

원저

백렴약침액이 대식세포에서 NO와 Prostaglandin 생성에 미치는 영향

김민석 · 노정두

세명대학교 한의과대학원 침구학교실

Abstract

Effects of *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture Solution on Nitric Oxide and Prostaglandin E₂ Production in Macrophages

Kim Min-seok and Roh Jeong-du

Dept. of Oriental Medicine Graduate School of Semyung University

Objectives : Recently, Pharmacopuncture therapy has been used for the treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. Especially, we have been interested in chemical mediators concerned with inflammation such as prostaglandin, nitric oxide. The purpose of this study is investigated that the effect of *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophages, performed several experimental items : those are Prostaglandin E₂, Nitric Oxide and Cyclooxygenase-2.

Methods : The cytotoxicity of *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophages were measured by MTT assay. In order to observe cyclooxygenase-2 mRNA expression in lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated RAW 264.7 macrophages, RT-PCR was used. Prostaglandin E₂ production and Nitric Oxide production was measured by nitric oxide detection kit and Prostaglandin E₂ assay kit.

Results : 1. The MTT assay demonstrated that cytotoxic effect of *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophages was not appeared.

2. *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution inhibited nitric oxide production in lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated RAW 264.7 macrophages.

3. *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution inhibited cyclooxygenase-2 mRNA expression in lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated RAW 264.7 macrophages.

· 접수 : 2010. 5. 7. · 수정 : 2010. 5. 16. · 채택 : 2010. 5. 28.
· 교신저자 : 노정두, 충북 제천시 신월동 산21-11 세명대학교 부속제천한방병원 침구과
Tel. 043-649-1816 E-mail : wsrohmio@msn.com

4. *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution inhibited Prostaglandin E₂ production in lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated RAW 264.7 macrophages.

Conclusions : On the basis of these results, It was shown that *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution was able to inhibit the production of PGE₂ and NO, as well as COX-2 mRNA expression. Our results may provide new mechanism by which *Ampelopsis Radix* Pharmacopuncture solution accounts for its beneficial effect on accelerating wound healing and anti-inflammation.

Key words : *Ampelopsis Radix*, Pharmacopuncture, Anti-inflammatory, NO, COX-2, PGE₂, Korean Medicine

I. 서 론

염증(inflammation)은 세포상해를 유발하는 다양한 자극에 대해 살아있는 조직, 즉 혈관이 있는 조직의 복합적인 반응으로 이루어지며¹⁾, 대식세포(macrophage)를 포함한 면역세포들이 항원 침입이나 조직손상과 같은 자극에 의해 손상 부위로 이동하여 항원을 제거하는 일련의 과정이다²⁾. 염증반응은 급성과 만성으로 나누어지는데 급성 염증반응은 물리적 자극이나 외부 감염 등에 의해 수분에서 수 시간 이내 조직손상을 유발하게 되나 만성 염증반응은 오래 걸리며 지속적이고 단핵구나 대식세포, 림프구, 혈장세포 등의 침윤을 동반하는 특징이 있다^{3,4)}.

한의학에서는 질병의 발생 및 진행을 正邪抗爭의 과정으로 파악하였는데 이러한 결과로 체내에 나타나 는 병리적 현상중의 하나가 염증반응이다. 發熱, 疼痛, 腫脹 등의 증상 유사점으로 瘡, 癰疽, 癤 등의 범주에 포함된다. 치료는 淸熱, 瀉火, 燥濕, 涼血하는 약물들을 사용하고 있다⁵⁾. 최근 침구 및 약물 등의 한의학적 치료방법과 더불어 鍼作用과 약물의 藥理作用을 동시에 얻을 수 있는 약침⁶⁾이 염증반응 형성과정에서 증가되는 물질의 생성에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되고 있으며 계지⁷⁾·전갈⁸⁾·봉독⁹⁾·백하수오¹⁰⁾·자하거¹¹⁾·홍화자¹²⁾·녹용¹³⁾ 등이 염증유발인자 억제에 유의한 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.

백렴(*Ampelopsis Radix*)은 포도과에 속하는 가위 톱의 뿌리를 말린 것으로味甘苦하며性微寒하고心經·胃經에入하고¹⁴⁾,《本草備要》에서는 백렴이癰疽腫瘡, 面上瘡, 金瘡撲損을 치료하며¹⁵⁾,《神農本草經》에서는治癰腫瘡瘡하고散結氣, 止痛除熱하는 효능이

있다고 기재되어 있다¹⁶⁾.

