

## 羌活과 威靈仙의 항염증 상승작용에 관한 연구

김승주, 천진미, 양원경, 전명숙, 성윤영, 박준언, 김호경\*

한국한의학연구원 한약자원연구센터

### Synergistic Effect of *Notopterygium incisum* with *Clematis manshurica* in the Anti-inflammatory Activity

Seung-Ju Kim, Jin-Mi Chun, Won-Kyung Yang, Myeong-Sook Cheon,  
Yoon-Young Sung, Jun-Yeon Park, Ho-Kyoung Kim

Center of Herbal Resources Research, Korea Institute of Oriental Medicine,  
483 Exporo, Daejeon 305-811, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objective :** Oriental medicines have been combined oriental medical theory which based on the seven modes of emotions. *Notopterygium incisum* (*N. incisum*) and *Clematis manshurica* (*C. manshurica*) have been used as an anti-rheumatic and analgesic medicine for the treatment of rheumatism, headache, cold, etc. In this study, we evaluate the synergistic anti-inflammatory effect of *N. incisum* and *C. manshurica*.

**Method :** To evaluate the synergistic anti-inflammatory effect of a herbal mixture *N. incisum* and *C. manshurica*, we examined the changed ear thickness in 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse ear edema model after topical application of herbal mixture. In addition, the levels of markers for inflammation, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , prostaglandin G<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), and nitric oxide (NO) were measured by ELISA assay and Griess reagent in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells.

**Results :** Our results showed that aqueous extracts of *N. incisum* and *C. manshurica* combination significantly inhibited the mouse ear edema induced by TPA. Moreover, the aqueous extracts of *N. incisum* and *C. manshurica* combination exhibited synergistic effects in down-regulating TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> level, but not NO.

**Conclusions :** This study suggested that combined treatment of *N. incisum* and *C. manshurica*, based on seven methods in prescription compatibility, has a synergistic effect in down-regulating inflammatory response both *in vitro* and *in vivo* models.

**Key words :** Synergistic effect, Anti-inflammatory activity, *Notopterygium incisum*, *Clematis manshurica*, Ear edema, Raw 264.7

## 서론

羌活은 미나리과 (Umbelliferae)에 속한 다년생 초본인 羌活 (*Ostericum koreanum* Maximowicz)의 뿌리로 중국에서는 미나리과 (繖形科: Umbelliferae)에 속한 中國羌活 (*Notopterygium incisum* Ting) 혹은 寬葉羌活 (*N. forbesii* Boissier)의 뿌리 줄기 및 뿌리를 기원으로 한다. 解表藥 중 發散風寒藥에 속하며, 효능은 祛風散寒, 除濕止痛하고, 風寒感冒頭痛, 風濕痺痛, 肩背痠痛 등을 치료하고 性は溫, 味는 辛,

苦 하다<sup>1-2)</sup>.

威靈仙은 미나리아재비과 (Ranunculaceae)에 속한 여러 해 살이 낙엽성 덩굴식물인 으아리 (*Clematis manshurica* Rupr)와 威靈仙 (*C. chinensis* Osbeck) 및 山蓼 (*Clematis hexapetala* Pall)의 뿌리와 뿌리줄기를 건조한 것이다. 威靈仙은 祛風濕藥 중 거풍습지비통약 (祛風濕止痺痛藥)에 속하며, 효능은 祛風除濕, 通絡止痛하고, 風濕痺痛, 肢體麻木, 筋脈拘攣 등을 치료하고, 性は溫, 味는 辛鹹하다<sup>1-2)</sup>.

지금까지 羌活과 威靈仙은 전통적으로 많이 사용되어 왔고,

\*교신저자 : 김호경. 대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 한약자원연구센터.  
· Tel : 042-868-9502, · Fax : 042-863-9434, · E-mail : hkkim@kiom.re.kr.  
· 접수 : 2010년 11월 8일 · 수정 : 2010년 12월 3일 · 채택 : 2010년 12월 15일

이와 함께 羌活과 威靈仙이 지닌 여러 가지 효능에 대해 과학적 실험으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 羌活은 LPS로 자극한 세포모델에서 羌活 추출물의 염증성 세포활성 물질의 억제효과<sup>3)</sup>, 羌活과 방풍의 항염증 상승작용에 관한 연구에 대한 효과<sup>4)</sup>, 항암효과<sup>5)</sup> 등이 보고되었다. 또한 威靈仙은 백골채, 모과와의 혼합약침액이 관절염 유발 백서의 염증에 대한 효과<sup>6)</sup>, 콜라겐으로 유발된 골관절염에서 nNOS, NOS 발현 증가<sup>7)</sup>, 威靈仙 수침액이 급성 통풍성 관절염에 효과<sup>8)</sup> 등이 보고된 바 있다.

