

# Inhibitory effect of Hwang lyun tang water extract on inflammatory mediators

Hee-Sung Chae, Ok-Hwa Kang and Dong-Yeul Kwon\*

Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, South Korea.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of extract from Hwang lyun tang (HLT) on the THP-1 cell and HMC-1 cell. To evaluate of anti-inflammatory of HLT, we examined cytokines production in lipopolysacchride (LPS)-induced THP-1 cell and A23187, PMA-induced HMC-1 cell.

Extract of HLT inhibit LPS-induced interleukin (IL)-8 production in human monocyte THP-1 cells. Extract of HLT inhibit A23187, PMA-induced IL-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production in HMC-1 cells. HLT down-regulated LPS-induced IL-8 production and A23187, PMA-induced IL-8, TNF- $\alpha$  production, which may be provide a clinical basis for anti-inflammatory properities of HLT.

**Key words** : Hwang lyun tang (HLT), anti-inflammation, interleukin (IL)-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

## 서 론

LPS는 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며 염증반응을 일으키는 인자로 세포를 활성화시키고, 여러 염증 매개체를 생성시키게 한다고 알려져 있어 염증 반응을 연구하는 실험모델로 확립되어 있다.<sup>1)</sup>

염증에 관계하는 여러 가지 염증매개체들은 각종 염증세포의 성장과 분화 등에 관여하며 여러 종류의 병리적인 환경에서 발현되어 진다. 그중 TNF- $\alpha$ ,

IL-8은 염증반응을 유도하며 세포에 작용하여 항체생산을 증가시킨다. 그리고 혈관내피세포를 활성화시켜 혈관투과성을 높여 보체의 염증세포로의 유입을 증가시키며 면역반응을 촉진시키고 인체 내 감염을 조절하는 역할을 하게 된다.<sup>1-4)</sup>

황련탕은 의학입문에 기재된 방제로서 황련, 반하, 건강, 계지, 생강, 인삼, 대조로 구성되어있다. 흉중유열하고 위중유사기시의 복통 구토증상을 치료하는데 사용되었으며. 현대에는 급성위염, 위산과다증, 담석증 구내염 등에 응용되어왔다. 그러나 효과에 대한 검증이나 연구가 진행되어있지 않으며 임상적인 보고조차 매우 적다.

\* Correspondence: Dong-Yeul Kwon, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, South Korea. Tel: +82-63-850-6802; E-mail: sssimi@wonkwang.ac.kr

본 연구는 황련탕이 열을 제거하고 사기를 몰아내는 기능을 기초로 하여 항염증 효과를 검증하려 한다. 염증관련 세포주에서 염증 매개체의 발현 억제 연구를 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

RPMI 1640 Medium, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin 및 streptomycin은 Hyclone(Logan, UT)에서 구입하였다. Bovine serum albumin(BSA), LPS, PMA, 칼슘 이온 운반자 A23187은 Sigma(St. Louis, Mo)에서 구입하였다. Biotinylated Anti-human TNF- $\alpha$ , IL-8 항체, 그리고 재조합된 인간(rh) Anti-human TNF- $\alpha$ , IL-8 는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

### 약제준비

황련탕에 들어가는 약재 황련, 반하, 건강, 계지, 생강, 인삼, 대조은 대한한약국(익산, 한국)에서 구입하였다. 황련탕 추출물(HLT)은 증류수 (100g/L)로 2시간 동안 달여서 준비되어졌다. 그 추출물은 0.45  $\mu$ m 필터로 걸러졌고, 감압 하에 동결 건조(lyophilized)하였으며, 4°C에서 보관되어졌다. 동결 건조된 추출물은 실험하기 위하여 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline. PBS)에 용해되어졌다.

### 세포배양

인간 단핵세포 THP-1 cell은 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)에서 분양 받았으며, RPMI 1640 Medium에 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin 및 streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

인간 대식세포 HMC-1 cell(Dr. Y, Kitamura; Osaka University Medical School, Osaka, Japan 제공)은 10%의 열 불활성화된 우태혈청 (FBS), 2 mM

글루타민, 100 IU/mL penicillin, 50  $\mu$ g/mL streptomycin 과 1.2 mM  $\alpha$ -티오글리세롤이 추가된 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM)에서 공기 중 이산화탄소 5% 이하 37°C 상태에서 배양되어졌다.

