

三妙丸의 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cells과 BV-2 Microglia cells로부터 생성되는 nitric oxide 및 TNF- α 의 생성억제효과

이제현[#], 정효원, 박용기^{*}

동국대학교 한의과대학 본초학교실

Inhibitory effects of Sam-Myo-San on the LPS-induced production of nitric oxide and TNF- α in RAW 264.7 cells and BV-2 Microglia cells

Jae-Hyun Lee[#], Hyo Won Jung and Yong Ki Park^{*}

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

ABSTRACT

Objectives : Sam-Myo-Whan(SMW) has been known traditional prescription with anti- arthritis activities. We investigated inhibitory effects of SMW on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide(NO), TNF- α and inducible nitric oxide synthase(iNOS) production from RAW264.7 cells and BV-2 Microglia cells.

Methods : SMW, which had been extracted with 70% MeOH, concentrated and freeze-dried was used for this experiment. After BV2 mouse brain macrophages and RAW264.7 mouse peritoneal macrophages were pretreated with increasing concentrations of SMW extract for 30min, and then activated with LPS. To investigate cytotoxicity of SMW extract, cell viability was measured by MTT assay. NO production was measured in each culture supernatant by Griess reaction. mRNA expression of iNOS in two type cells was investigated by RT-PCR. TNF- α production was measured in each culture supernatant by ELISA.

Results : SMW extract significantly inhibited LPS-induced NO and TNF- α production in BV2 cells and RAW264.7 cells dose-dependently. SMW extract also greatly suppressed mRNA expression of iNOS in both type cells activated with LPS.

Conclusion : These data suggests that SMW extract may have an anti-inflammatory effect through the inhibition of iNOS expression.

Key words : Anti-inflammation, BV2 microglial cells, inducible nitric oxide synthase, lipopolysaccharide, nitric oxide, RAW264.7 macrophage cells, Sam-Myo-Whan extract.

*교신저자: 박용기, 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: (054-770-2661 · E-mail: yongki@dongguk.ac.kr

#제1저자: 이제현, 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· 접수 : 2006년 11월 1일 · 수정 : 2006년 11월 19일 · 채택 : 2006년 12월 20일

서론

대식세포(macrophage)는 항원작용, 식작용 및 면역반응조절작용을 가지는 면역세포로서 자연면역 뿐 아니라 획득면역반응에서도 중요한 역할을 하여 숙주의 방어 및 항상성 유지에 관여한다^{1,3)}. 대식세포는 외부자극에 의해 활성화됨으로써 TNF- α , IL-1과 같은 염증사이토카인이나 iNOS와 COX-2에 의해 생성되는 reactive oxygen species(ROS), nitric oxide(NO), prostaglandin(PEG) 등의 염증매개물질을 다량 분비함으로써 염증반응을 유발하여 감염초기 반응에 관여함으로써 염증질환 발달에 기여하게 된다⁴⁾. 또한 뇌의 대식세포인 microglia는 감염, 타박상, 부종, 허혈 등에 의한 조직손상 시 활성화되어 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8 등의 염증사이토카인이나 FGF- β , TGF- β 1, nerve growth factor(NGF) 등의 성장인자, brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), NT-4/5 및 NO 등을 다량 분비함으로써 항원을 제거(scavengers)하는 고전적인 기능을 함과 동시에 손상된 부위에 염증반응을 유발함으로써 뇌졸중(stroke), 외상(trauma), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease) 등과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병에도 기여하게 된다⁵⁾.

NO는 외부항원의 자극으로 활성화된 대식세포에서 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 free radical로서 혈관 내 항상성 유지(vascular homeostasis), 신경전달(neurotransmission), 혈액응고, 항암작용(anti-tumor activity) 및 세포독성(cell toxicity) 등 다양한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{2,6)}. NOS는 Ca²⁺의 의존성에 따라 constituent NOS(cNOS), inducible NOS(iNOS)로 구별되는데 cNOS는 Ca²⁺에 의존적으로 짧은시간 동안 소량의 NO를 생성하여 세포의 정상적인 항상성 유지에 기여하게 되며, 특히 신경세포에 존재하는 neuronal NOS(nNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial NOS(eNOS)가 있다⁷⁾. 반면, 세포내 Ca²⁺의 농도에 비의존적으로 대식세포, 간세포, 평활근세포, 내피세포 및 심근세포 등 다양한 세포에서 lipopolysaccharide(LPS) 또는 interferon- γ (IFN- γ), IL-1, TNF- α 등과 같은 사이토카인의 자극에 의해 활성화되어 장시간 다량의 NO 생성에 관여한다⁸⁾. 이렇게 생성된 NO는 세포독성물질로 작용하여 패혈증(sepsis), 출혈이나 쇼크 등을 유발하고 염증을 유발

