 대조군에서는 311±19.5 pg/well로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다. 이에 반하여 LPS에 白屈菜藥鍼液을 0.1 mg/ml 및 1 mg/ml로 처리한 군에서는 307±16.35 및 259±20.11로 나타나 LPS 처리군에 비해서 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다.

白屈菜藥鍼液이 NO 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 5 μ g/ml의 LPS를 처리하고 나서

NO 생성율을 조사한 결과 정상군에서는 0.98±0.02 μ M 농도로 나타난 반면 대조군에서는 16.02±2.27 μ M로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다. 이에 반하여 LPS에 白屈菜藥鍼液을 0.1 mg/ml 및 1 mg/ml로 처리한 군에서는 10.54±2.75 μ M 및 7.41±1.98 μ M로 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다.

현재까지 白屈菜藥鍼液의 항염증기전 및 효과에 대한 염증성 모델을 사용한 연구가 많지 않아 염증 억제 효과를 보인 蜂毒 등의 약침을 대상으로 한 연구와 비교 가능하다. 본 實驗 結果에 있어, RT-PCR을 시행하여 白屈菜藥鍼液의 LPS로 처리한 RAW 264.7 대식세포의 COX-2의 mRNA발현에 대한 효과를 평가한 결과 LPS로만 처리한 군에 비해서 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었는데, COX-2 발현 억제에 대한 연구에 있어 봉독의 경우, 류³⁸⁾ 등은 蜂毒주입이 아세트산 유발 복부 긴장 회수와 치상회에서의 COX-2발현이 억제됨을 보고하였고, 황³⁹⁾ 등도 蜂毒이 골육종세포주에서 COX-2 mRNA의 발현을 선택적으로 억제한다고 보고하였으며, 정⁴⁰⁾ 등은 蜂毒 藥鍼液이 염증 및 통증관련 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하는 과정에 COX-1과 COX-2 각각에 대한 발현 효과를 보고하여 白屈菜藥鍼液의 COX-2 발현 억제에 대한 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 또한 白屈菜藥鍼液이 NO의 분비량에 있어서도 NO의 생성을 억제시킴을 본 실험에서 관찰되었는데 김⁴¹⁾ 등이 白何首烏藥鍼液의 항산화효능과 면역반응에 미치는 효과를 연구하는 과정에서 유의성 있는 NO의 감소를 보고한 것과 같이 최근에는 다양한 약침 제재를 대상으로 하여 관절염 및 각종 염증에 대한 연구가 이루어지고 있다. 한편 조⁴²⁾ 등은 蜂毒藥鍼液의 성분별로 NO의 소거효과를 보고하여 apamin, melittin, MCD-peptide 藥鍼液에서

뚜렷한 효과가 없음을 보고하였고, Chen¹²⁾ 등의 연구에서는 baicalein, baicalin, wogonin에 의해 NO와 iNOS의 생성이 감소되었음을 보고 하였는데 향후 白屈菜 藥鍼液에 있어서도 그 성분 에 대한 각각의 연구가 이루어져 항염증효과를 생성하고 억제하는 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

이상의 결과는 白屈菜藥鍼液이 LPS 유도성 염증모델에 있어서 COX-2, NO 및 prostaglandin과 관련이 있음을 제시하는 것이며, 강력한 항염증효과가 있음을 보여 주는 것이다. 또한 말 초성 염증에 의해 증가된 COX-2와 NO 및 prostaglandin을 억제시키는 白屈菜藥鍼液의 항염증 효과는 류마티스 관절염과 같은 질환에도 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것이다. 향후 白屈菜藥鍼液을 이용한 항염증 효과에 대해 白屈菜의 성분 에 대한 연구 및 穴位에 따른 염증성 질환을 대상으로 하는 연구, 또한 NSAIDs 및 steroid 계통의 제재와 효과를 비교하는 등 다각적인 면에서 추가적 연구가 지속되어야 할 것이라 사려된다.

V. 結 論

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증반응에 白屈菜 藥鍼液이 COX-2의 발현조절, NO 생성조절 및 PGE₂ 생성에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 白屈菜藥鍼液은 RAW 264.7 대식세포에서 MTT에 의한 세포독성을 관찰한 결과 1mg/ml 농도 이전에서는 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 白屈菜藥鍼液은 LPS에 의해 유도된 염증 모델에서 증가된 COX-2의 발현을 억제시켰다.

3. 白屈菜藥鍼液은 LPS에 의해 유도된 염증 모델에서 증가된 NO의 생성을 감소시켰다.

4. 白屈菜藥鍼液은 LPS에 의해 유도된 염증 모델에서 증가된 PGE₂의 생성을 감소시켰다.

이상의 실험결과 LPS 유도성 염증모델에 있어서 白屈菜가 COX-2 mRNA, NO 및 PGE₂의 생성을 억제함으로써 강력한 항염증효과를 나타내며, 이러한 항염증효과는 류마티스 관절염과 같은 질환에도 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사려된다.