이처럼 본초학적으로 祛風藥에 속하는 羌活과 威靈仙 두 약물은 염증성 질환에 대한 연구 결과들이 주로 보고 되어 왔으나, 실제 두 약물간의 상호작용에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없었다. 또한, 실제 사용되는 처방을 검색한 결과 羌活과 威靈仙이 공동으로 포함된 처방은 65 건 이었으며, 이들 중 1:1로 혼합한 처방이 69.2%로 확인 되었다<sup>9)</sup>. 따라서 한약의 配伍 원칙인 七情원리 중, 효능이 유사한 약물끼리 配伍하여 한 종의 약물이 주가 되는 약물의 효능을 증대시키는 相使를 기반으로, 風濕과 止痛에 널리 사용되고 있는 羌活과 威靈仙의 相使 관계를 항염증 효과를 통해 검증해 보고자, 마우스 대식세포인 RAW 264.7에서 염증 유발인자들인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, NO 생성량 및 마우스 항염증 모델에서 귀부종 억제율을 측정한 결과, 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 羌活, 威靈仙은 (주)옴니허브 (Kyungbuk, Korea)로부터 구입하였다. 羌活과 威靈仙 시료를 각각 100 g, 羌活과 威靈仙의 혼합시료는 각각 50 g씩 1:1로 혼합한 100 g에 10배의 증류수를 가하여 2시간씩 2회 반복하여 환류냉각 추출한 후 감압여과(Whatman No. 2)하고, -60°C 이하에서 동결건조 하였다 (Ilshin, Korea). 동결 건조 후의 수득율은 羌活, 威靈仙, 羌活과 威靈仙의 혼합시료의 수율은 각각 23.4%, 20.4%, 14.9%이었으며, 시료는 -20°C에 보관 후 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

#### 2) 시약

Dulbeccoss modified Eagle medium (DMEM)과, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Invitrogen Co. (Grand Island, 미국)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> 측정을 위한 ELISA kits와 NO 측정을 위한 Griess reagent는 R&D System (Minneapolis, 미국)에서 구입하였다. TPA, Lipopolysaccharide (LPS), *Escherichia coli* 0111 : B4와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) solution 등 그 외 시약들은 Sigma (St. Louis, 미국)에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 첨가한 DMEM을 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

#### 2) 세포독성 시험

시료의 세포 독성을 확인하고자 MTT assay를 실시하였다. 96-well plate에 배양된 RAW 264.7 세포에 시료를 농도별 (50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml)로 처리하고 24시간 배양한 후 MTT 용액을 최종농도 500  $\mu$ g/ml가 되도록 각 well에 첨가한 후, 추가로 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 배양액을 모두 제거한 후 100  $\mu$ l의 DMSO용액을 첨가하여 생성된 formazan을 용해시킨 뒤, Multi-label leader (PerkinElmer, 미국)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율 (% of control)을 계산하였다.

#### 3) TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> 측정

96-well plate에서 5 x 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 배양된 RAW 264.7 세포에, LPS 1  $\mu$ g/ml와 시료를 100  $\mu$ g/ml로 처리하고 20시간 동안 배양한 후, 배지에 분비된 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>를 ELISA kits의 실험방법에 따라 측정하였다. LPS 단독 처리한 군의 분비량을 100%으로 정의하여 상대적인 생성량 (% of control)을 계산하였다.

#### 4) NO 생성량 측정

96-well plate에서 5 x 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 배양된 RAW 264.7 세포에, LPS 1  $\mu$ g/ml와 시료를 100  $\mu$ g/ml로 처리하고 20시간 동안 배양한 후, 배지에 분비된 NO를 Griess reaction system에 기초하여 측정하였다. LPS 단독 처리한 군의 분비량을 100%으로 정의하여 상대적인 생성량 (% of control)을 계산하였다.