하게 된다. 따라서 대식세포로부터의 과도한 NO 생성을 억제하는 염증반응조절제에 대한 연구가 만성염증질환이나 동맥경화, 퇴행성 뇌질환 등에서 많이 이루어지고 있으며 특히 한약분야에서 이러한 조절제를 찾으려는 노력이 주로 진행되고 있다^{9,17)}.

三妙丸(Sam-Myo-Whan; SMW)은 虞搏의 醫學正傳에 최초로 수록된 處方으로 蒼朮, 黃柏, 牛膝의 3가지 약재를 生薑鹽湯으로 服用하는 것인데, 清熱燥濕作用이 있어 肝腎不足과 濕熱下注로 인한 腰腿疼痛麻木, 脚氣, 濕瘡, 淋病, 白帶 등 症狀을 치료하는데 사용하는 처방이다^{18,19)}. 三妙丸은 丹溪心法에 記載된 二妙散의 薑汁調服하는 處方에 加味한 것인데, 蒼朮과 黃柏을 동일한 비율로 사용하여 濕熱下注로 인한 下肢가 아위고 저린 것뿐 아니라 濕疹 및 婦女帶下 등의 症狀을 치료하는 것으로,^{33,34)} 여기에 瘀血과 血熱로 인한 腰膝骨痛에 散瘀血 補肝腎하는 牛膝을 추가하여 만든 처방이다. 현재 三妙丸에 대한 염증치료효과는 아직 연구가 되어 있지 않고, 이묘산의 항산화효과가 보고된 바 있다⁹⁾. 그러므로 본 처방은 임상에서 관절염과 같은 염증성 질환에 다용하는 처방이므로 염증을 관여하는 면역계에 어떤 기전으로 관여하는 가를 알아 보기위하여 대식세포주를 이용하여 염증 치료효과를 실험하고자 한다.

따라서 본 연구에서는 三妙丸 抽出物을 제조하여 쥐의 대식세포주인 RAW264.7 cells 및 뇌 대식세포주인 BV2 세포에 LPS 처리에 의해 유도되는 NO 생성의 억제효과를 조사하여 관절염 등 각종 염증질환 및 퇴행성뇌질환 치료제로서의 가능성을 타진해보고자 한다.

재료 및 방법

1. 三妙丸 抽出物 제조

본 실험에 사용된 三妙丸의 구성 및 비율은 표 1과 같다. 약재 10배 분량의 70% Methanol을 가한 다음 3시간 동안 2회 추출하였으며 그 여액을 2겹 여과지로 여과하고 회전식 증발기(rotary evaporator)로 감압농축한 후 동결건조하여 -80°C에서 보관하였다. 三妙丸 抽出物의 회수량은 총 75g이었으며, 세포에 처리 시 정량을 100mg/ml 농도로 DMSO로 녹인 후 filter하여(0.45 μ m) 사용하였다.

Table 1. Composition and contents of Sam-Myo-Whan

약재명	생약명	사용량(g)
黄柏	Phellodendri cortex	225
苍朮	Atractylodis rhizoma	150
牛膝	Achyranthis bidentatae radix	70
Total		
445(g)		
Extract/ Yield		
(g) / 17.5%		

2. 세포배양

쥐의 뇌대식세포주(brain microglia line)인 BV2 세포 및 복강대식세포주(peritoneal macrophage line)인 RAW264.7 세포를 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone), 100U/mL penicillin(GibcoBRL) 및 streptomycin(GibcoBRL)이 포함된 DMEM(Hyclone) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3. 세포독성(cytotoxicity) 검정

BV2 세포(5×10⁴cells/well) 및 RAW264.7 세포(2×10⁴cells/well)를 96-well culture plate(Nunc)에 100 μ l 배지와 함께 하룻밤 배양한(37°C, 5% CO₂) 후, 여러 농도(0.05~1 mg/ml)의 三妙丸 抽出物을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 여기에 MTT 용액(Roche) 10 μ l씩 넣고 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, 100 μ l의 DMSO 용액 첨가하여 formazan 결정을 용해하였다. 이를 microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 550~600nm에서 흡광도를 측정하고 세포독성정도는 무처리군 100%를 기준으로 상대적인 세포생존율(cell viability)의 퍼센트(%)로 나타내었다.