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7은 한국 세포주은행에서 구입하였으며, RPMI 1640 Medium에 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin 및 streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 세포 생존율 측정

96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 다음 황련탕 추출물(HLT)을 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 측정하였다. 세포에 0.1부터 100  $\mu$ g/ml의 농도로 황련탕 추출물(HLT)을 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazon crystal을 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 ELISA reader로 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상세포에 대한 백분율로 나타내었다.

### NO 생성량 측정

세포주에서 생산된 NO양은 세포 배양액 중에 존재하는 양을 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상층액 100  $\mu$ l와 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96 well plate에서 5분 동안 반응시킨 후 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrate를 희석하여 얻었다.

### Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 24 well plate에 세포 ( $5 \times 10^5$  cells/well)를 분주하고 황련탕 추출물(HLT)을 농도별로 처리한 다음, 30분 후에 LPS로 자극하였다. LPS자극 후 6시간에 배양액을 수거하여 cytokine

을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -20℃에서 보관하였다. TNF-α, IL-6, IL-8는 ELISA kit를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 제조사의 방법을 따랐다. 흡광도는 ELISA reader로 측정하였다.

**통계적 검증**

실험결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

**결 과**

**황련탕 추출물(HLT)의 HMC-1 세포에서 TNF-α 발현에 대한 영향**

HMC-1 세포에서 A23187과 PMA로 유도된 TNF-α의 생성에 관해 황련탕 추출물(HLT)의 억제효과를 실험하였다. 상층액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. 황련탕이 A23187과 PMA로 유도된 TNF-α의 생성을 농도 의존적으로 억제한다는 것을 보여준다. 황련탕 추출물(HLT)은 고농도(1000 µg/mL)에서 TNF-α 생성을 73% 억제하고 저농도(100 µg/ml)에서 TNF-α 생성을 56% 억제하는 것을 보여주었다.(Fig. 1.)