#### 5) 실험동물 및 사육조건

염증 동물 모델로 많이 사용되고 있는 모델인 5주령의 C57BL/6J mice 수컷 (대한바이오링크, 한국) 40마리를 공급받아, 온도 20-22°C, 상대습도 40-60%, 12시간 간격으로 명암이 조절되는 한국한의학연구원 동물사육실에서 1주일간 환경에 적응시켰으며, 각 군당 8마리씩 총 5군으로 무작위 분배하여 실험하였다.

#### 6) TPA 유발 마우스 귀부종 실험

각 실험군은 8마리로 구성되며 MeOH-CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (2:1:1)과 이 용매에 녹인 추출물 (1 mg/ear)을 파이펫을 이용하여 마우스의 오른쪽 귀 안쪽과 바깥쪽 표면에 10  $\mu$ l씩 도포하였다. 1시간 후 아세톤에 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)를 1 nM로 녹여서 마우스의 오른쪽 귀 안쪽과 바깥쪽 표면에 10  $\mu$ l씩 도포하고, 6시간 이후 실험동물들 CO<sub>2</sub> 가스로 마취한 후, 각 귀의 두께를 micrometer로 측정하여 부종 지표로서 부종 증가율을 계산하였다. TPA 단독 처리된 군을 100% 부종지수로 정의하여 상대적인 부종억제율(% control)을 계산하였다.

7) 통계처리

모든 측정 결과는 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation; SD)로 나타내었다. 각 실험군 간의 차이는 Micro Office Excel의 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, *p*값이 0,05 이하인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 羌活과 威靈仙, 혼합추출물에 대한 세포 독성

羌活, 威靈仙 그리고 두 약재의 혼합추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다(Fig. 1). LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에 각각의 시료를 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  처리하여 24시간 후 세포생존율을 측정할 결과, 모든 시료의 모든 농도에서 대조군과 비교했을 때 독성이 없는 것으로 나타났다.

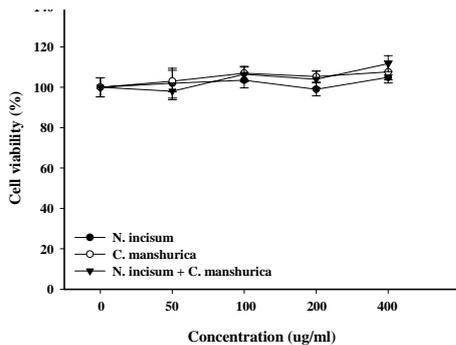


Fig. 1. The Effects of *N. incisum* and *C. manshurica* on Cell Viability. After RAW 264.7 cells were stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  of LPS and extracts of each concentration (50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hrs, cell viability was determined by MTT assay. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments.

2. 羌活과 威靈仙, 혼합추출물이 염증성 사이토카인 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )의 분비량에 미치는 영향

LPS에 의해 활성화 된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 분비량에 대한 羌活, 威靈仙 그리고 두 약재의 혼합추출물의 억제효과를 알아보기 위하여, 세포배양액으로부터 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다(Fig. 2). RAW 264.7 세포에 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 를 전 처리한 후, 각 시료를 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 결과 TNF- $\alpha$  생성량은 LPS로 자극한 대조군과 비교했을 때 羌活은 93.6%, 威靈仙은 74.1%, 羌活, 威靈仙 혼합추출물은 62.4%로 나타났으며, 이는 각 약재 단독 억제율에 비해서도 통계적으로 유의성 있는 결과를 보였다(*P* < 0,05). 또한 IL-1 $\beta$ 의 경우 羌活은 37.1%, 威靈仙은 78.9%, 혼합추출물은 23.7%로 나타냈으며, 이는 각각의 약재 단독 처리군과 羌活, 威靈仙 혼합추출물을 비교한 결과 통계적으로 유의성 있는 결과를 보였다(*P* < 0,05).

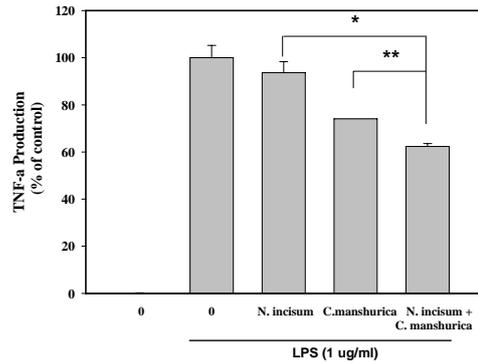


Fig. 2. The Effects of *N. incisum* and *C. manshurica* on Cytokines Production in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. After RAW 264.7 cells were stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  of LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  of test sample for 20 hrs, TNF- $\alpha$  (A) and IL-1 $\beta$  (B) productions were determined using ELISA kit. Each value shows mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \* *P* < 0,05, \*\* *P* < 0,01 vs. *N. incisum* / *C. manshurica* together.