4. Nitric oxide 생성량 측정

각 세포로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중 존재하는 NO₂의 형태를 Griess 시약반응을 이용하여 측정하였다. 즉, BV2 세포(5×10⁵cells/ml) 및 RAW264.7 세포(2×10⁵cells/ml)를 24-well culture plate에 배양하고 三妙丸 抽出物을 농도별로 처리한 다음 30분간 배양한 다음 1 μ g/ml 농도로 LPS를 처리하여 24시간 배양하면서 세포를 활성화시켰다. 각 세포로부터의 생성된 NO의 양은 세포 배양액을 수거한 후 배양액 50 μ l에 Griess 시약

(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) 100 μ l를 넣고 15분간 암반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도(μ M)는 NaNO₂ 표준액을 기준으로 측정된 농도를 기준으로 환산하여 계산하였다.

5. iNOS 유전자의 발현

세포로부터 NO의 합성효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 유전자 발현을 조사하기 위해 BV2 세포(5×10⁵cells/ml) 및 RAW264.7 세포(2×10⁵cells/ml)를 6-well plate에 하룻밤 배양한 다음 三妙丸 抽出物을 농도별(0.05~1 mg/ml)로 30분간 전처리하였다. 여기에 LPS를 1 μ g/ml 농도로 처리하여 3시간 동안 배양한 후 세포를 수거하여 5,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 수집된 세포들로부터 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 분리한 다음, oligo-(dT) primer와 Improm-IITM reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15min 조건으로 cDNA를 합성하였다. 두 세포의 mRNA로부터 합성된 cDNA 1 μ g에 iNOS primers[Forward, 5'-GAC CAG TAT AAG GCA AGC AC-3'; Reverse, 5'-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC-3'] 및 10 \times buffer(10mM Tris- HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 1U *Tag* polymerase(Takara) 등을 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 58°C에서 30초 및 extension을 위해 70°C에서 60초 조건에서 35 cycles로 PCR을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조군으로 GAPDHs[Forward, 5'-CTC GTG GAG TCT ACT GGT GT-3'; Reverse, 5'-GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT-3']를 사용하였다.

6. TNF- α 의 측정

대표적인 염증사이토카인인 TNF- α 생성에 대한 三妙丸 抽出物의 효과를 조사하기 위해서 BV2 세포 및 RAW264.7 세포로부터 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 농도를 두 세포의 배양액으로부터 Ready-Set-Go mouse TNF- α Cyto-SetsTM Biosource ELISA kit(eBioscience)를 이용하여 측정하였다. 즉, 1 \times coating solution에 250배로 희석한 capture Ab를 100 μ l씩 96-well ELISA plate(Nunc)의 각 well에 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음

날 plate를 0.05% Tween-20이 포함된 1× PBS-T로 3회 세척하고 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 1× assay solution으로 plate를 1시간동안 실온에서 blocking 하였다. Assay solution을 제거한 다음, 세포 배양액 100 μ l을 넣어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 5회 PBS-T로 세척한 후 250배로 희석한 detection antibody를 100 μ l씩 넣고 1시간 실온에서 반응시켰다. 이를 다시 PBS-T로 3회 세척한 다음 avidin-HRP solution을 넣어 30분간 실온에서 암반응 시켰다. Plate를 3회 세척한 후 기질용액을 넣고 15분간 암반응 시킨 다음 반응정지액 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지시키고 microplate reader의 450nm 흡광도에서 반응정도를 측정하였다. 활성화된 세포로부터 생성된 각 사이토카인의 양은 recombinant cytokine 표준단백질의 흡광도를 기준으로 농도(pg/ml)를 계산하였다.

7. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균 \pm 평균표준오차(standard deviation; SD)로 나타내었으며 통계학적 분석은 Student *t*-test로 검정하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 三妙丸 抽出物の 세포독성검정

三妙丸 抽出物에 의한 BV2 세포 및 RAW264.7 세포에서의 세포독성(cell toxicity)을 평가하기 위해서 각 세포에 0.05~1mg/ml의 三妙丸 抽出物을 처리한 후 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1).

