

## 連翹의 LPS로 유도된 Raw 264.7 Cell에서의 抗炎症 효과

곡정강, 정승기, 정희재, 김진주  
경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실

### Research on Anti-inflammatory Effects of *Forsythiae Fructus*

Cheng-kang Chu, Sung-ki Jung, Hee-jae Jung, Jin-ju Kim  
Division of Allergy, Immune & Respiratory System,  
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this study was to examine the anti-inflammatory effects *Forsythiae Fructus* on LPS-activated RAW264.7 cells.

**Methods :** Statistical significance was examined through measuring MTT, nitric oxide (NO), TNF  $\alpha$ , IL 6, NOS2 and COX2 of LPS-activated RAW264.7 cells.

**Results :** In the toxicity experiment of FFE, NO significant toxicity was shown on cells in the concentration ranges of 100, 200 and 300  $\mu\text{g/ml}$ . FFE dose dependently decreases 5.49, 25.41, 33.64 % in LPS induced NO production ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ), however, FFE don't show significant difference in LPS-induced TNF  $\alpha$  and IL 6. Furthermore, FFE showed inhibiting tendency against the revelation of NOS2 and COX2 in LPS-activated RAW264.7 cells, dose-dependently according to concentration.

**Conclusions :** These results mean that FFE is effective for anti-inflammation via inhibition of NOS2 and COX2 expression.

**Key words :** *Forsythiae Fructus*, MTT, NO, TNF  $\alpha$ , IL 6, NOS2, COX2

### 1. 서 론

炎症의 가장 주된 증상은 痛症, 發熱, 發赤, 腫脹 그리고 機能喪失이다. 혈관확장에 의한 모세혈관의 팽창은 發赤(redness 혹은 紅斑)이며 조직의 온도 상승을 초래한다. 모세 혈관의 투과성 증가는 조직에의 체액과 세포의 유입을 허용하여 腫脹(swelling 또는 浮腫)이 일어나게 하며, 炎症部位로 몰려든 탐식세포는 분해효소를 분비하여 건강한 세포에

손상을 입힌다. 죽은 세포와 체액의 축적이 膿을 형성하는 한편, 탐식세포가 분비한 염증매개체는 신경을 자극하여 痛症을 誘發한다<sup>1</sup>.

염증은 cytokines, prostaglandin E2(PGE2), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있으며<sup>2</sup>, 염증반응은 염증유도물질을 유리시키고 nitric oxide synthase(NOS)를 촉진시켜 nitric oxide(NO)의 생성을 증가시킴으로써 통각유발에도 관여한다고 알려져 있다. 염증반응과정에서 유리된 염증유도물질로 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), lipopolysaccharide (LPS) 등은 L-arginine을 기질로 사용하여 결과적으로 NO

· 교신저자: 정승기 서울시 동대문구 회기동 1번지  
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실  
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148  
E-mail: jskes@gmail.com

의 생성을 증가시킨다<sup>3</sup>.

염증매개물질과 관련된 單味 연구를 살펴보면, 金銀花는 NFκB p65의 활성화억제와 IκBa의 degradation 억제<sup>4</sup>, NO, iNOS, COX2, IL-1β, TNF-α을 억제<sup>5</sup>, 호산구의 이동성 억제<sup>6</sup>을 통하여 항염증 효과가 있음을 밝혔고, 三七花는 NO, IL-1β, TNF-α을 억제하여 항염증 효과가 있다고 보고하였으며<sup>7</sup>, 黃連은 NO 및 TNF-α을 억제한다고 밝혔다<sup>8</sup>. 또한 黃芩藥鍼液이 NO, COX2, PGE<sub>2</sub>을 억제시켜 항염증효과가 있다고 보고를<sup>9</sup>, 防風은 IL-8 및 TNF-α를 억제시켜 항염증 효과가 있다고 보고 한 바 있다<sup>10</sup>. 連翹는 淸心瀉火의 작용이 있어 質이 淸淸하고 上浮하여 表裏에 透達케 하고 上焦의 風熱을 散하여 外感風熱이나 急性熱病의 치료에 多用되며<sup>11</sup>, 炎症性病變에서 기인되는 呼吸器疾患 및 炎症治療에 빈용되는 대표적인 약재 중의 하나이다. 連翹에 관한 연구로는 抗炎症<sup>12,14,15</sup>, 抗老化<sup>13</sup> 효과 및 成分<sup>16</sup>, 藥理<sup>17</sup>에 대한 보고가 있으며, 連翹를 主藥材로 하는 處方에 대한 연구로는 連翹敗毒散이 cytokine<sup>18</sup>, 감기<sup>19</sup> 및 丹毒<sup>20</sup>에 미치는 영향에 대한 보고를, 連翹湯<sup>21</sup> 및 連翹散<sup>22</sup>이 抗炎, 抗茵, 鎮痛에 대한 보고를 하였고, 加味荊芥連翹湯이 中耳炎에 미치는 영향에 대한 연구가 보고 되었다<sup>23,24</sup>. 이에 저자는 呼吸器 炎症疾患에 빈용되며, 실험적으로 炎症에 유의한 효과가 인정된 連翹의 抗炎症 효과가 어떤 기전에 의한 것인지 연구하기 위하여 본 실험에서 LPS로 활성화된 Raw264.7 cell를 이용하여 連翹의 NO분비에 미치는 영향, IL-6 및 TNF-α 생산에 미치는 영향, COX2 및 NOS2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 세포주

생쥐 단핵/대식세포 계열의 세포주인 Raw 264.7 은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학 암연구소)

에서 구입하였다. 세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>, 2g/L), 항생제 (100units/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin), 10% FBS (fetal bovine serum)를 첨가한 것을 이용하였다.