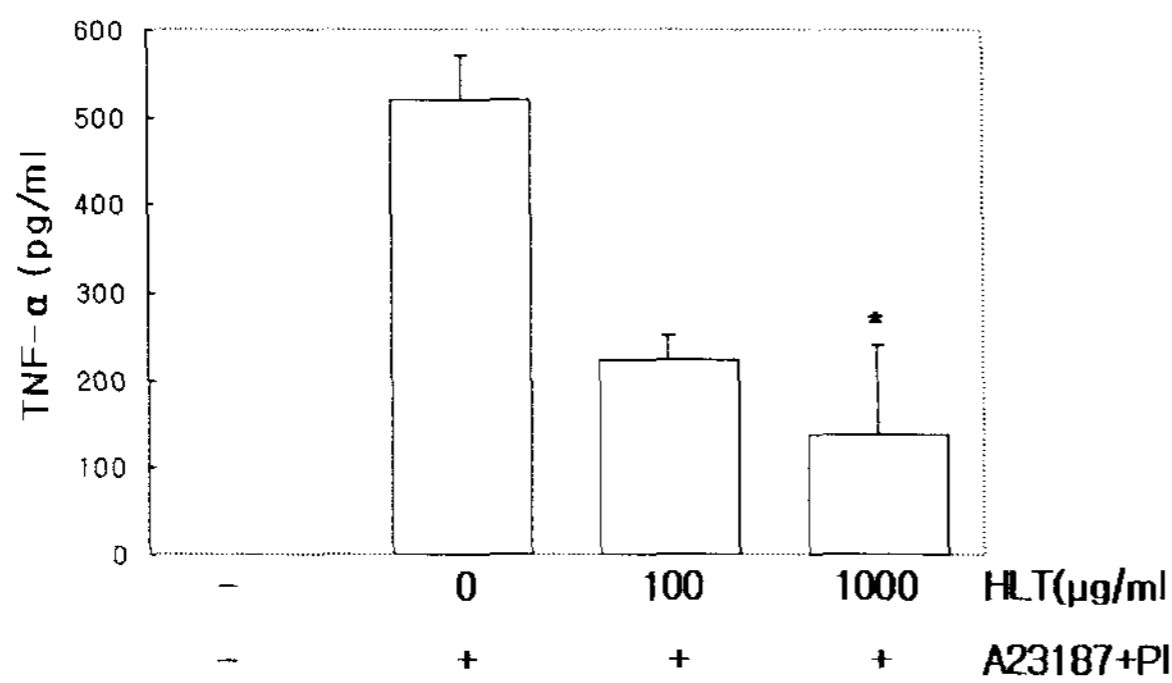


Fig. 1. HMC-1 세포에서 A23187과 PMA로 유도된 TNF-α 생성에 대한 황련탕 추출물의 효과

세포들은 A23187(1 µM)과 PMA(50 nM)로 자극되어지기 전에 두 가지 농도 (100, 1000 µg/mL)의 황

련탕 추출물로 전 처리 되었다. TNF-α 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean ± S.E.이다. (\*,P<0.05)

**황련탕 추출물(HLT)의 HMC-1 세포에서 IL-8 발현에 대한 영향**

HMC-1 세포에서 A23187과 PMA로 유도된 IL-8의 생성에 관해 황련탕 추출물(HLT)의 억제효과를 실험하였다. 상층액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. 황련탕이 A23187과 PMA로 유도된 IL-8의 생성을 농도 의존적으로 억제한다는 것을 보여준다. 황련탕 추출물(HLT)은 고농도(1000 µg/mL)에서 IL-8 생성을 31% 억제하고 저농도(100 µg/ml)에서 IL-8 생성을 15% 억제하는 것을 보여주었다.(Fig. 2.)

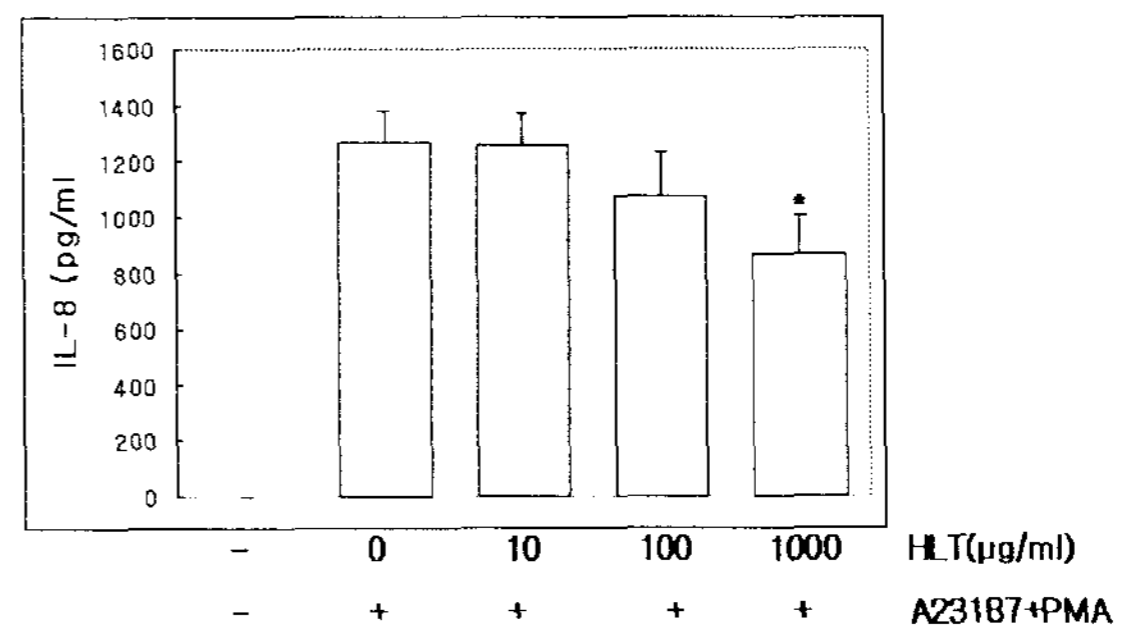


Fig. 2. HMC-1 세포에서 A23187과 PMA로 유도된 IL-8 생성에 대한 황련탕 추출물의 효과

세포들은 A23187(1µM)과 PMA(50nM)로 자극되어지기 전에 두 가지 농도 (100, 1000 µg/mL)의 황련탕 추출물로 전처리 되었다. IL-8 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean ± S.E.이다. (\*,P<0.05)

**황련탕 추출물(HLT)이 THP-1 세포에서 IL-8 발현에 대한 영향**

THP-1 세포에서 LPS로 유도된 IL-8의 생성에 관해 황련탕 추출물(HLT)의 억제효과를 실험하였다. 상층액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. 황련탕이 LPS로 유도된 IL-8의 생성을 농도 의존적으로 억

제한하는 것을 보여준다. 황련탕 추출물(HLT)은 고 농도(1000 µg/mL)에서 IL-8 생성을 81% 억제하고 저 농도(100 µg/ml)에서 IL-8 생성을 48% 억제하는 것을 보여주었다.(Fig. 3.)