먼저, BV2 세포에서는(Fig. 1A) 세포만 배양한 무처리구 생존율(100%)을 기준으로 三妙丸 抽出物の 처리농도 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.5mg/ml 및 1mg/ml에서 96.89 \pm 3.51% (mean \pm SD), 90.98 \pm 4.33%, 81.95 \pm 2.95%, 56.51 \pm 4.66% 및 33.18 \pm 2.32%로 측정되었다. 또한 RAW264.7 세포의 경우에는(Fig. 1B), 三妙丸 抽出物 처리농도 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.5mg/ml 및 1mg/ml에서 각각 103.6 \pm 3.91%, 92.98 \pm 1.77%, 90.62 \pm 3.15%, 79.84 \pm 1.42% 및 73.18 \pm 2.32%로 측정되었다. 따라서 BV2 세포에 대한 三妙丸 抽出物の 세포독성은 0.5mg/ml 농도부터 나타났으며, RAW264.7 세포에 대한 三妙丸 抽出物の 세포독성은 BV2 세포에서 보다 높은 농도인 1mg/ml 농도부터 나

타났다. 따라서 이후 실험은 세포독성이 없는 범위의 三妙丸 抽出物 농도를 사용하였다.

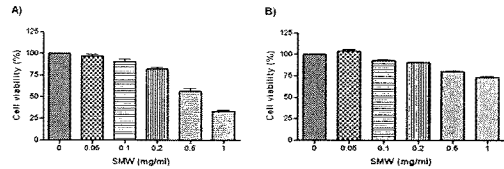


Fig. 1. Cell cytotoxicity of Sam-Myo-Whan extract in BV2(A) and RAW264.7(B) cells. After cells were cultured with increasing concentrations of Sam-Myo-Whan(SMW) extract with LPS for 24h, cell viability was determined in the culture supernatants by MTT assay. The results show mean value of three independent experiments(SD - bars).

2. 三妙丸 抽出物の nitric oxide 생성억제효과

三妙丸 抽出物이 LPS 처리에 의해 활성화된 대식세포로부터의 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 三妙丸 抽出物을 세포에 전처리하고 LPS로 활성화시킨 후 세포로부터 생성되는 NO의 양을 Griess reagent로 측정하였다.

BV2 세포의 경우 세포만 배양한 무처리 대조구에서는 NO의 생성이 5.1 \pm 0.21 μ M로 거의 검출되지 않은 반면, LPS 처리 시 세포가 활성화됨으로써 NO의 생성이 20.37 \pm 0.22 μ M 농도로 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 三妙丸 抽出物을 전처리할 경우에는 三妙丸 抽出物 처리농도 0.01mg/ml, 0.02mg/ml, 0.05mg/ml, 0.1mg/ml 및 0.2mg/ml에서 각각 19.77 \pm 0.11 μ M, 16.2 \pm 0.06 μ M, 14.56 \pm 0.13 μ M, 13.27 \pm 0.12 μ M 및 9.64 \pm 0.25 μ M 농도로 검출되었으며, 三妙丸 抽出物 농도에 의존적으로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 한편, RAW264.7 세포의 경우(Fig. 2B)에도 BV2 세포에서와 마찬가지로 대조구에서는 NO가 거의 검출되지 않았으며(1.32 \pm 0.01 μ M) LPS 처리에 의해 현저히 증가하였다(21.49 \pm 0.04 μ M). 또한 SMS 처리농도 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.5mg/ml 및 1mg/ml에서 20.91 \pm 0.02 μ M, 16.49 \pm 5.02 μ M, 14.79 \pm 0.03 μ M, 10.81 \pm 0.11 μ M 및 8.39 \pm 2.16 μ M 농도의 NO가 검출되었다. 이를 통해 LPS 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 세포로부터 분비되는 NO는 SMS 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되어짐을 알 수 있었다.