백렴에 대한 실험연구로 항산화 활성에 의한 adriamycin의 독성발현 경감효과 연구¹⁷⁾, 종양면역조절작용에 관한 연구¹⁸⁾, 알레르기 염증반응에 대한 억제효과 연구¹⁹⁾ 등이 보고되어 있으나 백렴을 약침 제재로 하여 염증매개물질 생성에 미치는 연구는 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 백렴을 약침제재로 하여 lipopolysaccharide(이하 LPS)와 Interferon-γ(이하 IFN-γ)로 유도된 RAW 264.7 murine macrophage에서의 염증반응에서 발현되는 Nitric Oxide(이하 NO) 및 Prostaglandin E₂(이하 PGE₂)생성 변화를 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

실험에 사용된 RAW 264.7 murine macrophage cell은 (주) 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. 10% Fetal bovine serum과 1% 항생제가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium의 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, subculture는 48시간 간격으로 하였다.

2. 약침액의 제조

실험에서 사용한 백렴(*Ampelopsis Radix*)은 세명대학교 부속제천한방병원에서 구입한 것을 정선하여

사용하였다. 백림 100g을 1L의 증류수에 넣고 2시간 상온 방치 후 100℃에서 2시간 전탕하고 여과지로 3회 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 200ml로 농축한 후, -80℃에서 동결하였다. 이 농축액을 다시 freezer dryer system(Labconco, USA)을 이용하여 7일간 동결건조한 후 최종적으로 12.99g의 분말을 얻었으며, 이를 3차 증류수에 용해하여 0.80µm syringe filter로 1차 필터링하고, 0.20µm syringe filter로 2차 필터링한 후 약 침액으로 사용하였다.

3. 세포독성 평가

백림약침액의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 24well plate에 RAW 264.7cell을 4×10⁵cells/ml로 분주하고, 12시간 incubation한 후 약 침액을 0, 100, 200, 300µg/ml로 처치하였다. plate를 다시 24시간 incubation한 후에 MTT labeling solution (Roche, Germany)을 각 well에 10µl씩 넣어 4시간 incubation하고, 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide (Sigma, USA)에 녹여 Enzyme-Linked Immuno-Sorbant Assay(이하 ELISA) reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 산화질소의 측정(Nitric Oxide, NO)

산화질소는 Nitric Oxide detection kit(iNtRON, Korea)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 24well plate에 RAW 264.7 cell을 4×10⁵cells/ml로 분주하고, 12시간 incubation한 후 LPS 10µg/ml, IFN-γ 100U/ml를 처치함과 동시에 백림약침액을 100, 200, 300µg/ml로 처치하였다. 다시 plate를 24시간 incubation한 후 상층액 100µl를 96 well plate에 옮겨 substrate solution을 50µl 넣고 5분간 상온에 방치한 다음 coloring solution을 50µl 넣고 5분 후에 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용한 COX-2 mRNA 측정

LPS 10µg/ml, IFN-γ 100U/ml, 백림약침액 100, 200, 300µg/ml를 처치한 plate를 24시간 incubation한 후 TRI reagent(Molecular Research Center, USA)를

이용하여 total RNA를 추출하고, 각각의 RNA를 동량으로 하여 cDNA를 합성한 후, cDNA template 1 µl, 10pM primer, 10mM dNTP mix, 1.25 U EF-Taq DNA polymerase, 10X EF-Taq buffer(Solgent, Korea)로 total volume 50µl가 되게 하여 pre-denaturing phase 95℃ 2min, 1 cycle ; denaturing phase 95℃ 20sec, annealing phase 58℃ 40sec(cyclophilin 60℃), elongation phase 72℃ 20sec 30cycle ; postelongation phase 72℃ 5min, 1cycle 조건에서 PCR을 수행하였다. 이에 따른 product를 10µl씩 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 100V에서 20분 전기영동한 후, UV로 Cyclooxygenase(이하 COX)-2 mRNA를 관찰하였다(Table 1).

