

LPS로 활성화된 대식세포에서 黃連解毒湯 물추출물의 염증매개물질 억제효과

김대희¹, 박숙자², 정지윤², 김상찬², 변성희^{1*}

1: 대구한의대학교 한의과대학 2: 대구한의대학교 한방신약개발팀(BK21 Team)

Anti-inflammatory Effects of the Aqueous Extract of *Hwangnyeonhaedok-tang* in LPS-activated Macrophage Cells

Dae Hee Kim¹, Sook Jahr Park², Ji Yoon Jung², Sang Chan Kim², Sung Hui Byun^{1*}

1: College of Oriental Medicine, Daegu Haany University 2: BK21 Team, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : *Hwangnyeonhaedok-tang* (*Huanglian Jiedu Tang*; HHT) has been widely used for purging 'fire' and lessening virulence of any pathogenic organism. However it has been rarely conducted to evaluate the immuno-biological activity. In this study, we evaluated anti-inflammatory effects of HHT in LPS-activated Raw264.7 cells.

Methods : Cells were treated with 1 µg/ml of LPS 1 h prior to the addition of HHT. Cell viability was measured by MTT assay. The production of NO was determined by reacting cultured medium with Griess reagent. PGE₂ and proinflammatory cytokines were detected by ELISA. Expression of iNOS, COX-2, IκBα and NF-κB were analyzed by immunoblot analysis.

Results : All three doses of HHT (0.03, 0.10 and 0.30 mg/ml) had no significant cytotoxicity during the entire experimental period. The levels of NO and PGE₂ were dramatically augmented by LPS compared to control. However, HHT extract dose-dependently reduced these increases. Expression of iNOS and COX-2 protein were also decreased by treatment with HHT extract. Furthermore, HHT extract significantly reduced the nuclear translocation of NF-κB which is critical in regulating inflammation through transcription of iNOS and COX-2. In addition, HHT extract reduced the elevated production of inflammatory cytokines including TNF-α, IL-1β and IL-6.

Conclusions : The results in this study demonstrate that HHT extract exerts anti-inflammatory activities through the inhibition of NO, PGE₂ and proinflammatory cytokines production via the suppression of NF-κB.

Key words : *Hwangnyeonhaedok-tang*, iNOS, COX-2, NF-κB, inflammatory cytokines

서론

黃連解毒湯은 葛洪의 《肘後備急方》에 처음 제시된 방제로 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子로 구성되어 있다¹⁾. 黃連解毒湯은 瀉火解毒의 효능이 있어, 일체의 實熱火毒이 三焦에 가득 차서 나타나는 大熱煩躁, 口燥咽乾, 言語錯亂, 不

眠 등 증상과, 혹은 熱病으로 인한 吐血, 衄血 및 심한 熱로 인한 發斑 또는 身熱下痢, 濕熱黃疸, 癰疽疔毒 등 질환에서 小便이 黃赤하고, 舌紅苔黃하며, 脈이 數하고 有力한 증상을 치료한다²⁾.

약리작용으로는 血壓降下作用³⁾, 抗酸化作用⁴⁾, 胃腸管疾患과 급성 肝疾患에 대한 보호효과⁵⁾, 消炎作用⁶⁾, 鎮靜作

* 교신저자 : 변성희, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

· Tel : 053-770-2244 · E-mail : shbyun@dhu.ac.kr

· 접수 : 2009년 11월 13일 · 수정 : 2009년 12월 11일 · 채택 : 2009년 12월 21일

用, 혈관이완작용 및 심혈관계 질환에 대한 보호효과³⁾ 등이 보고되어 있다. 黃連解毒湯을 구성하는 약재 중, 黃芩은 항산화작용, 혈압강화작용, 고지혈증 개선 작용, 진경작용 등의 약리작용이 연구되어 있고, 黃連은 강심, 항부정맥 작용, 혈압강화 작용, 혈소판응집 억제, 혈당강화 작용 등의 약리작용이 알려져 있으며, 黃柏은 혈압강화 작용, 항부정맥 작용 등이 연구되어 있다. 그리고 梔子は 혈압강화작용, glutamate 저해작용, 항산화작용 등이 알려져 있다^{7,8)}.

특히 염증에 관련한 연구로, 김 등은⁹⁾ 黃連解毒湯 1,3-butylene glycol추출물이 mouse의 아토피성 피부염에 대하여 IgE를 감소시킴을 보고하였으며, 김 등¹⁰⁾은 黃連解毒湯이 흰쥐의 염증성 부종 및 발열을 유의하게 감소시킴을 보고하였으며, 박 등¹¹⁾은 黃連解毒湯이 IL-6와 TNF- α 등의 cytokine을 유의하게 감소시킴을 보고하였다. 그러나, 黃連解毒湯의 항염증효과의 기전에 관한 연구는 매우 제한적인 실정으로, 본 연구에서는 黃連解毒湯 물추출물의 염증억제 기전 및 염증관련 cytokine의 발현에 대한 연구를 수행하기 위하여 열수추출된 黃連解毒湯 (HHT)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증매개물질들에 미치는 영향을 평가하였다.