參 考 文 獻

1. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 1995 : 83-9.
2. Strock M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hamme C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic Kidney perfusion. *Transpl. Int.* 1994 ; 1 : S647-9.
3. Hikiji H, Shin WS, Koizumi T, Takato T, Susami T, Koizumi Y, Okai-Matsuo Y, Toyo-Oka T. Peroxynitrite production by TNF- α and IL-1 β : implication for suppression of osteoblastic differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 ; 278 : E1031-1037.
4. Rodnas J, Cabonell T, Mitjavila MT. Different roles for nitrogen monoxide and peroxy-nitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radic Biol Med.* 2000 ; 28 : 374-80.
5. Kufmann WE, Andresson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenase and the central

- nervous system. Prostaglandins. 1997 ; 54(3) : 601-24.
6. 李尙仁. 本草學. 서울 : 學林社. 1986 : 532-3.
 7. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京 : 人民衛生出版社. 1984 : 291.
 8. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典. 上海科學技術出版社. 1978 : 726-7.
 9. 上海中醫學院編. 中醫臨床手冊. 中國 : 上海人民出版社. 1977 : 246.
 10. 宋彥錫. 加味疎風活血湯 藥鍼이 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1990 ; 7(1) : 19-38.
 11. Chi YS, Cheon BS, Kim HP. Effect of wogonin, a plant flavon from *Scutellariae Radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol.* 2001 ; 61 : 1195-203.
 12. Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ, Yang LL. Wogonin, baicalein and baicalin inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol.* 2001 ; 61 : 1417-27.
 13. Chou TZC, Earl Fu, Shen EC. Chitosan inhibits PGE2 formation and COX-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Com.* 2003 ; 308 : 403-7.
 14. 노태철, 최희철, 김보연, 김영호, 안종석, 김영국, 이현선. 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 nitric oxid 생성 저해활성. 생약학회지. 1999 ; 30(4) : 413-6.
 15. 구민숙, 윤종화, 김경호, 장준혁, 이승덕, 김갑성. 호도약침이 생쥐의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 88-94.
 16. 姜秀一. 穴位別 草烏藥鍼자극이 흰쥐의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. 경희한의대 논문집. 1990 ; 13 : 203-7.
 17. 장통영. 牛膝藥鍼이 Rat의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000 ; 21(3) : 77-87.
 18. 李鐘國. 防風藥鍼이 진통, 소염, 해열 및 진경에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1986 ; 3 : 11-23.
 19. 鄭喜善. 附子藥鍼이 진통 및 소염작용에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997 ; 14(1) : 336-46.
 20. 鄭元在. 木通藥鍼자극의 항염증 작용 및 진통에 관한 실험적 연구. 대한 침구학회지. 1997 ; 14(1) : 324-36.
 21. 김영진. 鹿茸藥鍼이 진통효과에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1987 ; 4 : 49-74.
 22. Chang J, Musser JH, Mcgregor H. Phospholipase A₂ function and pharmacological regulation. *Biochem Pharmacol.* 1987 ; 36 : 2429-36.
 23. 문진영. 柴胡藥鍼의 생체방어 효능연구. 동국대학교 박사학위 논문. 1997 ; 1-97.
 24. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998 ; 12(12) : 1063-73.
 25. 대한통증학회. 통증의학. 서울 : 군자출판사. 2000 : 8-26.
 26. Giatgen A. The Dual Role of nitric oxide in Islet β -cell. *New Physiol Sc.* 1999 ; 14 : 49-53.
 27. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The

- surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*. 1993 ; 26-38.
28. Knowles RG, Moncada S. Nitric Oxid as a signal in blood vessels. *TIBS*. 1990 ; 17 : 399-402.
29. 劉壽山. 中藥研究文獻摘要. 科學出版社. 1979 : 182-183, 250-251.
30. 韓宗鉉. 白屈菜의 藥理作用에 關한 研究. 大韓 韓醫學會誌. 1985 ; 6(2) : 128-33.
31. 白屈菜水鍼이 鎮痛效果에 미치는 影響. 圓光大學 學校大學院 碩士學位論文. 1989
32. 김용득, 권기록, 이준무. 백굴채수침, 전탕액 투여 및 침자가 Indomethacin으로 유발된 백서의 위궤양에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 1995 ; 12(2) : 177-92.
33. 염정호. 니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 NO의 역할. *대한 산업의학회지*. 2001 ; 13(3) : 274-7.
34. 오찬호 역. 신면역학입문. 서울 : 지구문화사. 1995 : 118-23.
35. Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T, Takagi K, Yoshinaga M. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1993 ; 93(2) : 206-11.
36. Bomalaskim JS, Ford T, Hudson AP, Clark MA. Phospholipase A2 -activating protein induces the synthesis of IL-1 and TNF in human monocyte. *J Immunol*. 1995 ; 154(8) : 4027-31.
37. Noyori K, Okamoto R, Takagi T, Hyodo A, Suzuki K, Koshino T. Experimental induction of arthritis in rats immunizwd with Escherichia coli O:14 lipopolysaccharide. *J Rheumatol*. 1994 ; 21(3) : 484-8.
38. 류은경, 최도영, 이재동. 세포증식과 COX-2 발현에 미치는 蜂毒의 효과. *대한침구학회지*. 2003 ; 20(2) : 112-22.
39. 황대연, 김호현, 김창주, 김이화. 蜂毒이 골육종 세포주에서 세포사멸 및 COX-2 억제에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2003 ; 20(3) : 63-74.
40. 정혜윤, 고희균. 蜂毒 藥鍼液이 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2002 ; 19(3) : 41-50.
41. 김동현, 서정철, 임성철, 정태영, 한상원. 白何首烏藥鍼의 NO, DPPH 소거 및 IL4 억제효과. *대한침구학회지*. 2003 ; 20(4) : 42-52.
42. 조태성, 윤현민, 송춘호, 장경진, 안창범. 蜂毒 藥鍼의 NO 소거 및 chemokine 유전자 발현에 대한 효과. *대한침구학회지*. 2003 ; 20(4) : 53-65.
43. 박순영. 의학통계학. 서울 : 경희대학교출판국. 1998 : 162-83.