Table 1. Primer Sequences Used in this Study

Gene name	Primer sequence
Cyclophilin (299bp)	Forward : 5'-CATTTGCCATGGACAAGATG-3'
	Reverse : 5'-ACCCCACCGTGTCTTCGAC-3'
COX-2 (129bp)	Forward : 5'-GGTGCCTGGTCTGATGATGTATG-3'
	Reverse : 5'-ATGAGTATGAGTCTGCTGGTTTG-3'

6. PGE₂ 함량측정

LPS 10µg/ml, IFN-γ 100U/ml, 백림약침액 100, 200, 300µg/ml를 처치한 plate를 24시간 incubation한 후 얻은 상층액을 검액으로 하여 PGE₂ assay kit (RPN222; Amersham Bioscience, USA)를 이용하여 PGE₂의 함량을 측정하였다. 96well plate에 검액과 표준액을 50µl씩 넣고 working antibody와 working conjugate를 순서대로 50µl/well로 넣은 다음 상온에서 1시간 반응시켰다. 이어서 상층액을 버리고 wash buffer로 4회 세척한 다음 TMB substrate를 150µl/well로 넣고 10분간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

실험 결과의 통계처리와 그래프 작성은 Graphpad Prism 4.0을 이용하였으며, 각 군간의 결과 차이에 있어 통계적 유의성은 one-way ANOVA test를 시행하

고 사후 검정으로 Tukey test를 시행하여 확인하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

III. 결 과

1. 백렴약침액의 세포독성 평가

RAW 264.7 cell에 백렴약침액을 각각 0, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 MTT assay로 생존율을 확인하였다. 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군(Control)의 생존율을 100%로 하였을 때 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군의 생존율은 각각 $97.51 \pm 3.11\%$, $96.60 \pm 6.60\%$, $94.19 \pm 1.50\%$ 로 백렴약침액의 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

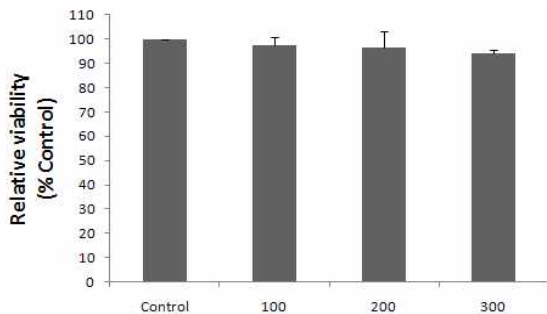


Fig. 1. The effect of *Ampelopsis Radix* pharmacopuncture solution on cell viability of RAW 264.7 macrophage

Control : 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Ampelopsis Radix* treated group.
 100 : 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Ampelopsis Radix* treated group.
 200 : 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Ampelopsis Radix* treated group.
 300 : 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Ampelopsis Radix* treated group.
 Values are represented as mean \pm SD.

2. 산화질소 생성에 미치는 영향

LPS와 IFN- γ 를 처리한 control 군에서 NO의 생성량은 $25.90 \pm 0.33 \mu\text{M}$ 으로 아무 것도 처리하지 않은 normal군의 $1.19 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 에 비해서 통계적으로 유의한 증가를 보였다. LPS와 IFN- γ 를 처리하고 동시에 백렴약침액을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서의 nitrite 생성량은 각각 $22.24 \pm 0.92 \mu\text{M}$, $20.87 \pm 0.56 \mu\text{M}$, $18.40 \pm 0.43 \mu\text{M}$ 로 모두 control군에 비해서 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

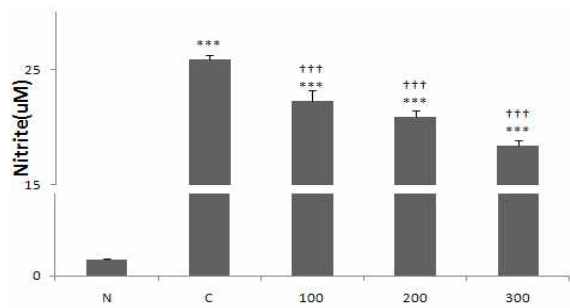


Fig. 2. The effect of *Ampelopsis Radix* pharmacopuncture solution on the NO production in RAW 264.7 macrophage

N : Normal group.
 C : Control group(LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IFN- γ 100U/ml treated group).
 100 : C + *Ampelopsis Radix* 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated group.
 200 : C + *Ampelopsis Radix* 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated group.
 300 : C + *Ampelopsis Radix* 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated group.
 Values are represented as mean \pm SD.
 *** : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p < 0.001$.
 ††† : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Tukey test as $p < 0.001$.

3. COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

LPS와 IFN- γ 를 처리한 control군은 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 COX-2 mRNA level이 증가하였다. 이에 반해 백렴약침액을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서는 control군에 비해 COX-2의 발현이 상대적으로 감소하였다. House keeping gene으로는 cyclophilin을 사용하였다(Fig. 3).