대식세포는 여러 종류의 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어와 숙주의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다^{12,13)}. 대식세포가 이물질에 대응할 때 분비되는 interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α 및 nitric oxide (NO)는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다¹⁴⁾. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 동맥경화 및 염증 반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 靑黛¹⁵⁾, 苦楝皮¹⁶⁾, 구지뽕나무¹⁷⁾, 관동화¹⁸⁾, 當歸¹⁹⁾, 香附子²⁰⁾ 牡丹皮²¹⁾ 등의 한약재에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

Lipopolysaccharide (LPS)는 인지질, 다당류 및 소량의 단백질로 구성되며, 염증반응을 유발하는 유력한 인자로, 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증반응을 연구하는 경우 빈용하는 실험모델²²⁾로 확립되어 있다.

이에 저자는 黃連解毒湯 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 cytokine에 미치는 영향 및 이러한 염증매개물질의 발현에 핵심적 역할을 하는 NF- κ B의 변화를 살펴보고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

黃連解毒湯(HHT)의 재료는 대원약업사(대구, 한국)에서 구입하여 관능평가를 한 후, 《방약합편》의 용량을 근거로 黃連解毒湯 1첩을 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子 각 5 g

씩을 1첩으로 제조하였다. 黃連解毒湯 8첩 분량 160 g을 물 2,000 ml에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거여드로 1차 여과하고 3,000 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하여 26.91 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 黃連解毒湯 물추출물의 수율은 16.82%였으며 EMEM에 녹여 사용하였다.

2. 시약

LPS (Difco, Detroit, MI, USA)와 MTT는 Sigma (St Louis MO USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. Antibody는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Cayman (Ann Arbor, MI, USA), Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구원(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

4. 세포생존율 측정

Raw 264.7 cell을 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well로 분주한 다음 黃連解毒湯물추출물(HHT)을 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml의 농도로 HHT를 처리한 후에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml)를 50 μ l넣고 4시간 배양한 후 배지를 조심스럽게 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 ratio로 나타내었다. [i.e. viability (ratio) = (absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 50 µl와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H₂O) 50 µl를 96 well plates에 혼합하고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000×g로 10분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. iNOS, COX-2, I-κBα, NF-κB의 발현은 각각의 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit을 사용하였다. iNOS와 I-κBα protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다. 발색 후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA)을 이용하여 Densitometric analysis를 실시하였다.

7. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6 well plate에 cells (5×10⁵/ml)을 분주하고 HHT를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치 후 각 cytokine마다 특정 시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 바로 측정하거나, 측정전까지 -70℃에서 보관하였다. TNF-α, IL-1β와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

8. COX-2의 활성화 측정

COX-2 activity는 Cayman chemical사(MI, USA)로부터 구입한 assay kit를 사용하여 분석하였다. 이 assay kit는 cyclooxygenase의 peroxidase activity를 측정하는 것으로 먼저, 1 mM EDTA를 함유하는 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8)를 사용하여 3초간 sonification한 다음, 4℃, 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액으로부터

cell lysate를 얻고 BCA법(Endogen, USA)으로 단백질 정량을 하여 100 µg/40 µl의 농도로 준비하였다. 준비된 cell lysate에 COX-1의 activity를 배제하기 위하여 COX-1의 specific inhibitor인 SC-560을 처리하고 상온에서 5분간 incubation한 후, colorimetric substrate (TMPD)와 arachidonic acid를 첨가하여 25℃에서 5분간 더 incubation하였다. COX-2 activity는 595 nm에서 흡광도를 측정하여 nmol/min/ml (U/ml)으로 나타내었다.

9. 통계처리

실험 결과는 mean±SD로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

결 과

1. HHT가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 HHT의 nitric oxide 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 HHT를 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO량을 측정하였다. LPS 군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS처치 후 유의하게 4.7배 정도 증가하였으며, HHT를 처치한 실험군에서는 전농도에서 유의한 NO억제를 나타내었으며, 특히 0.30 mg/ml의 농도에서는 정상수준으로 NO의 생성을 감소시켰다(Fig. 1).