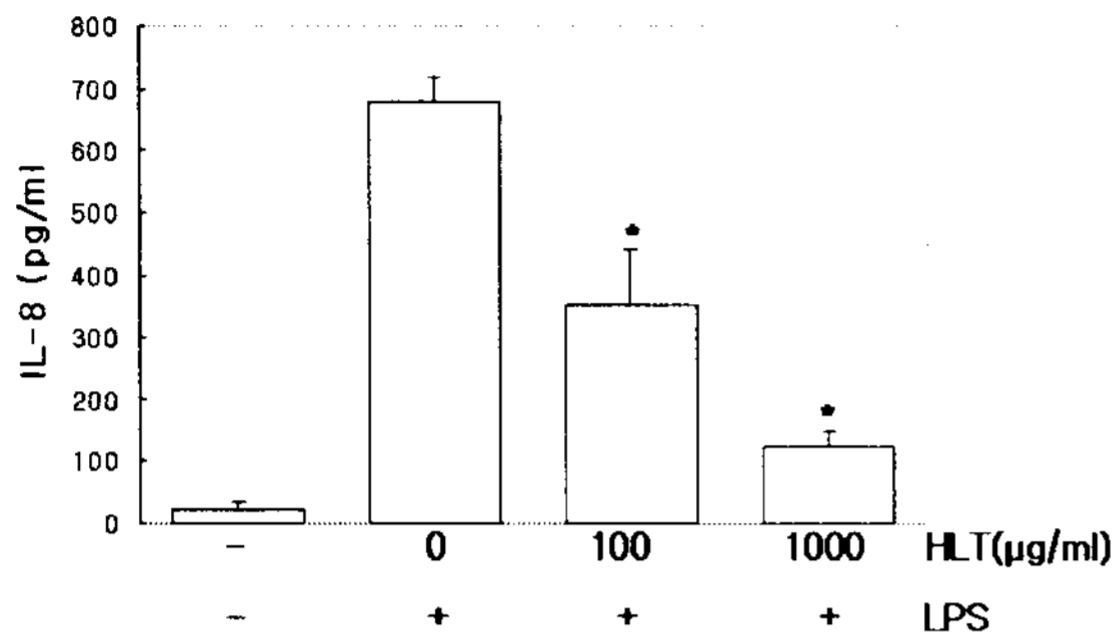


Fig. 3. THP-1 세포에서 LPS로 유도된 IL-8 생성에 대한 황련탕 추출물의 효과

세포들은 LPS(2 µg/ml)로 자극되어지기 전에 두 가지 농도 (100, 1000 µg/mL)의 황련탕 추출물로 전 처리되었다. IL-8 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean±S.E이다. (\*,P<0.05)