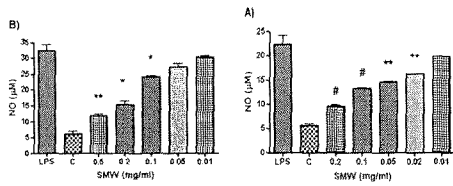


Fig. 2. Inhibitory effect of Sam-Myo-Whan on LPS-induced nitric oxide production from BV2(A) and RAW264.7(B) cells. Cells were incubated with increasing concentrations of Sam-Myo-Whan(SMW) extract in the presence of LPS(1 μ g/ml) for 24h. NO production from cells was determined in culture supernatants by Griess reagent. The results show mean value of three independent experiments(SD - bars). * p <0.001, ** p <0.01 and † p <0.05 vs. LPS-treated group, n=3.

3. 三妙丸 抽出物에 의한 iNOS mRNA 발현억제효과

三妙丸 抽出物에 의한 LPS에 의해 유도되는 NO 생성에 대한 억제효과가 NO 합성효소인 iNOS와 어떤 연관성이 있는지 조사하기 위해서 BV2 세포 및 RAW264.7 세포에 三妙丸 抽出物 0.2mg/ml와 0.5mg/ml을 전처리한 후 LPS 자극으로 활성화시키고 mRNA를 분리하여 iNOS에 대한 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 3).

BV2 세포(Fig. 3A) 및 RAW264.7 세포(Fig. 4B) 모두에서 세포만 배양한 무처리 대조군에서는 iNOS의 유전자 발현이 관찰되지 않은 반면, LPS 처리 후 두 세포 모두 iNOS의 유전자 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 또한 LPS 자극에 의해 유도된 iNOS의 유전자 발현이 BV2 세포 및 RAW264.7 세포 모두에서 三妙丸 抽出物의 전처리 후 강하게 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 三妙丸 抽出物에 의한 활성화된 대식세포에서의 NO 생성억제효과는 iNOS의 유전자발현 억제효과와 연관되는 것으로 나타났다.

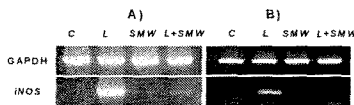


Fig. 3. Inhibitory effect of Sam-Myo-Whan extract on mRNA expression of iNOS in BV2(A) and RAW264.7(B) cells. Cell were incubated with 0.2mg/ml(for BV2 cells) and 0.5mg/ml(for RAW264.7 cells) of Sam-Myo-Whan(SMW) extract without or with LPS for 3h. mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR. L, LPS-treated group.

4. 三妙丸 抽出物에 의한 TNF- α 생성억제효과

三妙丸 抽出물이 LPS 자극으로 활성화된 대식 세포로부터의 염증사이토카인 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 BV2 세포 및 primary microglia에 三妙丸 抽出物을 전처리한 후 세포배양액으로부터 ELISA 방법으로 TNF- α 의 생성 양을 측정하였다.

그 결과, 세포만 배양한 대조군의 경우에는 BV2 세포(Fig. 4A) 및 RAW264.7 세포(Fig. 4B)에서 각각 77.65 \pm 1.89pg/ml 및 97.65 \pm 1.13pg/ml의 매우 낮은 농도의 TNF- α 가 검출되는 반면, LPS로 자극할 경우, 1389 \pm 155.1pg/ml 및 1522 \pm 97.90pg/ml이 검출되어 LPS 자극에 의해 세포로부터 TNF- α 생성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 반면, BV2 세포에서 LPS 처리에 의해 증가된 TNF- α 의 생성양은 삼칠근 추출물 처리농도 20 μ g/ml에서 1244 \pm 50.86pg/ml, 50 μ g/ml에서 1075 \pm 42.72pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 900 \pm 58.05pg/ml 및 200 μ g/ml 농도에서 546.1 \pm 53.59pg/ml로 측정되어 三妙丸 抽出物 처리농도에 처리농도에 의존적이고 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 RAW264.7 세포에서도 LPS 처리 후 증가된 TNF- α 생성이 三妙丸 抽出物 처리농도 50 μ g/ml에서 1244 \pm 50.86pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 1175 \pm 102.11pg/ml, 200 μ g/ml 농도에서 966.9 \pm 16.27pg/ml 및 500 μ g/ml 농도에서 746.1 \pm 46.77pg/ml로 三妙丸 抽出物 처리농도에 의존적이고 유의적으로 억제되었다.