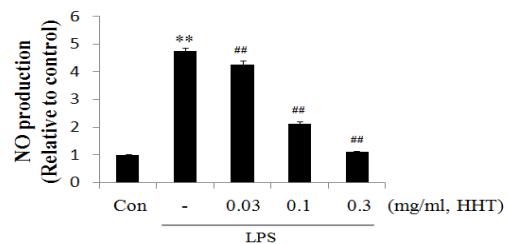


Fig. 1. Effects of HHT on the production of NO by LPS

Raw 264.7 cells were treated with 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml of HHT dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the materials and methods section. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (* : significant as compared to control. ** : $p < 0.01$. # : significant as compared to LPS alone. ## : $p < 0.01$)

2. HHT가 Raw 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향

HHT가 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, HHT의 세포독성으로

Raw cell의 수적 감소에서 기인한 것인지를 관찰하기 위하여, HHT를 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml로 처리하고 NO가 감소된 결과와 동일한 시간인 24시간 후 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. LPS 단독 처리에서는 control에 비교하여 약 65% 정도의 세포독성을 나타내었으나, LPS와 HHT (0.03, 0.10, 0.30 mg/ml)를 처리한 군에서는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, 오히려 HHT 전농도에서 유의한 세포독성의 역제가 관찰되었다(Fig. 2).

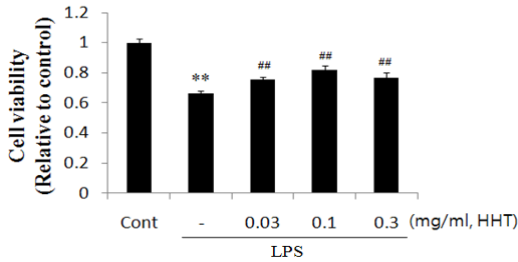


Fig. 2. Effects of HHT on the cell viability in LPS stimulated Raw 264.7 cells

Raw 264.7 cells were treated with 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml of HHT dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (* : significant as compared to control. ** : $p < 0.01$. # : significant as compared to LPS alone. ## : $p < 0.01$)

3. HHT가 LPS로 유도된 Raw cell의 PGE₂에 미치는 영향

Arachidonic acid로부터 PGG₂, PGH₂를 거쳐 생성되는 PGE₂는 염증, 부종, 통증 및 발열 등의 증상을 일으키며, 염증반응 시 PGE₂는 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다²³⁾. 본 실험에서 LPS는 PGE₂의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, HHT 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml은 LPS로 유도된 PGE₂를 유의성 있게 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 3).

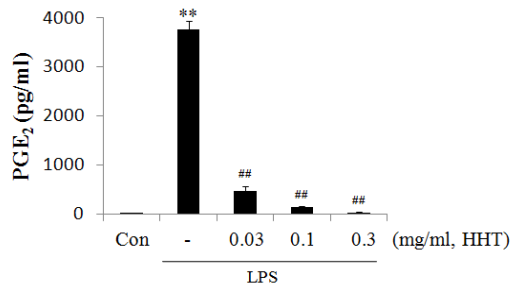


Fig. 3. Inhibition of LPS-activated PGE₂ production by HHT

Raw 264.7 cells were cultured with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of HHT for 24 h to determine the level of PGE₂. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE₂. The data represent the mean ± SD of three separate experiments. (* : significant compared with the control, ** : $p < 0.01$. # : significant compared with the LPS alone. ## : $p < 0.01$). PGE₂, prostaglandin E₂.

4. HHT가 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 영향

산화질소(nitric oxide; NO)는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되므로, HHT의 NO 생성 억제에 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 western blot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사하였다. LPS 처리 시에는 iNOS 단백질의 발현이 유의하게 증가되었으나, LPS에 HHT 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml를 처리한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 농도의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4A, B).