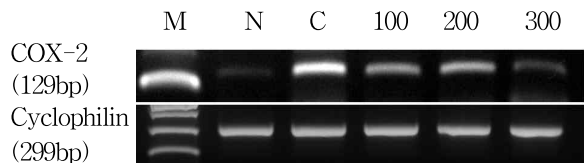


Fig. 3. The effect of *Ampelopsis Radix* pharmacopuncture solution on the mRNA levels of COX-2

M : marker.
 N : normal group.
 C : control group(LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IFN- γ 100U/ml treated group).
 100 : C + *Ampelopsis Radix* 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated group.
 200 : C + *Ampelopsis Radix* 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated group.
 300 : C + *Ampelopsis Radix* 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated group.

4. PGE₂ 생성에 미치는 영향

LPS와 IFN- γ 를 처리한 control군의 PGE₂ 생성량

은 $54.99 \pm 12.41 \text{ pg/ml}$ 로 아무것도 처리하지 않은 normal군의 $2.75 \pm 1.80 \text{ pg/ml}$ 에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다. 백련약침액을 100, 200, $300 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 군에서 PGE_2 생성량은 각각 $44.77 \pm 0.10 \text{ pg/ml}$, $43.48 \pm 16.45 \text{ pg/ml}$, $27.00 \pm 6.84 \text{ pg/ml}$ 로 유의한 차이는 없었지만 control군에 비해 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

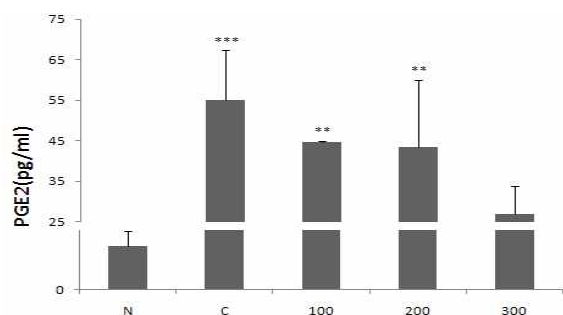


Fig. 4. The effect of *Ampelopsis Radix* pharmacopuncture solution on the PGE_2 production in RAW 264.7 macrophage

N : Normal group.

C : Control group (LPS $10 \mu\text{g/ml}$, IFN- γ 100 U/ml treated group).

100 : C + *Ampelopsis Radix* $100 \mu\text{g/ml}$ treated group.

200 : C + *Ampelopsis Radix* $200 \mu\text{g/ml}$ treated group.

300 : C + *Ampelopsis Radix* $300 \mu\text{g/ml}$ treated group.

Values are represented as mean \pm SD.

, * : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Tukey test as $p < 0.01$, $p < 0.001$.

IV. 고 찰

염증반응은 어떤 자극에 대한 생체 조직의 비특이적 면역반응으로 조직의 변성, 순환장애와 삼출, 조직증식의 세 가지를 유발하는 복잡한 병변이다^{3,4}. 대식세포는 TNF- α , IL-1 등의 전염증성 사이토카인이나 eicosanoids, Reactive Oxygen Species, NO, superoxide(O_2^-), PGE_2 와 같은 염증 매개자들을 과도하게 분비함으로써 다양한 면역병태적(immunopathological) 현상들을 조절하는 데 중심적인 역할을 한다²⁰. 외부 자극으로부터 활성화된 대식세포는 염증매개물질 분비를 통해 염증 반응을 유발함으로써 동맥경화증, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 천식 등의 염증성 질환을 유발하고, 질환을 악화시킨다²¹. 현재 이러한 질환의 치료에 많이 사용되고 있는 glucocorticoid와 같은 약

제의 경우, 그 작용이 비선택적으로 나타나고 부작용이 크므로 장기간 치료에 사용될 수 없으며, 또한 비스테로이드 항염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs: 이하 NSAIDs)는 진통작용에 효과적이기는 하지만 위궤양과 같은 부작용을 초래하기 때문에 세계적으로 부작용이 없는 항염증 치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행 중이다^{22,23}.