3. 羌活과 威靈仙, 혼합추출물이 PGE<sub>2</sub> 분비에 미치는 영향

LPS에 의해 활성화 된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 염증 유발물질인 PGE<sub>2</sub>에 대한 羌活, 威靈仙 그리고 두 약재의 혼합추출물의 억제효과를 알아보기 위하여 세포배양액으로부터 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다(Fig. 3). RAW 264.7 세포에 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 를 전처리한 후, 각 시료를 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 결과 PGE<sub>2</sub> 생성량은 LPS로 자극한 대조군과 비교했을 때 羌活은 62.3%, 威靈仙은 63.5%, 羌活, 威靈仙 혼합추출물은 47.1%로 나타났으며, 이는 각각의 약재 단독 처리군과 혼합추출물을 비교한 결과 통계적으로 유의성 있는 결과를 보였다(*P* < 0,001).

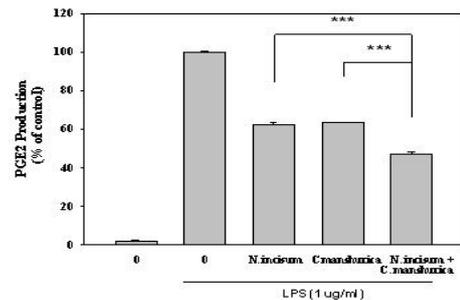


Fig. 3. The Effects of *N. incisum* and *C. manshurica* on PGE<sub>2</sub> Production in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. After RAW 264.7 cells were stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  of LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  of test sample for 20 hrs, PGE<sub>2</sub> productions were determined using ELISA kit. Each value shows mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \*\*\**P* < 0,001 vs. *N. incisum* / *C. manshurica* together.

4. 羌活과 威靈仙, 혼합추출물이 NO 분비에 미치는 영향

LPS에 의해 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 NO에 대한 羌活, 威靈仙 그리고 두 약재의 혼합추출물의 억제효과를 알아보기 위하여 세포배양액으로부터 Griess reagent 반응법을

이용하여 측정하였다(Fig. 4). RAW 264.7 세포에 LPS 1  $\mu\text{g}$ /ml를 전처리한 후, 각 시료를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 결과 NO 생성량은 LPS로 자극한 대조군과 비교했을 때 羌活은 85.2%, 威靈仙은 48.6%, 혼합추출물은 51.7%로 나타났으며, 羌活과 威靈仙 혼합추출물의 비교에서는 유의한 효과를 보였으나, 威靈仙의 경우 상승효과 면에서는 유의한 수준의 결과를 얻지 못했다.

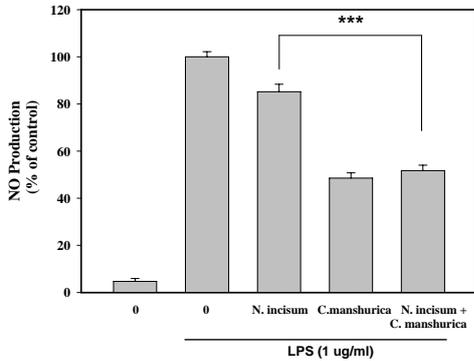


Fig. 4. The Effects of *N. incisum* and *C. manshurica* on NO Production in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. After RAW 264.7 cells were stimulated with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of LPS and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of test sample for 20 hrs, NO production was measured by the Griess reagent system. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$  vs *N. incisum* / *C. manshurica* together.

## 5. 羌活과 威靈仙, 혼합추출물의 귀부종 개선에 미치는 영향

羌活, 威靈仙, 羌活과 威靈仙 혼합추출물을 각각 1 mg/ear 농도로 도포 1시간 후, TPA로 귀부종을 유발시킨 마우스 염증모델에서 부종억제지수를 산출하였다(Fig. 5). 용매만 도포한 TPA 유발군과 약물군을 비교해본 결과, 羌活은 25.5% 威靈仙은 29.7%의 부종억제율을 나타냈으며, 혼합추출물의 경우 41.9%의 부종억제율을 나타내 현저하게 부종을 억제하였고, 이러한 부종억제는 각각의 단독 약제 처리군에 비해 통계적으로 유의성 있는 결과를 보였다( $P < 0.01$ ).