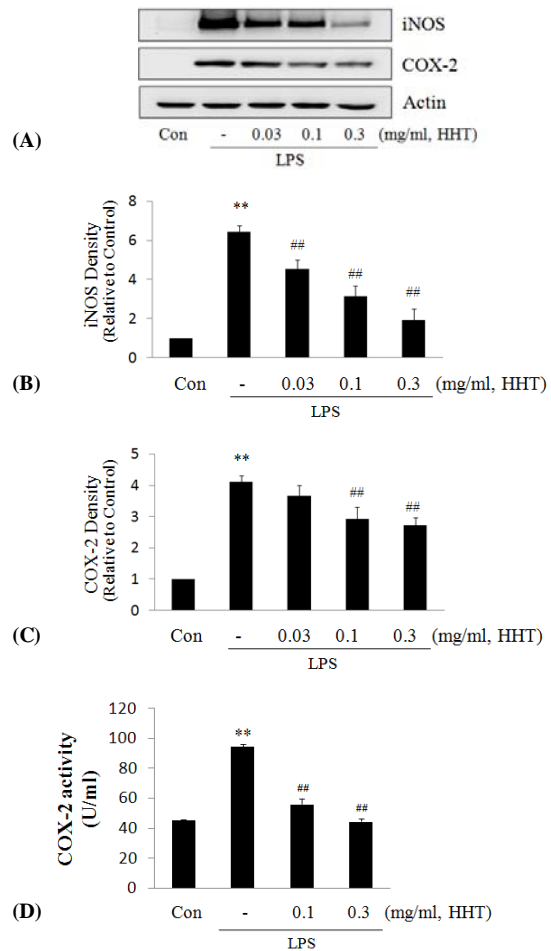


Fig. 4. Effect of HHT on the induction of iNOS and COX-2 by LPS

The levels of iNOS and COX-2 protein were monitored 18 h (iNOS) and 24 h (COX-2) after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without HHT (0.03, 0.10 and 0.30 mg/ml) pretreatment (i.e. 1h before LPS). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblot analysis using specific antibodies. The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B,C). COX-2 enzyme activity was determined by measuring the oxidation of TMPD caused by peroxidase activity of COX as described in methods (D). The data represent the mean ± SD of three separate experiments. (* : significant compared with the control, ** : $p < 0.01$, # : significant compared with the LPS alone, ## : $p < 0.01$)

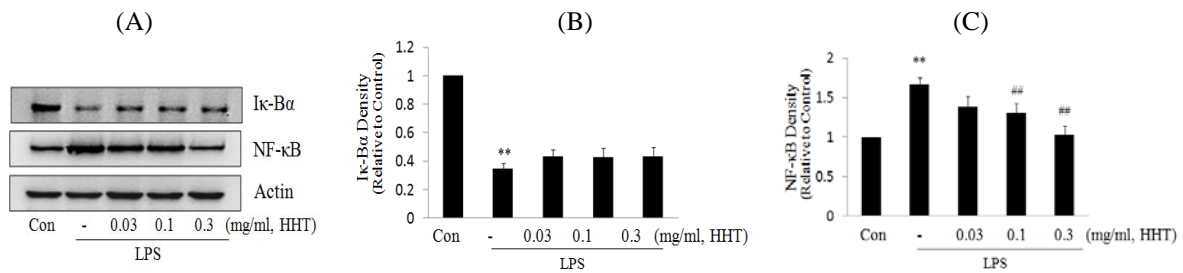


Fig. 5. Effects of HHT on the expression of I-κBa and NF-κB by LPS

The level of I-κBa and NF-κB protein were monitored 15 min and 60 min after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) with or without HHT pretreatment, respectively (i.e. 1 h before LPS). The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry (B,C). (*: significant as compared to control. **: $p < 0.01$. #: significant as compared to LPS alone. ##: $p < 0.01$).

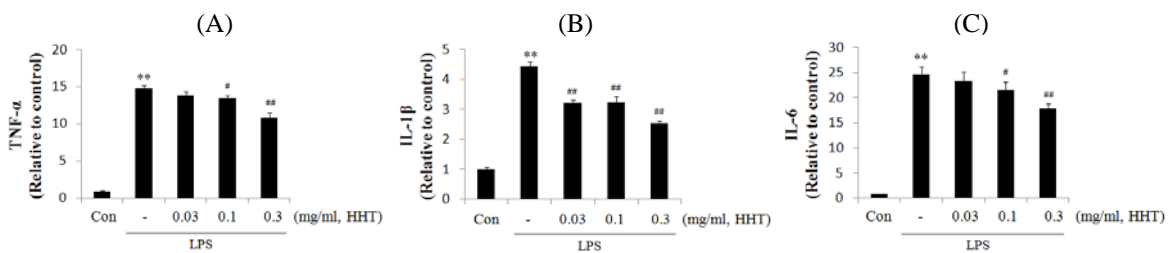


Fig. 6. Effect of HHT on the production of cytokines stimulated by LPS

Production of TNF-α (A), IL-1β (B), IL-6 (C) were measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of HHT for 12 h. The amount of TNF-α was measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Newman - Keuls test. (*: significant as compared to control. **: $p < 0.01$. #: significant as compared to LPS alone. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

또한 염증반응 또는 발암과정에서 중요한 역할을 하는 COX-2 역시, LPS 처리 시에는 COX-2 단백질의 발현이 4배 정도로 유의하게 증가되었으나, LPS에 HHT를 전처리한 실험군에서는 0.10과 0.30 mg/ml의 농도에서 COX-2의 발현을 유의하게 감소시켰다. 또한 HHT는 COX-2의 발현을 감소시킨 농도에서 LPS유도로 증가된 COX-2 단백질의 activity를 농도의존적으로 유의하게 감소하였으며, 특히 0.30 mg/ml의 농도에서는 정상수준으로 COX-2의 활성도를 억제하였다(Fig. 4A, C, D).

5. HHT가 LPS로 유도된 Raw cell의 NF-κB발현에 미치는 영향

HHT가 LPS로 발현이 증가된 iNOS 및 COX-2 protein을 유의하게 억제하였으므로, iNOS 및 COX-2의 발현에 핵심적 역할을 하는 NF-κB의 발현을 평가하였다.