염증 반응의 주증상은 發熱, 發赤, 浮腫, 疼痛 및 기능의 상실 등으로 한의학에서 《黃帝內經·素問·痺論》²⁴에 痺症의 범주에서 찾아볼 수 있고, 《金匱要略》²⁵에서는 歷節痛의 증상과 유사하다. 염증성 부종에 대한 병리적 기전으로 《黃帝內經·靈樞·癰疽編》²⁴에서 “營衛稽留於經脈之中, 則血泣而不行, 不行則衛氣從之而不通, 壅遏而不得行, 故熱. 大熱不止, 熱勝則肉腐, 肉腐則爲膿”이라 하였으며, 《黃帝內經·素問·陰陽應象大論》²⁴에서는 “寒傷形, 熱傷氣, 氣傷痛, 形傷腫. 故先痛而後腫者, 氣傷形也. 先腫而後痛者, 形傷氣也”라 하여 부종과 동통의 기전을 밝히고 있으며, 치료에는 淸熱, 瀉火, 解毒, 燥濕, 涼血, 淸虛熱 등의 효과가 있는 약물들이 사용 된다⁵.

鍼作用과 약물의 藥理作用을 동시에 얻을 수 있는 약침⁶의 진통 및 소염효과에 대한 연구를 살펴보면 최⁷는 계지약침이, 송⁸은 진갈약침이, 조⁹는 봉약침이, 김¹⁰은 백하수오약침이 진통, 소염 작용이 있음을 보고하였고, 박¹¹은 자하거 약침을, 박¹²은 홍화자 약침을, 이¹³는 녹용약침을 사용하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NO, COX-2, PGE_2 등과 같은 염증 매개 물질 억제 및 LPS 유발 관절염 치료에 각각 유효함을 보고하였다.

Bacterial endotoxin인 LPS는 종양괴사인자(tumor necrosis factor ; 이하 TNF)와 관련하여 강력한 염증 반응을 유도하는 물질로서 TNF- α 를 포함한 다양한 전염증 사이토카인 분비를 하고, 대식세포는 이러한 LPS의 작용에 대한 면역반응을 하게 된다²⁶. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10의 지나친 분비는 조직손상, 폐혈증이나 염증성 장질환과 같은 자가면역질환을 야기한다²⁷.

IFN- γ 는 활성화된 T림프구에서 생산되는 cytokine의 일종으로 각질형성세포를 포함한 비림프계 세포를 자극하여 major histocompatibility complex (MCH) class II 항원을 발현시키며, 탐식세포를 활성화시키고, 림프구의 유입을 촉진시키며²⁸ 항바이러스 작용과 항증식 작용이 있고, 대식구 및 natural killer cell의 세포독작용을 항진시키는 등 많은 생물학적·

생화학적인 작용을 가진 물질로 알려져 있다²⁹⁾. IFN- γ 는 강한 면역증강효과가 있는 반면에 IL-1이 과다하게 분비되면 자가면역질환을 유발한다³⁰⁾.

NO는 일반적으로 대식세포 및 간세포에서 L-arginine 으로부터 NO합성경로(NO synthase pathway; 이하 NOS)를 통해 합성되는 작은 분자량의 자유라디칼(free radical)로서 세포 내 항상성 유지, 신경전달물질 운반, 항암작용 및 세포독성 등에 관여하는 신호전달자이다³¹⁾. NOS 중 endothelial NOS(이하 eNOS)와 neuronal NOS(이하 nNOS)는 칼슘농도에 의존적이고 자극에 대한 반응이 아닌 구성성분으로서 일시적으로 소량 발현된다. 반면 inducible NOS(이하 iNOS)는 칼슘의 농도에 상관없이 염증자극에 의해 지속적으로 다량 생성이 유도됨으로써 염증반응에 기여하게 되며^{32,33)}, 특히 LPS나 IFN- γ , β -amyloid 등의 자극으로 활성화된 대식세포로부터 과도하게 생성되어 세포독성과 염증반응을 유발함으로써 다양한 만성 염증성질환 발달에 기여한다³¹⁾. 따라서 염증 반응이 진행되는 동안 생성되는 NO와 iNOS를 효과적으로 억제하는 억제제 개발에 대한 연구가 최근 이루어지고 있으며 다양한 염증질환의 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다³³⁾.