#### 2) 시 약

DMEM 배지, FBS와 penicillin (10,000U/ml)/streptomycin(10,000U/ml)(P/S)는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)회사 제품을 사용하였으며, LPS (Lipopolysaccharides)는 Difco Laboratories(Detroit, MI, USA)회사 제품을 사용하였다. 그 외 시약인 sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>)는 Sigma (MO, USA) 회사 제품을 사용하였다. 효소중합 연쇄반응에 사용한 Greiss 시약은 Promega (Madison, WI, USA) 회사제품을, IL-6와 TNF 측정에 필요한 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 BD Phamingen (CA, USA) 회사제품, COX2 (Cyclooxygenase 2), NOS2 (Nitric oxide synthase-2)와 GAPDH같은 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA) 회사제품을 사용하였다.

#### 3) 검 액

連翹(*Forsythiae Fructus*, FF)의 시료는 Sun Ten Pharmaceutial (Taipei, Taiwan)에서 구입한 후 증류수로 30mg/ml로 녹인 후, 다음 날 3,000rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 그 다음 0.22μm syringe filter를 이용하여 여과하여 10, 20, 30mg/ml로 희석하여 냉장 보관하여 사용하였다.

## 2. 方 法

### 1) 세포 생존율 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosman<sup>25</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. Raw264.7 세포를 48-well plate는 2×10<sup>5</sup> cell/well 농도로 그리고 96-well plate는 1×10<sup>4</sup> cell/well 농도로 접종한 후 각 well 에 검액을 투여하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24, 48 또

는 72 시간만큼 배양하였다. 배양 후 MTT 용액 (5 µg/ml)을 첨가하고 4시간 후 상층액을 제거하고 DMSO (dimethylsulfoxide) 300 또는 100µl를 넣어 보라색의 formazan이 용출되도록 하여 micro plate reader로 565nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

#### 2) NO 측정법

안정된 NO 산화물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(nitrite)는 Griess reagent system (Promega, USA)반응을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상층액을 flat bottom 96well plate에 50µl씩 넣고 여기에 Greiss 시약 sulfanilamide solution을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, 다시 N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) solution을 동량 첨가하여 10분간 반응 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 100nM에서부터 1.56nM까지 2배씩 희석하여 얻은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다.

#### 3) IL-6와 TNF-α 농도 측정

배양한 세포주를 LPS 단독 또는 검액과 같이 배양한 상층액을 24시간 후에 회수하여 ELISA kit로 상층액에 포함된 IL-6와 TNF-α의 양을 측정하였다. Anti-mouse IL-6 monoclonal antibody 또는 anti-mouse TNF-α monoclonal antibody를 250배 희석하여 96well plate (Corning, NY, USA)에 100µl씩 넣고 4°C에서 overnight (16시간보관)하였다. Washing buffer (PBS containing 0.05 % tween 20)로 3회 washing 후, 1% BSA(bovine serum albumin) 인 PBS를 200µl씩 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 3회 washing 후, standard와 2-10배 희석한 samples을 100µl씩 넣고 2시간 반응 후 다시 5회 washing하였다. 그 후 working detector (washing buffer로 250배 희석한 detection antibody와 streptavidin-HRP(horseradish peroxidase)-conjugated detection antibody)를 100µl씩 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 7회 washing 후, TMB substrat reagent A와 B를 동량(1 plate당 5 ml) 섞은 것을 100µl씩

넣고 어두운 곳에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 각 50µl씩 넣고 즉시 ELISA reader (EL800, Bio-Tek, VT, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량은 표준 곡선을 만들어 측정하였으며, 이 때 측정 한계치는 15.6ng/ml이었다.

#### 4) COX2와 NOS2측정 (Western bolt analysis)

LPS 단독 또는 검액과 같이 세포주를 배양한 24 시간 동안 배양한 세포주를 채취하여, cold PBS로 2회 세척하였다. 이렇게 얻은 세포는 total cell lysate를 얻기 위하여 파쇄용액(50 mM HEPES (4-2(-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)) pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM PMSF (phenylmethan esulphonylfluoride or phenylmethylsulphony fluoride), 1 µg/ml aprotinin)을 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시키고, 13,000rpm에서 20분 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액의 단백질을 bicinchoninic acid(BCA)법으로 정량하고, 동량의 단백질 (10µg)은 5× sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동 후 gel의 단백질을 electrotransfer system (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)을 이용(0.8mA/cm)하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켰다. COX2, NOS2와 GAPDH에 대한 항체는 0.05 %(v/v)의 tween 20이 함유된 TBS-T(tris-buffered saline)에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 4°C에서 overnight하였으며, 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase(HRP)를 TBS-T로 희석(1:5000)하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 enhanced chemilluminescence(ECL) kit(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 이용하여 ECL 필름에 감광, 현상하였다

#### 5) 통계

통계 처리는 Prism 4 software (GraphicPad Software

Inc., CA, USA)을 사용하여 post test (Dunnett)을 포함한 one-way ANOVA test로 유의성을 측정하였다. 결과는 mean ± S.E.M으로 표시하였고, 통계적 유의성 차이는 \* $P < 0.05$  또는 \*\*\* $P < 0.001$  로 정의하였다.

### III. 결 과

#### 1. 세포 성장률

1) 連翹 단독처리시 Raw 264.7 cell 독성과 성장에 대한 영향

連翹의 Raw 264.7 cell에 대한 세포 독성과 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 連翹를 100, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 24, 48 그리고 72 시간 배양 후에 무처리군을 100%으로 하여 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1A, B 그리고 C). 그 결과, 24시간 배양 시 連翹 100, 200 그리고 300 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 107.7, 109.1 그리고 110.1%, 48시간 배양 시 각각 105.2, 89.69 그리고 60.14% ( $p < 0.001$ ), 72시간 배양 시 각각 92.60, 84.22 그리고 60.92% ( $p < 0.001$ ) 를 나타내어 連翹 300 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 48과 72간 배양 시 무처리군에 비해 유의성 있는 독성을 나타내었다. 그러나, Fig. 1D에서 보는 것과 같이 24시간 배양한 무처리군을 100%으로 보았을 때 24, 48 그리고 72시간 배양 시에 세포 성장을 살펴본 결과, 連翹 300 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 48시간과 72시간 배양 시에 나타난 유의한 독성은 Raw 264.7 cell의 성장 억제에 기인한 것으로 보인다. 따라서 세포 성장에 영향이 없는 24시간을 기준으로 다음 실험을 진행하였다.