일반적인 경우에서 NF-κB는 세포질에서 NF-κB를 억제하는 I-κBa, I-κBβ, I-κBe 등과 결합하여 비활성형으로 세포질에 존재하지만, LPS의 자극에 의해 NF-κB signaling cascade가 활성화되면 I-κB 등의 억제분자가 인산화되면서 NF-κB가 핵으로 이동하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도하게 된다. I-κB protein의 종류는 I-κBa, I-κBβ, I-κBe 등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NF-κB의 억제단백질은 I-κBa로 알려

져 있다²⁴⁾. 그러므로 본 연구에서는 세포 내에서의 I-κB α, 핵분획에서의 NF-κB 단백질 발현을 평가하였다. 세포질에서 I-κBa는 LPS처치에 의하여 뚜렷하게 감소하였으나, HHT의 전처치에 의하여 감소된 I-κBa가 회복되는 경향을 나타내었다. 그리고 핵분획에서의 NF-κB는 LPS 처치에 의해 유의하게 증가하였으나, HHT의 전처치에 의하여 NF-κB량이 유의성 있게 감소하였다. 이러한 결과는 HHT가 I-κBa의 인산화를 억제하고 그로 말미암아 I-κBa가 세포 내에서 다량 존재하고, 또한 2차적으로 NF-κB가 핵으로의 전위 억제를 나타낸다(Fig. 5).

6. HHT가 LPS로 유도된 Raw cell의 pro-inflammatory cytokines에 미치는 영향

염증반응에 있어서 중요한 역할을 하는 TNF-α는 macrophage와 mast cell 등에서 분비되며, LPS반응의 주요 매개체로서 내재면역에 있어서도 중요한 역할을 하며²⁵⁾, 만성 염증성 반응과도 관련되어 있다²⁶⁾. 본 연구에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, HHT는 0.10 및 0.30 mg/ml의 농도에서 TNF-α의 생성량을 유의하게 감소시켰다(Fig. 6A).

IL-1β는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화하는²⁶⁾ cytokine으로, 본 연구에서도 LPS의 자극에 의하여 IL-1β의 분비가 유의성 있게 증가하였

으며, HHT는 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 IL-1 β 의 생성량을 줄였다(Fig. 6B).

IL-6는 B-cell이 plasma세포로 분화되도록 촉진시키고 항체의 분비를 자극하는 cytokine으로 B-cell 분화단계의 후기에 주로 작용하여 IgM, IgG, IgA의 생성을 유도하고, T-cell의 분화 및 증식에도 관련되어 있다²⁷⁾. 또한 IL-6는 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 생성을 24 배 정도로 유의성 있게 증가시켰으며, HHT 0.10, 0.30 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 HHT 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 6C).

고 찰

본 연구는 淸熱解毒劑으로 사용되는 黃連解毒湯의 항염증효과를 평가하고 기전연구를 수행하기 위하여 실시하였다. 즉 LPS로 유도된 macrophage cell (Raw 264.7)에서 주요 염증인자인 NO와 PGE₂의 생성에 열수추출된 黃連解毒湯(HHT)이 미치는 영향을 조사하여 항염증효과를 평가하였고, NF- κ B signaling을 살펴봄으로써 HHT의 항염 기전을 규명하였다.

염증반응에 주요한 역할을 담당하는 산화질소(nitric oxide; NO)는 arginine과 O₂로부터 nitric oxide synthase를 경유하여 생성되는 radical로, 과도하게 생성된 NO는 septic shock, 뇌경색, 당뇨, 퇴행성 신경질환에 연관되어 있다²⁹⁾. 그런 까닭에 NO 생성 저해제는 염증반응 조절제로서의 가능성 때문에 NO 억제에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서 HHT는 LPS에 의해 과도하게 생성된 NO의 함량을 농도 의존적으로 저해하여 유의성 있는 염증반응 조절 효과를 보였다. 또한 HHT는 LPS 처치에 의해 유발된 세포독성을 유의하게 회복시켰다. Sharifi 등은 PC-12 cell에서의 납에 의한 NO의 과다 생성으로 인해 세포독성이 유발됨을 보고하였으며³⁰⁾, 저자 등도 감초성분 중의 하나인 liquiritigenin이 납에 의해 생성되는 NO의 생성을 저해함으로써 세포독성을 억제함을 보고한 바 있다³¹⁾. 따라서 본 연구에서 관찰된 세포독성도 과도한 NO에 의한 것일 수 있으며 HHT는 NO의 독성을 억제하여 macrophage cell의 세포독성을 억제한 것으로 사료되나, 정확한 결론을 내기 위해서는 좀더 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

NO는 L-arginine으로부터 NOS를 경유하여 생성되는 것이므로³²⁾, HHT의 NO 생성의 억제에 iNOS단백질이 관여하는지 알아보기 위하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 6배 이상 유의하게 발현되었으나, LPS에 HHT 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 양이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 HHT가 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제함을 의미한다.