염증의 chemical mediators 중 약리 및 생리학적으로 중요한 prostaglandin(이하 PG)은 세포막에 존재하는 인지질에서 유래된 불포화지방산의 대사산물이며, PG의 생성에는 phospholipase A₂, COX 및 hydroperoxidase가 관여하는 일련의 산화반응이다³⁴⁾. COX에는 두 가지 isoform인 COX-1과 COX-2가 있는데 COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준히 만들어져 house-keeping 효소의 역할을 하는 반면, COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 대식세포, 단핵구, 조골세포, 활막세포 등에서 분비된다^{21,35)}. COX-2는 뇌와 신장에서 주로 발견되며 일부 염증성 세포(inflammatory cell)에서도 발견되고, 특히 염증 부위에서 유도된다. COX-1은 조직의 구성 요소이며 위장 관계를 포함한 조직에 산재한다. NSAIDs가 COX-1의 활성화를 저해함으로써 통증은 억제하지만 위장관과 신장의 부작용 및 항혈소판 작용(antiplatelet activity)이 나타난다. COX-1은 염증 부위에서 거의 유도되지 않으므로 COX-1의 억제 작용은 거의 없는 선택적인 COX-2 억제제를 고안하게 되었다. 선택적인 COX-2 억제제는 염증과 통증을 감소시킬 수 있는 반면에 COX-1에는 영향을 끼치지 않기 때문에 위장관계에서는 안전한 것으로 제시된다. 최근에는 천연물로부터 COX-2 억제제를 찾으려는 연구가 진행되고 있다³⁶⁾.

PGE₂는 내인성 발열물질이라고 알려진 IL-1 β , IL-8 및 TNF- α 에 의해 생성이 유도되어 bradykinin과 같은 강력한 발열물질의 작용을 증강시킬 뿐만 아니라 시상하부의 체온조절중추에 작용하여 체온상승을 유발한다. 또한 PGE₂는 골수세포에 작용하여 파골세포(osteoclast)의 전구세포(preosteoclast)를 유도하는 작용이 있다고 알려져 있다³⁴⁾. 또한 조직이 손상되면 물리적인 손상뿐 아니라 염증을 매개하는 물질들이 다량 생성되기 때문에 통증이 유발되는데, 이 중 PGE₂는 조직손상이 일어나는 부위에서 생성되어 말초신경 말단 부위에 작용하여 통증에 대한 역치를 감소하게 된다³⁷⁾.

백렴(*Ampelopsis radix*)은 葡萄科(포도과; Vitaceae)에 속한 다년생 攀援藤本(낙엽활엽 덩굴나무)인 가위톱(*Ampelopsis japonica*(THUNB.) Makino)의 塊根을 乾燥한 것으로³⁸⁾ 白根·描兒卵·崑崙 등의 異名으로 불리며, 歸經은 心·脾·肝經이며, 性은 微寒 無毒하고, 味는 苦하다³⁹⁾. 清熱藥에 속하여 清熱解毒 斂瘡生肌하여 瘡癰腫毒, 癰疽發背, 癩癧, 水火燙傷을 치료하는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 백렴의 효능에 대한 연구로는 박¹⁷⁾의 백렴추출물이 항암 면역계를 활성화 시킨다는 보고와 김¹⁸⁾의 백렴추출물이 항산화 활성 기전에 미치는 영향, 김¹⁹⁾의 백렴추출물이 비만세포로부터 히스타민과 염증 매개물질들의 분비를 유의적으로 억제 시킨다는 보고가 있다.

이에 저자는 백렴의 소염, 진통작용에 주안점을 두어 LPS와 IFN- γ 로 유도된 RAW 264.7 cell을 선정하여 백렴약침액을 처리한 후 백렴의 세포독성에 대해 관찰하기 위해 MTT 반응실험을 하였고, 백렴약침액이 염증 매개물질인 COX-2, PGE₂, NO에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 관찰하였다. COX-2의 mRNA 발현 양상의 관찰은 RT-PCR을 시행하였고, PGE₂의 분비량을 측정하는 데는 Prostaglandin E₂ assay kit를 사용하였으며, Nitric Oxide detection kit를 사용하여 NO 분비량을 측정하였다.

백렴약침액의 세포독성을 조사하기 위해 백렴약침액 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 배양한 세포의 생존율을 관찰한 결과 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1).

백렴약침액이 NO 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 LPS 10 μ g/ml와 IFN- γ 100U/ml를 처리하고 나서 NO의 생성물을 조사한 결과 LPS와 IFN- γ 로 처리한 군에 비해 백렴약침액을 100, 200, 300 μ g/ml로 처리한 군에서의 NO 생성이 감소되었다(Fig. 2).

백렴약침액이 COX-2 mRNA 발현에 미치는 효과를 조사하기 위해 LPS 10 μ g/ml와 IFN- γ 100U/ml를 처리하고 나서 COX-2 mRNA 발현 수준을 측정한다. 결과 LPS와 IFN- γ 로 처리한 군에 비해 백렴약침액을 100, 200, 300 μ g/ml로 처리한 군에서 COX-2의 발현이 감소되었다(Fig. 3).