**황련탕 추출물(HLT)이 RAW 264.7 세포에서 NO발현에 대한 영향**

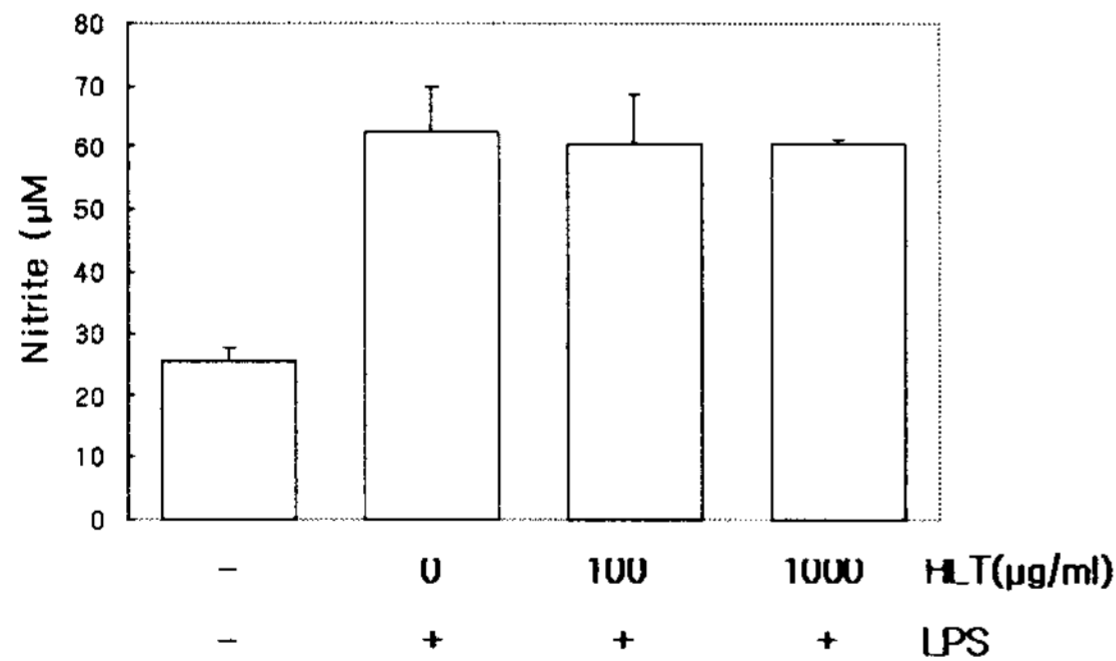


Fig. 4. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 황련탕 추출물의 효과

RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO의 생성에 관해 황련탕 추출물(HLT)의 억제효과를 실험하였다. 시료는 LPS 처리 24시간 후 상층액은 Griess 시약을

이용하였으며 발현량은 ELISA reader로 측정되어졌다. 황련탕이 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제하지 못하는 것을 알았다.(Fig. 4.)

세포들은 LPS로 자극되어지기 전에 두 가지 농도 (100, 1000 µg/mL)의 황련탕 추출물로 전 처리되었다. NO 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean±S.E이다.

**황련탕 추출물(HLT)이 RAW 264.7 세포에서 IL-6발현에 대한 영향**

RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 IL-6의 생성에 관해 황련탕 추출물(HLT)의 억제효과를 실험하였다. 상층액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다. 황련탕이 LPS로 유도된 IL-6의 생성을 억제하지 못하는 것을 알았다.(Fig. 5.)