염증반응에서 arachidonic acid는 PGG₂로 PGG₂는 다시 PGH₂로 변환되고, 이것이 다시 PGL₂, PGD₂, PGE₂, TXA₂ 등으로 변환되어 발열, 부종, 통증 등의 염증반응을 유발한다. COX는 arachidonic acid가 PGG₂로 변환되는 과정에 관여하므로, COX의 활성을 억제함으로써 항염증작용이 나타나게 하는 방법으로 NSAIDs 등이 이용되어 왔다³³⁾. COX-2는 유도형 효소로서 염증반응, 성장 촉진인자, cytokine 등에 의해 유도되어 PGE₂의 생성에 관여하며, 염증성 장질환, 자가면역성질환 등에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 본 연구에서도 COX-2는 LPS 처리 시에는 단백질의 발현이 유의하게 증가되었으며, HHT는 농도 의존적으로 COX-2의 발현과 activity를 억제하였다. 이러한 HHT가 COX-2 발현 및 활성도를 억제하는 결과는 arachidonic acid로부터 PGE₂ 생성을 억제하고 이로 말미암아 발생하는 2차적 염증반응을 억제할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

한편, iNOS와 COX-2의 발현에 관여하는 것으로 알려진 NF- κ B는 대표적인 염증관련 전사조절인자이다²⁵⁾. NF- κ B는 apoptosis의 억제, cell cycle의 조절, oncogenesis 등 과도 연관되어 있으며²⁶⁾, LPS 등의 염증유발 자극에 의해 NF- κ B pathway가 활성화되어 iNOS나 TNF- α 등의 유전자 발현에 관련한다²⁵⁾. 일반적인 경우 NF- κ B가 세포질에서 억제단백질인 I- κ B와 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS 등의 자극에 의해 염증반응이 활성화되면 NF- κ B 신호전달계가 작동되어 I- κ B의 인산화가 진행되면서 억제단백질로부터 자유로운 NF- κ B가 핵 안으로 전위하여 COX-2 및 iNOS의 전사를 유도한다. I- κ B 단백질의 종류는 I- κ B α , I- κ B β , I- κ B ϵ 등의 여러 가지가 알려져 있지만, 세포내에서 가장 풍부한 NF- κ B의 억제 단백질은 I- κ B α 이다²⁸⁾. 그러므로, 본 연구에서 세포질에서 I- κ B α , 핵분획에서 NF- κ B 단백질의 발현을 평가하였다. 본 실험에서 세포질에서 I- κ B α 는 LPS처치 시 I- κ B α 단백질이 세포내에서 감소하였으나, LPS에 HHT를 처치한 실험군에서는 I- κ B α 의 양이 증가하였다. 핵분획에서의 NF- κ B는 LPS에 의해 유의성 있게 증가되었으며, HHT에 의해 NF- κ B는 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 I- κ B α 와의 결과와 같이 고려해 볼 때, 이차적으로 NF- κ B가 핵으로 전위되는 과정을 HHT가 유의하게 억제하고 있음을 나타내고 있다.

류머티스성 관절염에서 TNF- α 는 핵심적인 병리적 인자로 anti-TNF- α 제제를 사용한 류머티스성 관절염에 대한 성공적인 임상시험 후, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriasis 등의 면역매개 염증질환에도 TNF- α 가 연루되어 있음이 밝혀졌다³⁵⁾. TNF- α 는 pro-inflammatory cytokine으로서 blood monocytes, macrophages, mast cells, endothelial cells 등으로부터 분비되며, 근래 TNF- α 는 많은 자가면역질환에 있어서 염증의 개시 및 유지에 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{25,26)}. 본 연구에서도 LPS는 Raw cell에서 TNF- α 의 분비를 유의하게 촉진시켰으며, HHT는 0.10 및 0.30 mg/ml의 농도에서

TNF- α 의 생성량을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 HHT가 여러 종류의 면역계 염증성 질환을 유의하게 개선시킬 수 있음을 의미한다.

염증관련 cytokine 중, IL-1 β 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, 간세포 등에서 분비되며, TNF- α , IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 β 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화한다²⁶⁾. 또한 IL-1은 septic shock³⁶⁾, 화상³⁷⁾ 등의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide 등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다. 본 연구에서는 LPS의 자극에 의하여 IL-1 β 의 분비가 4배 이상 유의성있게 증가하였으며, HHT는 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 IL-1 β 의 생성량을 줄였다.