백렴약침액이 PGE₂ 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 LPS 10 μ g/ml와 IFN- γ 100U/ml를 처리하고 나서 PGE₂의 생성물을 조사한 결과 LPS와 IFN- γ 로 처리한 군에 비해 백렴약침액을 100, 200, 300 μ g/ml로 처리한 군에서 PGE₂의 생성이 감소되었다(Fig. 4).

본 실험 결과에서 백렴약침액 처리군에서 농도 의존적으로 유의하게 NO 생산이 억제됨을 알 수 있었는데, 최⁴⁰⁾는 목향의 염증성 매개물질 억제 효과를 연구하는 과정에서 유의성 있는 NO의 감소를 보고 하였으며, 김⁴¹⁾은 강활의 염증 물질 생성에 대한 효과를 평가한 결과 NO 생산을 유의적으로 억제한다고 보고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. RT-PCR을 시행하여 백렴약침액의 LPS와 IFN- γ 로 처리한 RAW 264.7 대식세포의 COX-2의 m-RNA 발현에 대한 효과를 평가한 결과 상대적 감소를 나타내었는데, COX-2 발현 억제에 대한 연구에 있어 봉독의 경우, 황⁴²⁾은 봉독이 골육종세포주에서 COX-2 m-RNA의 발현을 선택적으로 억제한다고 보고하였으며, 정⁴³⁾은 봉독 약침액이 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하는 과정에 COX-1과 COX-2 각각에 대한 발현효과를 보고하였다. PGE₂의 분비량에 있어서도 PGE₂의 생성을 억제시킴이 본 실험에서 관찰되었는데, 송⁸⁾은 전갈약침이 염증과 통증 관련 유전자에 미치는 영향을 연구한 결과 PGE₂의 감소를 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

이러한 실험 결과로 보아 LPS와 IFN- γ 에 의한 RAW 264.7 세포의 활성화는 NO, COX-2 및 PGE₂ 생성을 유도하는데, 백렴약침액으로 전처리한 RAW 264.7 세포에서는 이러한 염증 매개물질이 감소하였으므로 백렴약침액이 항염증 효과가 있으므로 염증 조절물질로서 다양하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

백렴약침액의 항염증효과를 조사하기 위하여 대식세포를 LPS와 IFN- γ 로 자극하여 생성되는 NO와

COX-2, PGE₂에 대한 억제효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백렴약침액의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 100, 200, 300 μ g/ml의 농도에서 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다.
2. 백렴약침액은 LPS와 IFN- γ 로 유도된 염증 모델에서 유의하게 NO 생성을 감소시켰다.
3. 백렴약침액은 LPS와 IFN- γ 로 유도된 염증 모델에서 증가된 COX-2의 발현을 감소시켰다.
4. 백렴약침액은 LPS와 IFN- γ 로 유도된 염증 모델에서 증가된 PGE₂의 생성을 감소시켰다.

VI. 참고문헌

1. 대한병리학회 대구·경북지부학회 편. 간추린 병리학. 서울 : 정문각. 2000 : 64.
2. Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. Current Rheumatology Report. 2000 ; 2 : 216-24.
3. Morson BC. Pathology of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Jpn. 1980 ; 15(2) : 184-7.
4. Cline MJ. Leukocyte function in inflammation: the ingestion, killing, and digestion of microorganisms. Ser Haematol. 1970 ; 3(2) : 3-16.
5. 程紹恩. 中國證候診斷治療學. 北京 : 北京科學技術出版社. 1993 : 614.
6. 대한침구학회 교재편찬위원회 편저. 침구학(중). 파주 : 집문당. 2008 : 408.
7. 최유행, 김갑성, 이승덕. 桂枝藥鍼刺戟이 mouse의 LPS誘發 關節炎 중 細胞性免疫反應에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 100-12.
8. 송인광, 최우식, 박준성, 이승덕, 김갑성. 전갈약침이 adjuvant 유발 흰쥐의 관절활액막내 cytokine 과 prostaglandin E₂에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 177-88.
9. 강준, 송호섭. 蜂藥鍼液과 Melittin이 RAW 264.7 細胞의 NO, iNOS 및 MAPK에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2004 ; 21(3) : 107-19.
10. 김동현, 서정철, 임성철, 정태영, 한상원. 白何首烏藥鍼液의 NO, DPPH 消去 및 IL-4 抑制效果. 대