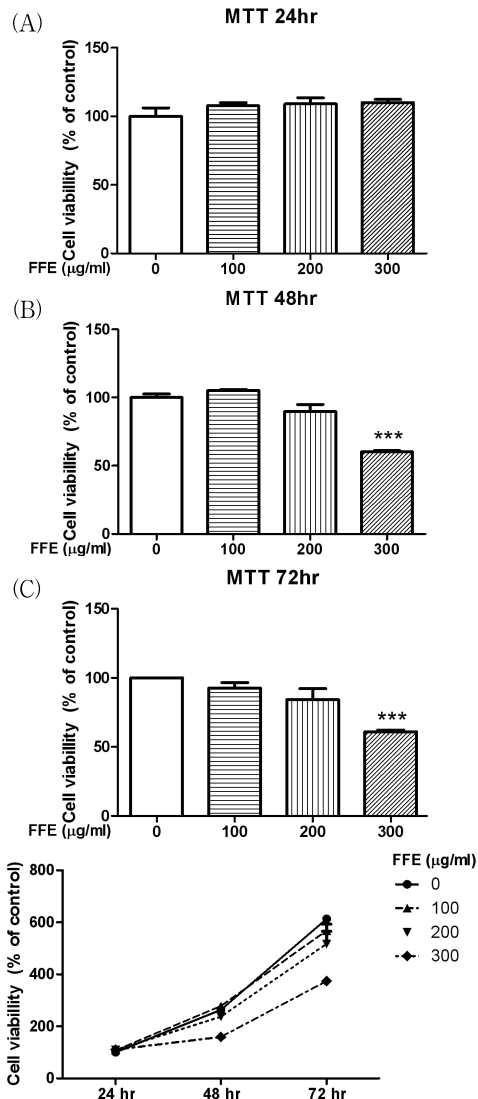


Fig. 1. Effect of FFE on the toxicity and proliferation of Raw 264.7 cell.

FFE was treated for 24(A), 48(B) and 72(C) h as concentration of 0, 100, 200 and 300  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. In (D), it is revealed the effect of FFE on cell proliferation for 72 h. The effect of these on the toxicity of cell was checked by MTT analysis method. The result was shown as the mean  $\pm$  S.E.M.. \*\*\* $P < 0.001$  compared with no treated group.

FFE : *Forsythiae Fructus* extract

2) 連翹 와 LPS 투여시 Raw 264.7 cell 독성과 성장에 대한 영향

Fig. 2에 나타난 것과 같이 連翹를 LPS 1 µg/ml 과 같이 100, 200, 300µg/ml의 농도로 처리하고 24 시간 배양 후에 아무런 처리를 하지 않은 그룹 (control)과 LPS만 처리한 그룹과 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 비교하였다. 무처리군을 100%로 보았을 때, LPS만 처리하였을 경우와 連翹를 LPS 1µg/ml과 같이 100, 200, 300µg/ml의 농도로 처리한 경우 각각 세포 생존율이 100.1, 102.9, 97.93 그리고 102.4%로 나타났다. 따라서 이 농도 범위에서 連翹는 세포성장억제효과가 나타나지 않은 것으로 생각되어 이 농도 범위를 기준으로 실험을 실시하였다.

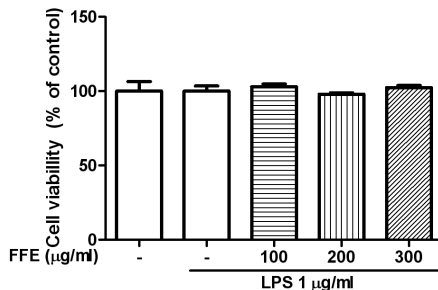


Fig. 2. Effect of FFE on the toxicity of Raw 264.7 cell treated with LPS.

Cells were pretreated with FFE (100, 200 and 300 µg/ml) for 1 h followed with LPS (1 µg/ml) for 24 h. The effect of these on the toxicity of cell was checked by MTT analysis method. The result was shown as the mean ± S.E.M.  
FFE : *Forsythiae Fructus* extract

## 2. 대식세포주 NO 생산에 미치는 효과

RAW264.7에 대식세포의 NO 생산을 유도하는 것으로 알려진 LPS를 連翹와 함께 처리하여 24시간 배양한 후, 배양액 중 대식세포가 생산한 NO로부터 산화된 형태인 NO<sub>2</sub>-농도를 측정하였다. LPS를 단독으로 처리하였을 때의 NO<sub>2</sub>-농도가 37.84nM 정도까지 증가하였지만, 連翹를 같이 처리하였을

때 NO<sub>2</sub>-농도는 連翹 100, 200, 300µg/ml에서 각각 35.76, 28.22, 25.11nM로 농도의존적으로 감소하였다 (Fig. 3). 즉, 連翹는 100, 200, 300µg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 대식세포의 NO생산에 대해 각각 5.49, 25.41, 33.64% 억제 효과가 관찰 되었다.

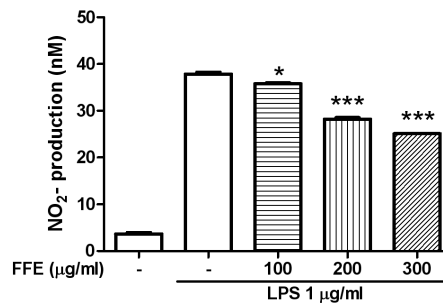


Fig. 3. Effects of FFE on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.

Cells were pretreated with FFE (100, 200 and 300 µg/ml) for 1 h followed with LPS (1 µg/ml) for 24 h. Nitrite in the medium was measured using Griess reagent.