단핵구나 대식세포에서 분비되는 IL-6는 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로, IL-6의 level은 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다²⁶⁾. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, HHT 0.10, 0.30 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 농도의존적으로 유의성 있게 감소시켰다. 일반적으로 LPS는 macrophage에 작용하여, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비를 촉진시켜 염증반응을 유도하지만, HHT는 이 세가지의 cytokine을 유의성있게 억제하였으므로 염증성 질환의 치료에 유의할 것으로 생각된다.

HHT가 COX-2의 발현 및 활성을 억제한 본 연구의 결과에 따라, HHT가 LPS로 활성화된 Raw cell에서 PGE₂에 미치는 영향을 평가하였다. PGE₂는 염증반응에서 통증과 발열을 주로 매개하는 물질로서, 세포막에 존재하는 인지질로부터 유래된 대사산물이며, phospholipase A2, COX 및 hydroperoxidase가 관여하여 생성된다. PGE₂는 염증 및 세포사멸, 혈관신생, 관절질환에서 나타나는 구조적 변화에도 관여한다^{22,23)}. 본 연구에서도 LPS는 PGE₂의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, HHT 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml은 LPS로 유도된 PGE₂를 유의성 있게 농도의존적으로 감소시켰다. 이러한 결과는 HHT가 LPS에 의한 COX-2의 발현 및 활성을 억제함으로써 인하여 PGE₂의 생성을 유의성 있게 감소시켰음을 의미한다.

黃連解毒湯은 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子로 구성되어 있으며, 특히 黃芩과 黃連이 염증 조절반응에 기여함이 보고되어 있다. 黃芩은 비장 임파구에서 IgA와 IgE 생성을 조절함으로써 T helper cell에 의해 유발된 면역반응을 조절하고 dextran sodium sulfate (DSS)로 유발된 대장염의 과민 반응을 완화시킬 수 있다고 보고되었으며³⁸⁾, 黃連은 LPS로 유도된 뇌신경소교세포에서 염증매개물질의 생성을 억제함이 보고되었다³⁹⁾. 따라서 黃連解毒湯의 항염증 효능에 이들 약제가 관여한 것으로 사료되나 개별 약제의 효능에 의한 것인지 약제간의 상호작용에 기인한 것인지를 설명하기 위해서는 후속연구가 더 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과를 요약하면, HHT가 NF- κ B의 억제단백질 중의 하나인 I- κ Ba의 phosphorylation을 억제하여 NF- κ B가 핵으로 전위되는 기전을 억제하며, 그러한 결과로 iNOS 및 COX-2의 발현 또는 활성이 억제되며, 이러한 결과로 NO 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 cytokine이 감소되며, 또한 PGE₂의 생성을 억제함을 나타낸다.

결론

黃連解毒湯 물추출물(HHT)의 항염증효능을 평가하기 위하여, 설치류 대식세포주인 Raw 264.7 cell을 LPS로 활성화시킨 후 nitric oxide의 생성량, inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2의 발현 및 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), PGE₂ 등에 미치는 HHT의 영향을 살펴본바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS는 NO의 생성량을 유의성 있게 증가시켰으며, HHT 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml을 전처치한 실험군에서는 증가된 NO를 농도의존적으로 유의하게 억제하였다. 또한 HHT처치군은 LPS단독처리군과 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 HHT의 NO억제는 iNOS 단백질의 발현감소에서 유래한다.
2. HHT는 LPS로 증가된 COX-2의 발현 및 활성을 유의하게 억제하였으며, PGE₂ 역시 유의하게 감소시켰다.
3. LPS에 의해 감소된 I- κ Ba는 HHT에 의해 발현이 증가되었으며, 핵분획에서의 NF- κ B발현은 HHT의 전처치에 의하여 유의하게 감소하였다.
4. TNF- α , IL-6, IL-1 β 는 LPS에 의해 유의성있게 증가되었으며, HHT의 전처치에 의해 유의성 있게 감소시켰다.

이러한 결과로 보아, HHT는 염증성 질환의 치료에 적극 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 葛洪. 肘後備急方. 上海 : 人民衛生出版社. 1996 : 34-7.