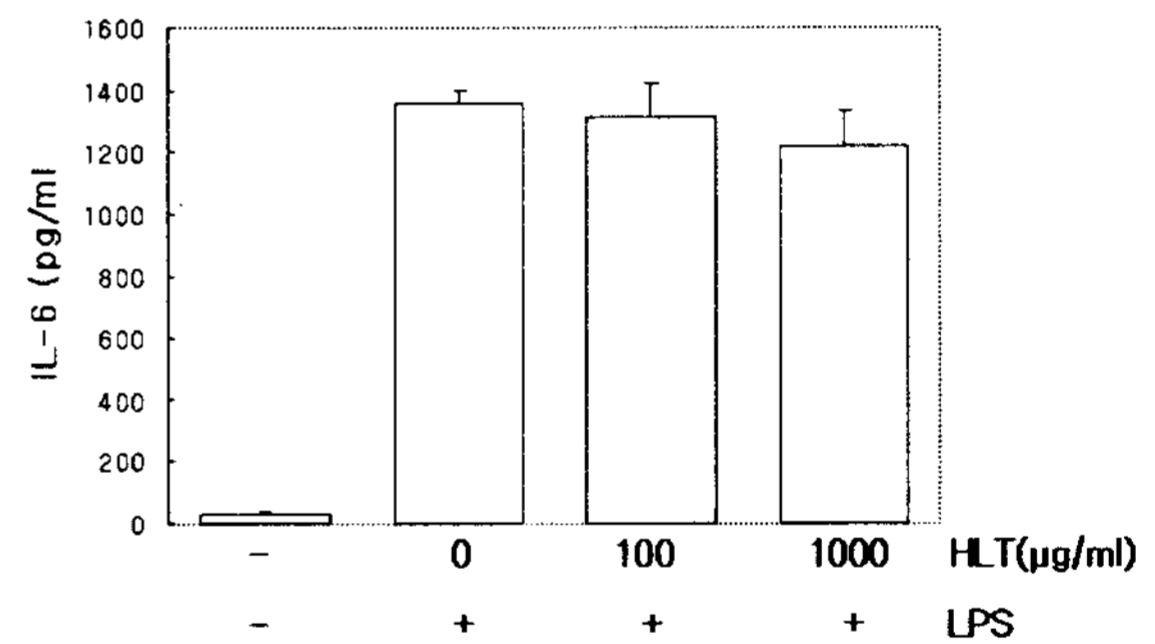


Fig. 5. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 IL-6 생성에 대한 황련탕 추출물의 효과

세포들은 LPS로 자극되어지기 전에 두 가지 농도 (100, 1000 µg/mL)의 황련탕 추출물로 전 처리되었다. IL-6 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean±S.E이다.

**고 찰**

TNF-α는 실험적 알레르기성 염증 발병과 경과에 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되어 있으며 염증 반응에 있어서 중요한 매개체로서 백혈구의 활성화와

염증관련 사이토카인의 생성 등의 작용이 알려져 있다.<sup>5)</sup> 또한 실험적으로 TNF- $\alpha$ 의 억제제를 사용할 경우 염증반응이 현저하게 감소되었다는 보고에서도 TNF- $\alpha$ 가 염증반응과 관련되어 있음을 알 수 있다.<sup>6)</sup>

IL-8는 많은 염증 세포들에 의해 생산되는 chemokine 이다. IL-8의 주요한 기능은 염증부위에 염증세포의 활성화를 촉진하는 것이다. IL-8의 과도한 생산은 여러 가지 염증 질환들이 진행되고 있다는 것을 의미한다.<sup>7-9)</sup>

본 연구에서는 A23187, PMA는 HMC-1에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 분비를 증가시켰으며 황련탕 1000  $\mu$ g/mL을 처리한 세포는 TNF- $\alpha$ 가 현저하게 감소되었다. 그리고 LPS 처리한 THP-1 세포에서도 100  $\mu$ g/mL, 1000  $\mu$ g/mL의 농도에서 현저하게 감소시켰다.

이러한 연구결과는 황련탕이 염증반응에서의 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 분비를 감소시킴을 알 수 있으며 황련탕이 항염증 효과가 있다고 할 수 있다. RAW 264.7 세포에서 NO와 IL-6의 발현은 억제하지 않았다. 인간 세포주에서는 항염증 효과가 나타나지만 쥐 대식 세포주에서는 항염증효과가 나타나지 않았다. 종의 차이에 따른 항염증 효과의 차이가 나타나는 것을 알 수 있다. 종합하여볼 때 황련탕 추출물은 사람에게서는 항염증 효과가 있을 것이라는 예상이 가능하다. 그러나 항염증약물로서 사용하기 위해서는 그 기전과 그 성분이 명확히 밝혀질 필요가 있으며 이 부분에 대해서는 추후 심도 깊은 연구가 요구된다.

## 참고문헌

1. Simons RK, Junger WG, Loomis WH, Hoyt DB: Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment role of circulating TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Shock* 1996; 6:39-45. Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051 - .3064.
2. Liu, R.H., Motchkiss, J.H., 1995. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat. Res.* 339, 73 - .89.
3. Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Infl amm Bowel Dis* 2000; 6:21 - .33.
4. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM: Mechanisms of TNF- $\alpha$  and RANKL-mediated osteoclasto genesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003;111:821-831.
5. Glimåker M, Kragstjerg P, Forsgren M, Olcén P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: high levels of TNF  $\alpha$  indicate bacterial meningitis. *J Infect Dis.* 1993 Apr;167(4):882-9.
6. Sommer N, Löschmann PA, Northoff GH, Weller M, Steinbrecher A, Steinbach JP, Lichtenfels R, Meyermann R, Riethmüller A, Fontana A, et al. The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 1995 Mar;1(3):244-8.
7. Zwahlen R, Walz A, Rot A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. *Int Rev Exp Pathol* 34B:27-41, 1993
8. Levin LG, Rudd A, Bletsa A, Reisner H. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro *Eur J Oral Sci* 107:131-137
9. Huang GT, Potente AP, Kim JW, Chugal N, Zhang X. Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 88:214-220, 1999