FFE : *Forsythiae Fructus* extract

\*P < 0.05 or \*\*\*P < 0.001 compared with LPS alone.

## 3. IL-6와 TNF-α 생산에 미치는 효과

連翹에 의한 NO 생산 억제가 직접적으로 대식세포의 NO 생산을 억제함으로써 일어나는지 또는 NO 생산을 유도하는 다른 물질의 생산을 억제한 간접적인 결과인지를 알아보기 위하여 대식세포가 생산하는 대표적인 Cytokine인 IL-6와 TNF-α의 양을 측정하였다. LPS를 단독으로 처리하였을 때는 IL-6와 TNF-α의 농도가 각 2,500과 17,479ng/ml 정도까지 증가하였으며, 連翹를 같이 처리하였을 때는 IL-6와 TNF-α농도는 LPS 단독 처리군과 비교하여 유의한 감소 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

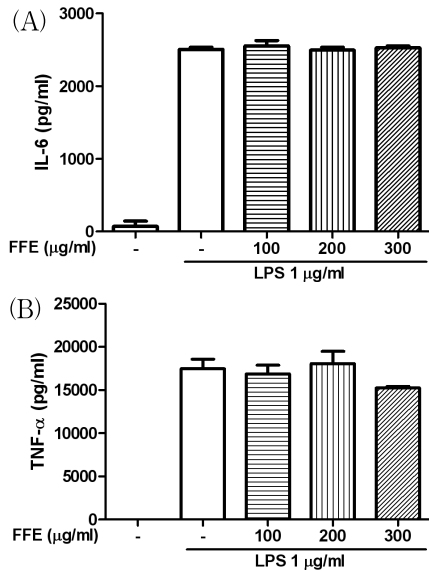


Fig. 4. Effect of FFE on IL-6 and TNF-α production by LPS-induced Raw 264.7 cell.

Cells were pretreated with FFE (100, 200 and 300 μg/ml) for 1 h followed with LPS (1 μg/ml) for 24 h. The concentration of IL-6 and TNF in the medium was measured by ELISA.  
 FFE : *Forsythiae Fructus* extract

4. COX2와 NOS2 발현에 미치는 효과

염증매개물을 생성하는 효소인 COX2와 NO생산 단백질인 NOS2의 세포내 단백질 발현 정도를 western blot 분석법을 이용하여 관찰하였다. 즉, 連翹 100, 200 and 300μg/ml와 함께 24시간 배양한 RAW264.7 세포주에서 단백질을 추출하여 COX2과 NOS2의 발현량을 살펴보았다. 그 결과 무처리 군에서는 COX2과 NOS2가 유도되지 않았고, LPS 1μg/ml 만을 처리한 군에서는 강하게 COX2와 NOS2 발현이 유도되었다. 그리고 連翹를 같이 처리한 군에서는 LPS만을 처리하였을 때보다, COX2 발현이 농도 의존적으로 100, 200, 300μg/ml에서 각각 68.89, 88.89, 91.67% 억제되고 NOS2 발현도 농도 의존적으로 100, 200, 300μg/ml에서 각각 13.64, 27.27, 36.36% 억제되는 것이 관찰 되었다(Fig. 5).

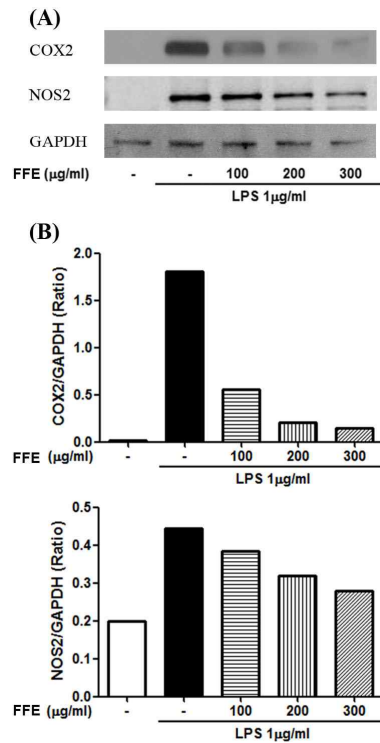


Fig. 5. Effect of FFE on COX2 and NOS2 production by LPS-induced Raw 264.7 cell.

(A) Cells were pretreated with FFE (100, 200 and 300 μg/ml) for 1 h followed with LPS (1 μg/ml) for 24 h. The cyto-cell lysates were analyzed by Western blot analysis. (B)The ratio of COX2 and NOS2 to GAPDH protein expression was expressed.  
 FFE : *Forsythiae Fructus* extract

IV. 고찰

염증은 조직손상이나 상해를 입었을 때 표출되는 반응이며 발적, 발열, 종창, 통증을 수반하는 생체 방어작용이다. 염증 반응 매개체로 알려진 cytokine과 chemokine 중 대표적인 cytokine은 IL-1, IL-6, TNF이고, chemokine은 MCP-1과 M-CSF등이다<sup>26</sup>.

염증반응을 일으킬 수 있는 세포에 외부 자극이 가해지면, IL-1β와 TNF-α등의 전-염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 발현이 유도되

고, 유도된 전-염증성 사이토카인이 호중구를 활성화하여 염증 부위로 이동시키고, iNOS, COX2를 코딩하는 유전자의 발현을 자극함으로써 염증반응에 관여하는 nitric oxide(NO), PGE2의 반응성 물질을 생성하게 하여 염증반응이 일어나게 되는데, 이 중 NO는 혈관 확장 및 조직 손상에 주로 관여하고, PGE2는 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로 알려져 있다<sup>27</sup>.

염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하여 각종 염증성 질환을 유발시키고 악화시키게 된다. 특히 만성염증에서는 NOS, COX와 같은 효소 및 signaling proteins의 상승 조절 작용을 일으켜, NO와 prostaglandins(PG)를 과량 생성하게 되고, 이는 류마티스관절염, 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 질환의 병인이 된다<sup>27</sup>.