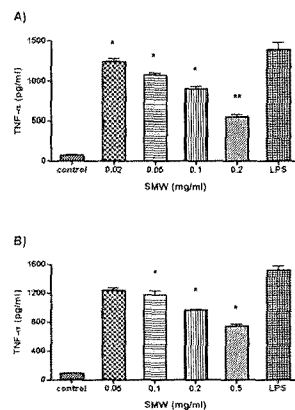


Fig. 4. Inhibitory effect of Sam-Myo-Whan extract on LPS-induced TNF- α production in BV2 cells(A) and RAW264.7 cells(B). Cells were incubated with increasing concentrations of Sam-Myo-Whan (SMW) extract in the presence of LPS(1 μ g/ml) for 14h. TNF- α production from cells was determined in culture supernatants by ELISA. † p <0.01 and †† p <0.05 vs. LPS alone, n=3.

고찰

대식세포(macrophage)는 동물체내의 모든 조직에 존재하는 면역세포로서 외부 이물질을 포식하고 탐식하여 죽은 세포를 제거하는 고전적인 기능 외에 TNF- α , IL-1, IL-6 등의 염증사이토카인이나 eicosanoids, ROS, NO, superoxide(O₂⁻) 등의 염증물질을 다량 분비함으로써 염증질환 발달에 기여한다^{1,3)}. NO는 대식세포 및 간세포(hepatocyte)에서 L-arginine으로부터 iNOS에 의해 합성되는데, 특히 LPS나 IFN- γ 등의 자극으로 활성화된 대식세포로부터 과도하게 생성되면 세포독성과 염증반응을 유발하는 요인이 되어 다양한 만성염증성질환 발달에 기여하게 된다^{8,20)}. 따라서 최근에는 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO 생성을 효과적으로 억제할 수 있는 조절제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며 다양한 염증질환의 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다^{20, 22)}.

三妙丸(Sam-Myo-Whan; SMW)은 虞搏의 醫學正傳에 최초로 수록된 處方으로 蒼朮, 黃柏, 牛膝의 3가지 약재를 生薑鹽湯으로 服用하는 것인데, 淸熱 燥濕 作用이 있어 肝腎不足과 濕熱下注로 인한 腰腿疼痛麻木, 脚氣, 濕瘡, 淋病, 白帶 등 症狀를 치료하는데 사용하는 처방이다^{18,19)}. 三妙丸은 丹溪心法에 記載된 二妙散의 薑汁調服하는 處方에 加味한 것인데, 蒼朮과 黃柏을 동일한 비율로 사용하여 濕熱下注로 인한 下肢가 야위고 저린 것뿐 만 아니라 濕疹 및 婦女帶下 등의 증상을 치료하는 것으로, 여기에 瘀血과 血熱로 인한 腰膝骨痛에 散瘀血 補肝腎하는 牛膝을 추가하여 만든 처방이다. 그러므로 肝腎이 虛하여 濕熱이 筋骨에 쌓여 생긴 질환으로 牛膝은 補肝腎 強筋骨하고 蒼朮과 黃柏은 下焦에 들어가서 濕熱을 없애는 약이다.

三妙丸에 대한 연구는 아직 연구가 되어 있지 않고, 二妙散은 Ling Dong Kong에 의하여 항산화효과를 보고한 바 있으며, 임²³⁾은 二妙散이 대식세포로부터의 염증매개물질인 NO, iNOS 및 PEG2의 생성억제를 통한 항염증효과로 류마티스 관절염과 같은 염증질환치료효과가 있음을 보고한 바 있다.

그러므로 三妙丸은 임상에서 관절염과 같은 염증성 질환에 다용하는 처방이므로 염증에 관여하는 면역계에 어떤 기전으로 관여하는 가를 알아 보기 위하여 두 가지의 대식세포주를 이용하여 염증 치료효과를 실험하고자 한다.

따라서 본 연구에서는 LPS 자극에 의해 활성화

된 대식세포로부터 다량 분비되는 염증매개물질에 대한 三妙丸 抽出物の 효능을 검증하고 이로써 관절염 및 퇴행성 뇌질환에서의 염증반응을 개선시킬 수 있는 조절제로 개발하고자 수행되었다.