2. 방제학교수. 방제학. 서울 : 영림사. 1999 : 180.
3. Kawashima K, Haruo N, Kogure K. Effect of Oren-gedoku-to on cerebral vascular accident. *Pharma Medica*. 1988 ; 6 : 33-6.
4. Ohta Y, Sasaki E, Nishida K, Hayashi T, Nagata M, Ishiguro I. Preventive effect of Oren-gedoku-to(Huang-lian-jie-do-tang)extract lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biol Pharm Bull*. 2001 ; 24(10) : 1165-70.
5. Hayashi T, Ohta Y, Inagaki S, Harada N. Inhibitory action of Oren-Gedoku-to extract on enzymatic lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biol Pharm Bull*. 2001 ; 24(10) : 1165-70.
6. Mizukawa H, Yoshida K, Honmura A, Uchiyama Y, Kaku H, Nakajima S, Haruki E. The effect of oregedokuto on experimentally-inflamed rats. *American Journal of Chinese Medicine*. 1993 ; 21 : 71-8.
7. 이병철, 임강현, 김영옥, 김선여, 안덕균, 박호균, 김호철. 황금(黃芩)의 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경방어효과. *대한본초학회지*. 1999 ; 14 : 89-96.
8. 김호철. 한약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 125-40.
9. 김보애, 김미소, 강보미, 변선희, 박일향, 박지하, 정지욱, 안은미, 정현아, 장정희, 배원, 이하영, 최필녀, 박찬익. 황련해독탕이 NC/Nga Mice에서 유발된 아토피 피부염에 미치는 영향. *대한본초학회지*. 2008 ; 23(2) : 59-65.
10. 김광호, 김성수. 황련해독탕과 온성어혈방의 수침 및 경구투여가 진통 소염 해열작용에 미치는 영향. *대한한의학회지*. 1994 ; 15(1) : 9-25.
11. 박수현, 권용옥, 이태희. 황련해독탕과 건강부자탕이 LPS 유도에 의한 마우스 혈중 IL-6와 TNF- α 변화에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지*. 2007 ; 15(1) : 185-97.
12. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol*. 2000 ; 10 : 8-15.
13. 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 : 1425-31.
14. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996 ; 211 : 24-32.
15. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated Raw 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med*. 2000 ; 28 : 217-26.
16. 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-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*. 2000 ; 406 : 301-9.
17. 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- γ and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol*. 2000 ; 35 : 21-8.
18. Yoon TG, Byun BH, Kwon TK, Suh SI, Byun SH, Kwon YK, Kim SC. Inhibitory effect of *Farfarae Flos* water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2004 ; 18(3) : 908-13.
19. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지*. 2002 ; 10(2) : 189-97.
20. Seo WG, Pae HO, Oh GS, KY Chai, Kwon TO, YG Yun, NY Kim, HT Chung. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol*. 2001 ; 76 : 59-64.
21. Chun SC, Jee SY, Lee SG, Park SJ, Lee JR, Kim SC. Anti-Inflammatory Activity of the Methanol Extract of Moutan Cortex in LPS-Activated Raw 264.7 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007 ; 4(3) : 327-33.
22. 국윤범. 황련해독탕이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지*. 2002 ; 10(1) : 113-29.
23. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992 ; 6 : 3051-64.
24. 손갑호, 김성훈. 시호(柴胡), 인진(茵陳)의 간암세포에 대한 항암활성 및 항암제와의 상승(相乘)작용. *대한한의학회지*. 1995 ; 16(2) : 414-32.
25. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British Journal of Pharmacology*. 2003 ; 139 : 11-20.

26. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 2003 ; 37(6) : 355-61.
27. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989 ; 142(1) : 144-7.
28. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 2001 ; 159(2) : 387-97.
29. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr*. 2007 ; 137 : 1616S-20S.
30. Sharifi AM, Mousavi SH, Bakhshayesh M, Tehrani FK, Mahmoudian M, Oryan S. Study of correlation between lead-induced cytotoxicity and nitric oxide production in PC12 cells. *Toxicol Lett*. 2005 ; 160 : 43-8.
31. 박은영, 박숙자, 이종록, 지선영, 변성희, 김상찬. PC-12 cell에서 감초성분의 Liquiritigenin이 납에 의해 유도된 세포독성과 nitric oxide production에 미치는 영향. *본초학회지*. 2007 ; 22(2) : 17-24.
32. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988 ; 333 : 664-6.
33. 국윤범. 황련해독탕과 건강부자탕이 LPS 유도에 의한 마우스 혈중 IL-6와 TNF- α 변화에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지*. 2007 ; 15(1) : 185-97.
34. 양창현. 흔히 접하는 비스테로이드성 항염증약물 (NSAIDs)과 위장관질환. *동국의학*. 2003 ; 10(2) : 190-9.
35. Taylor PC, Williams RO, Feldmann M. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory disease. *Curr Opin Biotechnol*. 2004 ; 15 : 557-3.
36. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*. 1993 ; 119 : 771-8.
37. Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1 β in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest*. 1993 ; 23 : 311-9.
38. 이순희, 임병우, 조여원. DSS로 유도된 염증성 장질환 동물 모델에서 황금 열수 추출물이 면역 조절 기능에 미치는 영향. *한국영양학회지*. 2004 ; 37(6) : 431-9.
39. 박용기, 이경열. 황련 클로로포름 분획물의 뇌신경교세포로부터 염증매개물질 생성억제 효능 연구. *대한본초학회지*. 2007 ; 22(4) : 109-6.