韓醫學에서 염증 질환에는 주로 淸熱法을 사용해왔으며, 淸熱解毒藥은 대부분 抗菌抗病毒의 作用과 解毒 및 消炎作用이 있어 化膿性 또는 感染性 질환에 사용하였고, 淸熱涼血藥은 營分과 血分의 熱邪를 解毒하는 作用이 있어 熱邪가 營血에 들어가 傷陰耗液하는 증상에 사용되었다<sup>28</sup>.

連翹는 上焦의 風熱을 散하는 效能으로 外感風熱이나 急性熱病의 치료에 多用되며<sup>11</sup>, 염증성병변에서 기인되는 호흡기질환 및 염증치료에 빈용되는 대표적인 약재 중의 하나로 개나리(*Forsythia koreana* Nakai), 의성개나리(*F. viridissima* Lindle), 당개나리(*F. suspense* Vahl.)의 果實이다. 性는 微寒 無毒하고 味는 苦하며 入心肺膽經하여 淸熱解毒, 消腫散結, 淸熱利尿의 效能이 있어 溫熱, 丹毒, 斑疹, 癰瘍腫毒, 小便淋閉등의 증상을 治療한다<sup>29-34</sup>.

性味가 苦寒하여 苦味는 瀉火하고, 寒性은 淸熱하며, 또한 質이 淸淸하여 上浮하므로서 表裏에 透達케 하여 淸心瀉火에 特長이 있으므로 上焦의 風熱을 散하여 外感風熱이나 또는 急性熱病으로 인한 煩熱神昏과 血熱發斑의 症에 多用한다<sup>29-34</sup>.

한편, 心火를 淸하고 氣血을 宣暢하여 血結氣聚

를 散하므로 消腫散結시키는 效能이 있어 瘡瘍腫毒과 癰癥結核을 治療하는 瘡家の 聖藥이 된다<sup>29-34</sup>.

이에 <東醫寶鑑><sup>35</sup>에서는 “主癰癥, 癰腫, 惡瘡, 癭瘤, 結熱, 蠱毒”, <醫學入門><sup>36</sup>에서는 “苦寒散心火, 脾經濕熱特淸可, 排膿消腫用作君, 治血痛淋爲之左” 라고 언급되어있다. 連翹에 함유된 성분으로는 phillyrin(forsythin), phillygenin, (+)-pinoselinol, (+)-pinoselinol-β-d-glycosides 등의 lignan을 주로 함유하고 있다. 이 외에 oleanolic, betulic acid, ursolic acid, rutin, forsythoside A, C, D 등이 함유되어 있으며, 과실에는 phillyrin 0.16%와 oleanolic 2.28% 정도 함유되며, 連翹心에는 forsythoside가 7.46%나 함유되어 있다. 정유성분은 주로 α, β-pinene, terpinen-4-ol 등의 terpenoids 화합물로 구성되어 있으며, 果皮 중에는 미량의 β-cymene, terpinen-4-ol가 있으며, 藥理作用으로 Lignan계인 pinoselinol, matairesinol 등에는 염증발생시 활성이 증가하는 cyclic AMP phosphodiesterase의 저해작용이 있고, 배당체인 forsythiaside, suspensoside에 황색포도상구균에 대한 항균작용이 있으며, phillyrin은 혈압강하 작용이 있다고 보고되었다<sup>17,32</sup>. 連翹에 관한 연구로 김 등<sup>12</sup>은 連翹 추출물이 Microglia에서 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성 억제 효과에서 NO, iNOS, TNF-α, IL-6, IL-β을 효과적으로 억제 시켰다는 보고를, 김 등<sup>13</sup>은 連翹 추출물이 항노화 작용이 있어 주름 개선효과가 있다는 보고를, 이 등<sup>14</sup>은 連翹가 만성 비세균성 전립선염에 미치는 영향에서 IL-1B, TNF-α, iNOS의 발현을 억제한다고 보고하였다. 곽<sup>18</sup>은 連翹敗毒散 물抽出物이 항알레르기 調節效果가 있다고 밝혔고, 강 등<sup>21</sup>은 連翹湯 및 加味連翹湯이 妬乳에 소염, 진통, 항균작용이 있다고 밝혔으며, 문 등<sup>37</sup>은 連翹 Water extract이 혈압강하 효과가 있다고 보고하였다. 段 등<sup>38</sup>은 淸熱作用에서 金銀花 및 連翹는 單方보다는 配伍方이 淸熱作用이 더 優秀하다고 밝혔고, 吳 등<sup>39</sup>은 連翹가 抗鬱症 및 抗愛滋病에 효과가 있다고 보고하였다. 권 등<sup>40</sup>은 連翹敗毒散加味方이

알러지성 접촉피부염에 미치는 영향에 대한 보고를, 김 등<sup>41</sup>은 renyolone의 caspase 유도저해활성은 신경 관련 질환 등을 조절할 것이라고 추정한다고 하였고, 이 등<sup>42</sup>은 連翹敗毒散이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비를 억제하여 기관지 과민반응을 조절한다고 보고하였다. 김 등<sup>43</sup>은 連翹敗毒散加味方이 炎症狀態의 面胞에 미치는 影響에 대해 보고를, 곽<sup>44</sup>은 連翹敗毒散이 효과적으로 대상포진을 치료한다 하였다.

따라서 저자는 連翹의 항염증 작용을 LPS로 활성화된 Raw264.7 cell의 NO분비, IL-6 및 TNF- $\alpha$  생산, COX2 및 NOS2 발현에 미치는 영향을 통하여 기전을 연구 관찰 하였다. 連翹의 Raw264.7 cell에 미치는 독성의 영향을 알아보기 위해 MTT분석법을 이용하였으며, 100, 200, 300 $\mu$ g/ml 농도의 連翹를 24, 48 그리고 72시간 배양 후에 무처리한 대조군을 100%으로 하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 24시간 배양 시 連翹 100, 200 그리고 300 $\mu$ g/ml 농도에서 각각 107.7, 109.1 그리고 110.1%로 나타났고, 48시간 배양 시 각각 105.2, 89.69, 60.14% ( $p < 0.001$ ) 로, 72시간 배양 시 각각 92.60, 84.22, 60.92% ( $p < 0.001$ ) 가 나타났다. 즉 100, 200 $\mu$ g/ml 농도 連翹에서는 24, 48 그리고 78시간 모두에서 성장억제가 보이지 않았으나, 300 $\mu$ g/ml 連翹에서는 48과 72간 배양 시에 무처리군에 비해 세포의 성장억제가 관찰되었다. 따라서 100, 200, 300 $\mu$ g/ml 농도의 連翹를 24시간을 기준으로 다음 실험을 진행 하였다.