그 결과, 三妙丸 抽出物은 BV2 세포 및 RAW264.7 세포 모두에서 LPS에 의해 유도되는 NO 생성을 농도의존적이고 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig.2). 활성산소종의 일종인 NO는 L-arginine으로부터 NO 합성경로(NO synthase pathway; NOS)를 통하여 생성되는 작은 분자량(short-lived)의 자유라디칼로서 LPS나 IFN- γ , TNF- α 또는 β -amyloid 등의 자극원에 의해 대식세포로부터 NO 합성효소인 iNOS가 합성되고, NO free radical이 산소와 반응함으로써 peroxynitrite(ONOO⁻)를 형성하여 pro-oxidant molecule인 NO가 다량 생성되어 강력한 세포독성을 나타내게 된다^{20,21)}. 대식세포를 활성화시키는 다양한 자극원 중 특히 LPS에 의해 활성화되는 경우, LPS 신호전달경로를 통해 NF- κ B가 활성화되고 iNOS mRNA 발현이 유도되어 iNOS 합성경로에 의존적으로 NO가 생성되게 된다²³⁾. 본 연구결과에서 三妙丸 抽出物은 LPS에 의해 활성화된 두 종류의 대식세포로부터 iNOS 유전자 발현을 강력하게 억제시킴으로서(Fig. 3) NO 생성도 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 iNOS 발현을 차단함으로써 NO 생성을 억제시킬 수 있는 三妙丸 抽出物이 다양한 염증성 질환치료에 효과적일 수 있음을 알 수 있었다. 비록 한방 처방 抽出物의 iNOS 생성에 대한 cellular mechanism이 아직 정확하게 밝혀져 있지 않지만, NO 생성을 억제하는 약물의 경우 전처리가 iNOS promoter activity를 억제하거나 iNOS 유전자의 전사(transcription)를 억제하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

한편, bacterial endotoxin인 lipopolysaccharide(LPS)는 염증을 유발하는 주요 자극원으로서⁴⁾, 대식세포를 활성화시켜 NO, TNF- α , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory peptide-1 α (MIP-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 등 염증반응 매개물질을 분비하게 하며, 이와 같은 세포독성물질은 조직 내 염증반응을 촉진시킴으로써 병 발달에 기여하게 된다^{5,8)}. 따라서 최근에는 한약제 抽出物을 이용하여 병원균 감염(microbial infection)에 의한 염증질환이나 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 신부전증(renal failure)과 같은 만성염증성 질환(chronic inflammatory disease)이나 퇴행

성뇌질환(neurodegenerative disease)과 같은 다양한 염증질환을 대상으로 NO와 같은 염증매개물질의 생성이나 활성을 억제할 수 있는 항염증 효과에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{9, 13)}. LPS는 특히 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF)와 관련하여 강력한 염증반응을 유도하는데 TNF- α 를 포함한 다양한 전염증사이토카인 분비를 통해 대식세포는 LPS에 대한 면역반응을 하게 된다²⁷⁾. TNF- α 는 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 다량 분비되어 패혈증(septic shock)이나 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에서 병 발달에 매우 중요한 역할을 하는 사이토카인이며, TNF- α 의 증가는 암, 약액질(cachexia), 당뇨, 비만 등 대사성질환에서 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다^{27, 30)}. 최근에는 대식세포의 LPS 인식기전의 이해 및 염증유발 관련 유전자의 발굴, 나아가 이들의 조절을 통한 염증질환 치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 LPS에 의해 활성화된 대식세포로부터 과도하게 분비되는 TNF- α 를 효과적으로 억제시킬 수 있는 약제 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다^{30, 32)}. 본 연구결과에서 三妙丸 抽出物은 BV2 세포 및 RAW264.7 세포에서 모두 LPS에 의해 유도된 TNF- α 생성을 농도의존적이고 유의적으로 감소시키는 것으로 조사되었다(Fig. 4).

결론적으로 三妙丸 抽出物은 BV2 세포 및 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 및 TNF- α 와 같은 염증매개물질의 생성을 효과적으로 억제시키고 iNOS의 유전자발현을 조절함으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 따라서 三妙丸 抽出物은 단독 또는 기타 약제와의 혼합을 통해 차후 관절염 및 퇴행성 뇌질환을 포함한 다양한 염증성 질환을 개선하기 위한 치료제로 개발 가능할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 염증성질환 및 퇴행성 뇌질환의 치료를 위한 항염증 한약제를 개발하기 위해서 뇌대식세포주인 BV2 microglial cells 및 복강대식세포주인 RAW264.7 cells을 이용하여 三妙丸 抽出物의 항염증효과를 확인하였다. 三妙丸 抽出物의 세포독성은 BV2 세포에서는 0.2mg/ml 농도까지 나타나지 않았으며, RAW264.7 세포에서는 0.5mg/ml 농도까지 나타나지 않았다. LPS 처리에 의해 BV2 세포 및 RAW264.7 세포로부터 생성된 NO 및 TNF- α 는 三妙丸 抽出物의 처리농도에 의존적이고 유의적으로 감소