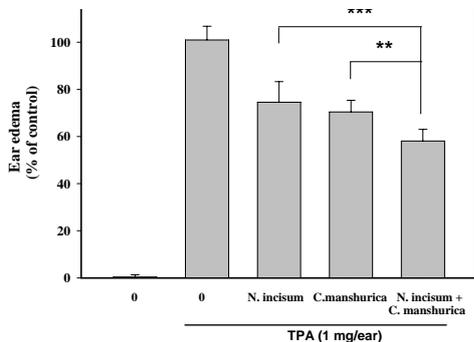


Fig. 5. The Effect of *N. incisum* and *C. manshurica* on TPA-induced Inflammation in Mice. Mice were treated with *N. incisum* and/or *C. manshurica* (1 mg/ear) for 1 hrs prior to topical application of TPA in acetone, as described in the Materials and Methods. Ear thickness was measured at 6 hrs after TPA application. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of the difference between ear thickness before and after challenge. N=6 mice per group. Each value shows mean  $\pm$  S.D. from six independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs *N. incisum* / *C. manshurica* together.

## 고찰

한약 처방은 한약재를 한 가지부터 많게는 수십 가지씩 배합하여 이루어져 있고 자주 쓰이는 한약재의 종류만 해도 100여종에 이른다. 수많은 한약이 무작위로 모여 처방이 이루어진 것이 아니라 한의학 고유의 본초 이론인 氣味論, 七情, 引經報使 등에 입각하여 조합된 것이다. 이 중 임상에서 가장 많은 영향을 미치는 이론의 하나가 한약의 七情으로 單行, 相須, 相使, 相畏, 相殺, 相惡, 相反이다. 이는 두 가지 이상의 약재를 七情의 원리에 따라 배오하여 약효를 높이거나, 줄이며, 부작용이나 독성을 줄이는 등 결과적으로 최대의 약효를 발휘하도록 하는 조합 원리이다<sup>10)</sup>.

한의학에서의 염증은 濕熱, 血熱, 熱毒, 瘀血, 痰熱, 風濕, 虛血 등과 그 기전이 유사하며, 清熱燥濕, 清熱涼血, 清熱解毒, 祛風勝濕, 滋補陰血 등의 효능을 가진 본초들이, 風濕痹痛, 跌打損傷 등의 각종 염증성 질환에 처방되어 치료에 사용되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 염증성 질환에 널리 사용되고 있는 祛風藥에 속하는 羌活, 威靈仙의 조합과 七情과의 관계를 염증모델을 이용하여 과학적으로 입증하고자 하였다.

염증반응은 외부의 자극이나 다른 질병에 대한 생체의 방어반응으로, 다양한 세포와 cytokine들이 관여하는 일련의 과정으로, 그람음성 세균의 세포벽에서 분리된 생물학적 독소 LPS와 같은 외부자극이나 arachidonic acid와 같은 세포내 대사물의 자극으로 대식세포나 과립구 등이 활성화 된다<sup>11-12)</sup>. 이때 활성화된 대식세포는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 family 뿐만 아니라 NO나 PGE<sub>2</sub> 등과 같은 염증과 관련한 많은 염증 유발 인자를 분비하여 염증반응이 진행된다. 염증 매개 물질이 과량으로 분비되면, 면역반응에 이상을 초래하게 되고, 이로써 세균성 패혈증, 류마티스성 관절염, 만성 염증, 뇌질환 및 심혈관계 질환 등을 비롯한 주요 질환의 발병 원인이 된다<sup>12-16)</sup>.

대식세포를 활성화하는 대표적인 cytokine은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등이 있다<sup>17)</sup>. 이들은 염증 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화 시키고, NO, PGE<sub>2</sub> 등 염증 매개 인자의 생성량을 증가시키며, 염증물질로 알려진 PGE<sub>2</sub>는 국소적으로 활성화되는 물질로서 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase (COX)에 의해 합성된다<sup>18-19)</sup>. COX는 두 가지형태로 존재하는데, COX-1은 대부분 조직에서 발현되며, COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 family, growth factors 등에 의해 대식세포, 단핵구, 혈관내피세포 등에서 발현된다<sup>19-20)</sup>. 반면, NO는 활성산소로서 신경계 및 면역계의 전달물질로서, 세포 내 항상성의 유지, 물질의 운반, 세포독성 등 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다<sup>21)</sup>. NO는 L-arginine으로부터 Nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 합성되며, 칼슘농도의 의존적인 eNOS, nNOS, 칼슘의 농도에 상관없이 외부자극에 지속적으로 생성되며 염증반응에 관여하는 iNOS 세 가지 형태로 존재한다고 알려져 있다<sup>22)</sup>.