24시간 배양을 기준으로 하여 염증유도물질인 LPS와 連翹 동시 처리 시 Raw264.7 cell에 미치는 독성의 영향을 알아보기 위하여 100, 200, 300 $\mu$ g/ml 連翹와 LPS 1 $\mu$ g/ml를 동시에 처리하여 배양한 결과 세포 생존율이 100.1, 102.9, 97.93, 102.4 %로 나타나, 세포성장억제 효과를 관찰할 수 없었다. 그러므로 Raw264.7 cell을 자극하는 LPS의 적정농도는 LPS 1 $\mu$ g/ml로 결정하였다.

NO는 심혈관계 및 신경계에서 주요한 신호전달

물질이며, 숙주의 방어에도 역할을 하는 것으로 알려졌다. 일반적으로 대식세포 및 간세포에서 L-arginine 으로부터 NO 합성경로를 통해 iNOS에 의해 합성되는 작은 분자량의 자유 라디칼로서 세포내 항상성 유지, 신경전달 물질 운반, 항암작용 및 세포독성 등에 관여하는 신호전달자로서, 특히 LPS나 interferon gamma(IFN- $\gamma$ ),  $\beta$ -amyloid 등의 자극으로 활성화된 대식세포로부터 과도하게 생성되어 세포독성과 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>7</sup>. 또한 NO는 전염증성 또는 항염증성 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 NO 생성은 세포를 파괴하고 shock에 의한 혈관확장 및 염증반응을 촉진하여 조직에 독성으로 작용하여 조직손상을 유발한다고 하였다<sup>5</sup>. 이에 김 등<sup>12</sup>은 연교추출물이 microglia 세포주인 BV-2 세포로부터 NO를 억제시켜 퇴행성 뇌질환의 염증반응에 항염증 효과를 확인하였다.

본 실험에서는 連翹의 대식세포주 NO 생산에 미치는 효과를 알아보기 위해 100, 200, 300 $\mu$ g/ml 連翹를 처리한 결과, LPS를 단독으로 처리하였을 때의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>농도가 37.84nM 정도까지 증가하였지만, 連翹와 동시에 처리하였을 때는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>농도가 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 결과로 보아 連翹는 NO의 생산을 억제함으로써 염증반응에 의한 조직손상을 감소 할 수 있을 것으로 생각된다.

TNF- $\alpha$ 는 세균의 endotoxin과 같은 외부항원에 의해 활성화된 대식세포에 의해 주로 생성되나 T 세포, B세포, NK세포에서도 생성된다. TNF- $\alpha$ 는 염증 반응, 상처치료와 조직의 재생에 관여하며, 악액질(cachexia)과 패혈증(septic shock)을 유발하기 때문에 cachetin이라고도 한다. TNF- $\alpha$ 는 TNFR-1에 결합하여 전사조절인자인 NF- $\kappa$ B와 AP-1을 활성화시켜 염증 반응과 면역기능을 조절할 수 있는 유전자 발현을 유도하며, 조직에 따라 TNF- $\alpha$ 는 TNFR-1을 통하여 세포사멸을 유도하기도 한다<sup>26</sup>.

IL-6는 IL-1과 TNF에 반응하여 혈관세포, 식세포, 섬유아세포, 활성화된 T세포및 다양한 암세포



에서 분비된다. IL-6에 반응하는 주요 세포는 간세포와 B세포이며, B세포는 항체를 분비하는 세포로 분화시키고 B세포 분화 말기에 활성화된 B세포의 주요 성장인자로 작용한다. 또한 간세포에 작용하여 섬유소원(fibrinogen) 같은 급성기 단백질의 형성을 유도한다<sup>26</sup>. 이와 관련된 연구에서 김 등<sup>12</sup>은 BV-2 세포에서 생성된 TNF- $\alpha$  및 IL-6가 連翹 추출물에 의해 효과적으로 억제해 각종 뇌염증 질환에 이용될 수 있다고 하였고, 이 등<sup>24</sup>은 加味荊芥連翹湯이 TNF- $\alpha$  및 IL-6를 억제시켜 소아 재발성 삼출성 중이염에 세포활성물질의 생성을 조절한다고 밝혔고, 송<sup>45</sup>은 連翹가 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제하여 알레르기성 염증반응을 조절한다고 밝혔다.

본 실험에서는 連翹가 NO 생산 억제효과에 대한 기전을 알아보기 위하여 시행한 TNF- $\alpha$  및 IL-6 분비 농도 측정에서 LPS를 단독으로 처리하였을 때의 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 농도와 100, 200, 300 $\mu$ g/ml 連翹를 같이 처리하였을 때의 TNF- $\alpha$  및 IL-6 농도는 거의 변화가 없었다. 단지 TNF- $\alpha$  분비가 300 $\mu$ g/ml 連翹에서 약간 감소하는 효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 Raw 264.7 cell에서의 連翹에 의한 항염증 효과는 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 억제 보다는 NO 생산을 주로 억제하여 나타나는 것으로 생각된다.