- 한침구학회지, 2003 ; 20(4) : 42-52.
11. 박기범, 백승태, 이승덕, 김경호, 김갑성. 紫何車藥 鍼의 抗炎症能이 LPS 유발 關節炎 治療에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2006 ; 23(6) : 103-15.
 12. 박원, 김경호, 이창환, 이동진, 이현진, 황지혜, 김갑성. 홍화자약침의 윤활관절막내에서의 MIF활성 억제제를 통한 LPS 유발 관절염의 치료 효과. 대한침구학회지. 2007 ; 24(4) : 157-66.
 13. 이현진, 조현석, 황민섭, 정찬영, 이동진, 김은정, 김갑성, 김경호. 녹용약침이 백서의 제2형 Collagen 유발 관절염에서 iNOS 발현과 NO 생성 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2008 ; 25(5) : 105-16.
 14. 이명영 외 34인. 동의학사전. 서울 : 여강출판사. 1988 : 17.
 15. 汪昂 著. 서부일, 변성희 역. 國譯本草備要. 서울 : 일중사. 2003 : 468-9.
 16. 馬繼興 編. 神農本草經輯注. 北京 : 人民衛生出版社. 1995 : 351-2.
 17. Park Seungman, Ahn Sangwoo, Cho Jong kwan. Effects of Ampelopsis japonica extracts on tumor immunity. Korean Journal of Oriental Medicine. 2005 ; 11 : 113-40.
 18. 김동석, 이성호, 정연봉. Adriamycin의 독성 발현에 미치는 백림(Ampelopsis Radix)의 영향. 한국식품영양학회지. 1994 ; 7 : 232-8.
 19. 김장현, 천진홍, 김성윤, 박용기. 백림의 알레르기 염증반응에 대한 억제효과. 大韓本草學會誌. 2008 ; 23(4) : 91-101.
 20. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 1988 ; 333 : 664-6.
 21. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins : shaping up the immune response. Int Immunopharmacol. 2002 ; 2(5) : 603-30.
 22. 송진석. 가미소풍활혈탕 약침이 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1990 ; 7(1) : 19-38.
 23. Chi YS, Cheon BS, Kim HP. Effect of wogonin, a plant flavon from Scutellariae Radix, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. Biochem Pharmacol. 2001 ; 61 : 1195-203.
 24. 洪元植. 精校黃帝內經. 서울 : 東洋醫學研究院 出版部. 1981 : 31, 86, 347.
 25. 金楨汜. 金匱要略辨釋. 서울 : 한의문화사. 2003 : 143.
 26. Guha M and Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cellular Signaling. 2001 ; 13 : 85-94.
 27. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. J Exp Med. 1996 ; 184, 1397-411.
 28. Basham TY, Nickoloff BJ, Merigan TC, Morhenn VB. Recombinant gamma interferon induces HLA-DR expression on cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol. 1984 ; 83 : 88-90.
 29. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. Ann Rev Biochem. 1987 ; 56 : 727-77.
 30. Browning J. Interferons and rheumatoid arthritis- Insight into ingerferon biology. Immunology Today. 1987 ; 8 : 372.
 31. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. Brain Res. 1992 ; 587 : 250-6.
 32. Nathan C. Nitiric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992 ; 6(12) : 3051-64.
 33. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell. 1992 ; 70(5) : 705-7.
 34. Sato K. 骨・軟骨とサイトカイン. 東京 : 實驗醫學. 1989 : 7, 19-23.
 35. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. Annu Rev Med. 2002 ; 5 : 35-57.
 36. Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenase and the central nervous system. Prostaglandins. 1997 ; 54(3) : 601-24.
 37. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Pros-

- taglandin E₂ synthesis and secretion : the role of PGE₂ synthesis. Clin Immunol. 2006 ; 119(3) : 229-40.
38. 全國韓醫科大學 本草學教授 編. 本草學. 서울 : 永林社. 2000 : 226-7.
39. 醫聖堂 編輯部 編. 校正中藥大辭典. 서울 : 醫聖堂. 1994 : 110-2.
40. 최우연, 조미정, 김상찬, 정지윤. RAW 264.7 cell 에서 목향의 염증성 매개물질 억제효과. 濟韓東醫學術院 論文集. 2009 ; 7(1) : 1-12.
41. 김창민, 박용기. 강활의 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증물질 생성에 대한 효과. 대한본초학회지. 2009 ; 24(1) : 169-78.
42. 황대연, 김호현, 김창주, 김이화. 봉독이 골육종 세포주에서 세포사멸 및 COX-2 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 63-74.
43. 정혜윤, 고희균. 봉독 약침액이 염증 및 통증 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 41-50.