이에 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가되는 염증 유발 인자를 억제하거나 감소시키는 방법에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 한약재로부터 유래되는 생리활성 성분이나 화합물이 치료를 위한 표적물질이 되고 있다<sup>23-25)</sup>. 한편, 기존 연구 내용을 검색한 결과 한방임상에서 자주 사용되는 한약 조합의 七情원리에 대한 명쾌한 과학적 근거에 대한 연

구가 거의 없었으며, 대부분 신약개발을 목적으로 한약재의 생리활성을 검색하고, 활성을 증가시킬 목적으로 유효약재와 그 화학적 구성성분 간의 조합을 사용한 연구에 한정이 되어 있었다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 마우스 대식세포와 항염증 동물모델 마우스를 이용하여 염증 매개 인자들의 분비에 대한 羌活과 威靈仙의 상승효과를 조사하고, 본초학적 七情원리 중 相使의 이론을 과학적으로 입증하고자 하였다.

먼저 약재 독성을 알아보기 위하여 羌活, 威靈仙 추출물과 羌活과 威靈仙 혼합추출물을 처리한 후 MTT assay를 수행한 결과, 모든 약재 및 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 또한 羌活과 威靈仙 혼합추출물의 염증 매개 물질의 분비량에 영향을 주는지 확인하기 위하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, NO를 측정하고 결과 羌活과 威靈仙 혼합추출물 100  $\mu$ g/ml 처리 시, 각 단독 약재 100  $\mu$ g/ml을 처리한 군에 비해 현저하게 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> 생성량을 억제하여 상승효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 특히 IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub>에 대한 분비억제 효과는 매우 뛰어난 것으로 확인 되었으며, 이러한 억제효과는 염증반응에서 PGE<sub>2</sub>의 생성을 조절하는 COX-2와 IL-1 $\beta$  생성을 조절하는 IL-1 $\beta$  converting enzyme (ICE)의 활성과 연관되어 있을 것으로 예상된다. 그러나 NO를 측정해본 결과, 모든 약재처리군은 LPS 단독처리군에 비해 현저하게 NO를 억제하였으나, 羌活과 威靈仙 혼합추출물 처리군은 약재 단독처리 군에 상승효과를 보이지 않았다. 또한, 염증 동물 모델을 사용한 동물실험에서도 羌活과 威靈仙 혼합추출물 처리 시 각각의 단독 약재 처리군에 비해 현저하게 귀부종을 억제하는 것으로 확인 되었다.

한약의 配伍 원칙인 七情 이론 중 相使를 기반으로 선별한 羌活과 威靈仙 혼합추출물을 이용하여 항염증 상승작용을 확인한 결과, 세포 및 동물 모델 모두에서 전반적인 항염증 상승작용이 나타나는 것으로 확인하였으며, 본 연구를 토대로 羌活과 威靈仙의 상승작용연구 뿐 아니라, 두 약재의 성분함량의 변화 및 염증단계에서의 NF- $\kappa$ B, p53, MAPK, COX-2 등의 상하위 염증매개물질의 작용기전의 연구 등과 같은 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 염증성 질환에 널리 쓰이는 羌活과 威靈仙에 대하여 본초 배합 이론의 相使를 과학적으로 확인하기 위해 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포와 마우스 귀부종 모델을 이용하여 항염증 상승작용 및 그 작용기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 羌活과 威靈仙, 그리고 두 약재 혼합추출물은 LPS에 의해 활성화 된 마우스 대식세포 RAW 264.7에서 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ , 그리고 염증물질인 PGE<sub>2</sub> 생성을 유의적으로 감소시키며 탁월한 항염증 활성을 나타내었다.
2. 羌活과 威靈仙의 혼합 추출물은 각 약재 단독에 비해 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub> 생성량을 유의하게 억제하여

항염증 활성에 대한 상승작용을 나타냈으나, NO 생성량에서는 유의한 차이가 없었다.