COX는 arachidonic acid을 prostaglandin으로 전환시키는 데 중요한 역할을 하는 효소로, COX에는 2가지 형태의 동형효소가 존재하는 것이 알려졌다고, 각각 발견된 순서에 따라 COX1과 COX2로 명명되었다. COX1은 대부분의 정상 조직에서 발현되어 있으며, 위점막의 보호, 혈액응고작용, 신장 기능조절 등의 관리역할을 하지만, COX2는 매개체에 의해 유도되어 나타나며, 통증, 염증, 발열작용 등에 관여하며, 근래에는 세포의 자연사억제 및 여러 가지 종양의 증식 과정에 관여함이 밝혀졌다<sup>46</sup>.

L-arginine로부터 NO를 형성하는 합성효소(nitric oxidase, NOS)는 크게 두 가지로 분류된다. 하나는 세포 내에 항상 존재하며 소량의 NO를 생성하는

cNOS와 염증 등의 자극에 의해 활성화된 대식세포 등에서 유도되는 NOS2(iNOS)가 있다. 그 중 iNOS는 LPS, IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량으로 NO를 생성하며, 생성된 NO는 조직을 손상시키는 염증매개물질로 작용한다. 또한 iNOS의 과잉 발현은 만성관절염, 심근염, 사구체염, 인슐린 의존성 당뇨병, 과민성 대장염 등을 초래한다고 하였고<sup>47</sup>, 유 등<sup>48</sup>은 連翹 추출물이 COX2, NOS2의 발현을 조절, NO의 생성을 억제함으로써 항염증작용이 있음을 밝혔고, 이 등<sup>14</sup>은 連翹가 전립선의 선조직의 보호작용과 결합조직의 증식억제 작용을 나타내 TNF- $\alpha$  및 NOS2의 발현을 억제하여 항염증작용이 있음을 밝혔다. 또한 고용량의 連翹 투여가 간장 및 신장의 독성을 유발하지 않는다는 것도 확인하였다.

본 실험에서는 COX2 및 NOS2의 세포 내 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot 분석법으로 확인하였다. 連翹는 각 100, 200, 300 $\mu$ g/ml 농도별로 처리한 결과, LPS만을 처리한 대조군에서는 강하게 COX2 및 NOS2 발현이 유도되었고, 連翹를 같이 처리한 군에서는 LPS만을 처리하였을 때보다, COX2 및 NOS2 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 억제 현상은 連翹의 농도가 높아짐에 따라 더욱 커지는 것으로 나타나, LPS로 자극한 Raw 264.7 cell에 미치는 連翹의 영향은 염증과 관련된 cytokine인 IL-6 및 TNF- $\alpha$  분비 억제 보다는 염증매개물질인 COX2 및 NOS2의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 감소시켜 항염증작용이 나타났다고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 連翹가 LPS로 활성화된 Raw264.7 cell에서 NO분비에 미치는 효과, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 생산에 미치는 효과, COX2 및 NOS2 발현에 미치는 영향을 연구 관찰하여 NO의 생성을 감소시키는 항염증작용은 COX2 및 NOS2 등의 염증매개물질들을 생성 억제하여 나타난 항염증 작용임을 확인할 수 있었다. 이는 連翹가 염증성 질환

에 대해 치료제로 유용하게 쓰여질 수 있음을 시사하였고, 입상의 활용과 항염증작용과 관련된 작용 기전을 확인하기 위하여 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### V. 결론

100, 200, 300 µg/ml 농도의 連翹가 LPS로 활성화된 Raw264.7 cell의 NO분비, IL-6와 TNF-α 생산, COX2 및 NOS2 발현에 미치는 영향을 연구 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Raw 264.7 cell에 100, 200, 300µg/ml 농도의 連翹를 LPS 1µg/ml과 같이 처리하여 24시간 배양한 결과 세포 성장억제가 보이지 않았다.
2. Raw 264.7 cell을 LPS 1µg/ml로 자극한 후 생산된 NO는 連翹를 100, 200, 300µg/ml의 농도로 처리 하였을 때 농도 의존적으로 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 감소시켰다.
3. Raw 264.7 cell을 LPS 1µg/ml로 자극한 후 생산된 IL-6와 TNF-α는 連翹를 100, 200, 300µg/ml의 농도로 처리 하였을 때 IL-6와 TNF-α 생산을 감소시키지 않았다.
4. Raw 264.7 cell을 LPS 1µg/ml로 자극한 후 발현된 COX2와 NOS2는 連翹를 100, 200, 300µg/ml의 농도로 처리 하였을 때 COX2와 NOS2 발현을 농도 의존적으로 억제 하였다.

### 참고문헌

1. 이만형. 면역학. 서울: 신일북스; 2008, p. 50.
2. Storrek M, Schilling M, Burkhardt, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogrmric kidney perfusion. *Transpl Int.* 1994;7(Suppl1):647-9.

3. 황승준, 이종환, 정태진, 홍혜남, 임중우, 황재현, 최윤. Freund's complete adjuvant로 유도된 염증성 통증 모델 쥐 뒤뿌리신경절에서 nitric oxide의 변화. *대한해부학회지.* 2000;33(2):135-42.
4. Lee, J.H., Ko, W.S., Kim, Y.H., Kang, H.S., Kim, H.D., Choi, B.T. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaB alpha degradation in rat liver. *Int J Mol Med.* 2001 ;7(1):79-83.
5. 이동연, 이재령, 김영우, 변성희, 신상우, 서성일, 권택규, 변준석, 김상찬. 金銀花 및 金銀花全草가 Raw264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2005;19(2):481-9.
6. 정광진. 金銀花가 喘息유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2005;26(1):129-42.
7. 주예진, 정혜미, 서운교. 三七花의 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide와 전염증성 사이토카인의 생성 억제효과. *대한한의학회지.* 2009;30(1):150-62.
8. 정효원, 박용기. 黃連의 쥐 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide 및 TNF-α의 생성 억제효과. *대한본초학회지.* 2006;21(2):165-73.
9. 최영광, 박성호, 서일복, 김호현, 김정선, 김이화. 黃芩藥鉞液이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 항염증효과. *대한약침학회지.* 2003;6(3):5-14.
10. 金東旻. 방풍과 갯방풍의 항염증 효과 비교연구. *경희대학교 대학원 석사학위논문.* 2006.
11. 上海中醫學院. 中草藥學. 香港: 商務印書館香港分館; 1987, p. 139-40.
12. 김성윤, 박용기. 連翹 추출물의 Microglia에서 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성 억제 효과. *대한본초학회지.* 2008;23(3):93-102.