되었다. 두 종류 대식세포로부터 LPS에 의해 유도된 iNOS 유전자 발현이 三妙丸 抽出物 처리에 의해 강력하게 억제되었다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 교원해외연수 지원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* 1990;144:1425-1431.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol.* 1997;15:323-350.
- Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Report* 2000;2:216-224.
- Murabe Y, Sano Y. Morphological studies on neuralgia. VI. Postnatal development of microglia cells. *Cell Tissue Res.* 1982;225:469-485.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8514-9.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:301-9.

10. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 2000;35:21-8.
11. Kaniyama H, Takano S, Ishikawa E, Tsuboi K, Matsuura A. Anti-angiogenic and immunomodulatory effect of the herbal medicine "Juzen-taiho-to" on malignant glioma. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:2111-6.
12. Kim YJ, Park JW, Lee MJ, Kim JK and Cho DY. Nitrite scavenging activity of water-extract from *Scutellaria baicalensis* Georgia and *Coptis chinensis* Franch. *J. Oriental Med. Pathol.* 2000;14:108-118.
13. Bae JH. Antimicrobial effect of *Plagiorhegama dubium* extracts on food-borne pathogen. *Korean J. Food & Nutr.* 2005;18:81-87.
14. An BJ, Lee JT, Lee CE, Kim JH, Son JH, Kwak JH, Lee JY, Park TS, Bae HJ, Jang MJ and Jo C. A study on physiological activities of *Coptidis rhizoma* and application for cosmetic ingredients. *Kor. J. Herbalogy.* 2005;20:83-91.
15. Chun SC, Jee S. and Lee S. The antimicrobial activity of *Naesohwangryuntang* and its composition oriental medicines. *Kor. J. Herbalogy* 2004;19:51-60.
16. Kim DI, Jung HJ, Jung SK and Lee HG. The inhibitory effects of *schzandrae fructus* and *coptidis rhizoma* on the IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level of BEAS-2B human epithelial cells. *K.H.M.* 2001;17:199-213.
17. Hattori T, Furuta K, Nagao T, Nagamatsu T, Ito T and Shzuki Y. Studies on the antinephritic effect of plant components(4): Reduction of protein excretion by berberine and coptisine in rats with original-type anti-GMB nephritis. *Jpn J. Pharmacol.* 1992;59:156-169.
18. 虞搏 醫學正傳, 서울, 성보사, 1986. p.227.
19. 彭懷仁 主編: 南京中醫學院, 中醫方劑大辭典(1 권), 北京, 인민위생출판사, 1993. p.552.
20. E. Moilanen, B. Whittle and S. Moncada, Nitric oxide as a factor in inflammation. In: J.I. Gallin and R. Snyderman, Editors, *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, Williams and Wilkins, Philadelphia. 1999:787 - 800.
21. A. Hobbs, A. Higgs and S. Moncada, Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191 - 220.
22. L. Sautebin, Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy, *Fitoterapia.* 2000;71:S48 - S57.
23. 임창경. 이프산의 항류마티즘 효과에 대한 연구. 2004. 원광대학교 대학원
24. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
25. S. Moncada, R.M. Palmer and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol Rev.* 1991;43:109 - 142.
26. H. Kleinert, C. Euchenhofer, I. Ihrig-Biedert and U. Forstermann, Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kB, *Mol Pharmacol.* 1996;49:15 - 21.
27. Guha M and Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling* 2001;13:85-94.
28. Meme W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J.* 2006;20:494-6.
29. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke.* 1997;28:1233-44.
30. Merrill JE. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev. Neurosci.* 1992;14:1-10.
31. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 1998;273:974-80.
32. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future

- therapeutic targets: a mini review. *Vet Q*. 2000;22:11-6.
33. 허준: 동의보감, 서울, 남산당, 1981. p373.
34. 강극명. 감명방제사전. 상해과학기술출판사. 1987. p11
35. Ling Dong Kong, Chen Yang, Fei Ge, Hai Dong Wang, Yu Song Guo. A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 93(2004) 325-330.