3. TPA로 유도된 염증 모델 마우스에서 羌活과 威靈仙의 혼합 추출물은 각 약재 단독에 비해 유의한 귀부종 개선효과를 나타냈다.

이와 같은 결과들을 바탕으로 본 연구에서는 相使 관계에 있는 羌活과 威靈仙이 항염증 활성에 대하여 상승작용을 가질 가능성을 제시하며, 본 결과는 한약의 配伍 원칙인 七情을 해석함에 있어 중요한 의미와 가치가 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구논문은 한국한의학연구원 기관고유 한약물 상호작용의 과학화 연구(과제번호K09062), 한의본초 활용기반구조사업(과제번호 K09090)의 지원에 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 주영승. 운곡본초학:각론(상). 서울 : 서림재. 2004 : 40-49.
2. 전국한의학대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울 : 영림사. 2004 : 95.
3. 김창민, 박용기. 강활의 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증물질 생성에 대한 효과. 대한본초학회지. 2009 ; 24(1) : 169-178.
4. 이도연, 최고야, 윤태숙, 전명숙, 김승주, 야스카와 켄, 유소연, 김호경. 강활과 방풍의 항염증 상승작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 2008 ; 23(4) : 39-44.
5. Wu SB, Pang F, Wen Y, Zhang HF, Zhao Z, Hu JF. Antiproliferative and apoptotic activities of linear furocoumarins from *Notopterygium incisum* on cancer cell lines. *Planta Med*. 2010 ; 76(1) : 82-5.
6. 장승욱, 김연섭. 白屈菜·木果·威靈仙 혼합 약침액이 관절염 白鼠의 염증과 肝에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2004 ; 18(2) : 484-489.
7. 양국정, 김순중, 서일복, 박세근, 김정선, 서정철, 최선미, 이해정, 김이화. 위령선 약침이 콜라겐으로 유도된 골관절염 모델에서 흰쥐의 PAG 영역에서 NOS 발현에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2005 ; 22(4) : 109-116
8. 장현석. 威靈仙水鍼이 痛風誘發 흰쥐의 病理的 所見에 미치는 影響. 경산대학교 석사학위논문; 1994.
9. 특허청. 한국 전통지식 포털. Available from : URL : <http://www.koreantk.com>.
10. 주영승. 운곡본초학:총론. 서울 : 서림재. 2002 : 55-56.
11. Roth RA, Harkema JR, Pestka JP, Ganey PE. Is exposure to bacterial endotoxin a determinant of

- susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997 ; 147(2) : 300–311.
12. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug. Targets, Inflamm, Allergy.* 2005 ; 4(3) : 281–286.
  13. Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* 2005 ; 208(2) : 249–258.
  14. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005 ; 25(1) : 29–38.
  15. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* 2001 ; 429(1–3) : 195–207.
  16. Hilliquin P, Borderie D, Hernvann A, Menkes CJ, Ekindjian OG. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 1997 ; 40(8): 1512–1517.
  17. Beutler, B, Cerami, A. The biology of cachectin TNF- a primary mediator of the host response. *Annu. ReV. Immunol.* 1989 ; 7: 625–655.
  18. McCann SM, Mastronardi C, de Laurentiis A, Rettori V. The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005 ; 1057 : 64–84.
  19. 이용규, 조재열. 대식세포주 RAW 264,7 세포에서 Curcumin의 Lipopolysaccharide에 의한 Nitric Oxide 생성 억제 효과. *한국약용작물학회지.* 2007 ; 15 : 451–456.
  20. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. Immunopharmacol.* 2002 ; 2(5) : 603–630.
  21. Zschocke S, Lehner M, Bauer R. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitory active constituents from Qianghuo (*Notopterygium incisum*). *Planta. Med.* 1997 ; 63(3) : 203–206.
  22. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* 1992 ; 70(5) : 705–707.
  23. Kim EH, Shim B, Kang S, Jeong G, Lee JS, Yu YB, Chun M. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 126(2) : 320–331.
  24. Guo LY, Cai XF, Lee JJ, Kang SS, Shin EM, Zhou HY, Jung JW, Kim YS. Comparison of suppressive effects of demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on expressions of inflammatory mediators in vitro and in vivo. *Arch. Pharm. Res.* 2008 ; 31(4) : 490–496.
  25. Woo KJ, Kwon TK. Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter. *Int. Immunopharmacol.* 2007 ; 7(13) : 1776–1783.