13. 김미진, 김자영, 정택규, 최상원, 윤경섭. 連翹추출물의 피부 항노화 효과. 한국생물공학회지. 2006;21(6):444-50.
14. 이진신, 안영민, 안세영, 두호경, 이병철. 連翹가 만성 비세균성 전립선염 Rat의 염증발현인자 및 세포조직 변화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2006;27(3):641-54.
15. 황진영, 김이화, 김희택. 連翹藥液이 기관지 상피세포주에서 TNF 및 IL-4에 의한 케모카인 발현. 대한경락경혈학회지. 2008;25(1):131-8.
16. 金鍾禹. 連翹의 成分研究. 경희약대논문집. 1979;7:9-14.
17. Lee, E.B. and Keum, H.J. Pharmacological studies on Forsythiae Fructus. Kor. J. Pharmacogn. 1988 ;19(4):262-9.
18. 락노규. 連翹敗毒散 물 抽出物의 마우스 Th1/Th2 사이토카인 調節에 의한 항알레르기 效果. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):844-52.
19. 배한호, 강위창, 박양춘. 감기에 대한 連翹敗毒散의 유효성 평가를 위한 community-based 이중맹검 위약 대조군 연구. 동의생리병리학회지. 2008;22(1):234-45.
20. 윤소원, 윤정원, 윤희정. 連翹敗毒散으로 치료한 단독의 증례 보고 4례. 동의생리병리학회지. 2003;17(4):1120-4.
21. 강동환. 妬乳에 활용되는 連翹湯 및 加味連翹湯이 소염, 진통 및 항균작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 1992.
22. 박지수. 連翹散이 아토피 동물 모델에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2005.
23. 김현희, 박은정, 주종천. 소아(小兒) 재발성(再發性) 삼출성(滲出性) 중이염(中耳炎)에서 가미형개연교탕(加味荊芥連翹湯)이 중이강(中耳腔) 삼출액(滲出液) 내(內) IL-8과 TGF-β1에 미치는 영향(影響). 대한한방소아과학회지. 2002;16(2):39-49.
24. 이은미, 박은정. 소아(小兒) 재발성삼출성(再發性) 중이염(中耳炎)에 가미형개연교탕(加味荊芥連翹湯)이 중이강삼출액내(中耳腔滲出液內) 세포활성물질(細胞活性物質)에 미치는 영향(影響). 대한한방소아과학회지. 1999;13(2):149-70.
25. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunologic methods. 1983;65(1-2):55-63.
26. 표석능, 손은화. 면역학개론. 서울: 신일북스; 2008, p. 170, 153-5.
27. 박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강전모, 최일환, 김수일, 심범상, 이제현, 임사비나. 계지의 항염 효과에 관한 연구. 대한한의학회지. 2005;26(2):140-51.
28. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社; 1998, p. 159, 188, 192, 197-8, 201, 212.
29. 서부일, 정국영. 알기쉬운 본초학. 대구: 대구한의대학교 출판부; 2007, p. 90-1.
30. 徐國鈞. 中草葯彩色圖譜(修訂本). 福建: 福建科學機術出版社; 1997, p. 417.
31. 서부일, 이재현, 최호영, 권동렬, 부영민. 韓藥本草學. 서울: 永林社; 2006, p. 246-8.
32. 김대근, 김만배, 김훈, 박진한, 임종필, 홍승천. 본초생약학. 서울: 신일북스; 2009, p. 124.
33. 康秉秀, 高雲彩, 金先熙外. 本草學. 서울: 永林社; 1998, p. 199-201.
34. 顏正華. 中葯學. 北京: 人民衛生出版社; 1991, p. 165-7.
35. 허준. 原本東醫寶鑑. 서울: 民衆書閣; 1992, p. 736.
36. 이연. 編註醫學入門. 서울: 法仁文化社; 2006, p. 200.
37. 문영희, 하춘자. 連翹 Water extract의 가토 혈압에 미치는 영향. 생약학회지. 1977;8(4):177.
38. 段紅妍, 馬成. 金銀花與連翹配伍退熱機制的實驗研究. 現代中西醫結合雜誌. 2009;18(11):1214-6.

39. 吳晶晶, 何宇新, 李玲. 貫葉連翹的研究進展. 時珍國醫國藥. 2009;20(2):404-5.
40. 권오성, 김진택, 박인식, 안상현, 이해풍, 김호현, 강윤호. 連翹敗毒散加味方이 알러지성 접촉 피부염에 미치는 영향. 동국한의학연구소논문집. 2000;8(1):77-91.
41. 김진희, 고영희, 김미리, 김현아, 이상명, 이충환. 連翹로부터 분리한 caspase 유도 저해물질. 한국식품과학회지. 2002;34(1):114-7.
42. 이경엽, 김희택, 김이화, 남창규, 류주현. 連翹敗毒散이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 효과. 한국육가공협회. 2003;16(3):82.
43. 김성범, 김경준. 連翹敗毒散加味方이 炎症狀態의 面胞에 미치는 影響. 한국육가공협회. 2002;15(1):50.
44. 郭貞連. 用連翹敗毒散方治療帶狀疱疹의臨床觀察. Guangming Journal of Chinese Medicine. 2008 ;23(7):970-1.
45. 송운룡. 連翹의 알레르기성 염증 반응 조절 효과. 원광대학교 대학원. 2002.
46. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. J Clin Immunol 1983;3:295-315.
47. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. Cell 1994;78:915-8.
48. Bok-Jong You. Effect of Forsythiae Fructus extract on the release of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide in raw 264.7 macrophages. Semyung University. 2007.