대한한의학 방제학회지 제19권 1호 THE KOREAN JOURNAL OF ORIENTAL MEDICAL PRESCRIPTION 19(1):207~217, 2011

마우스 복강대식세포에서 加減拱辰丹의 항염증 효과

김홍준[1], 김영식[1], 목지예[2], 정승일[3], 황성연[1,4], 조정근[5], 장선일[2,5]
[1]우석대학교 한의과대학 본초방제학교실, [2]전주대학교 아토피·건강전문연구소
[3]전주생물소재연구소, [4]한국전통의학연구소, [5]전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

ABSTRACT

Anti-inflammatory Effect of Gagam-GongJin-dan in mouse peritoneal macrophages

Hong-Jun Kim[1], Young-Sik Kim[1], Ji-Ye Mok[2], Seung-Il Jeong[3]
Sung-Yeoun Hwang[1,4], Jung-Keun Cho[5], Seon-Il Jang[1,5]
[1]Dept. of Oriental Medical Prescription, Woo-Suk University
[2]Jeon-Ju University Atopy & Health Research Institute, [3]Jeon-Ju Biomaterials Institute
[4]Korea Bio Medical Science Institute
[5]School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeon-Ju University

Objectives : In a previous study, we have shown that Gagam-Gongjin-Dan(GGD) has an inhibitory effect on the ovalbumin-induced immune responses and a hepatoprotective effect on actaminophen-induced liver injury in Balb/c Mice. However, the possible anti-inflammatory effect of GGD extract for inflammatory mediators was not reported. Therefore, the purpose of this study was to investigate an inhibitory effects of GGD extract against lipopolysaccharides(LPS) induced inflammatory mediators in mouse peritoneal macrophages.

Methods : GGD extract was prepared by extracting with methanol for 7 days. The extract was

• 교신저자 : 장선일
• 전북 전주시 완산구 효자동 3가 1200번지 전주대학교 대체의학대학 건강관리전공
• Tel : 063-220-3124 E-mail : sonjjang@jj.ac.kr
• 접수 : 2011/ 05/ 20 수정 : 2011/ 06/ 02 채택 : 2011/ 06/ 13

freeze-dried following filtration through vacuum distillation system. Accumulated nitrite, an oxidative product of nitric oxide(NO), was measured in the culture medium by the Griess reaction. The levels of prostaglandin E_2(PGE_2), interleukin-1β(IL-1β), tumor necrosis factor-α(TNF-α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2) were measured by Western blot analysis.

Results : GGD extract (50-400 μg/ml) *per se* had no cytotoxic effect in LPS-stimulated peritoneal macrophages. GGD extract dose-dependently reduced NO, PGE_2, IL-1β and TNF-α production and COX-2 activity caused by stimulation of LPS. The levels of iNOS and COX-2 protein expressions were markedly suppressed by the treatment with GGD extract in a dose dependent manner.

Conclusions : These results suggest that GGD extract has an anti-inflammatory effect against LPS-induced inflammatory mediators in peritoneal macrophages, these properties may contribute to inflammation disease care.

Key word : Gagam-GongJin-dan, Anti-inflammation, Inflammatory mediators, Peritoneal macrophages

Ⅰ. 서 론

拱辰丹은 元末 危亦林의 『世醫得效方』 虛損篇[1]에 최초로 수록된 처방으로 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥하는 當歸, 固精强陰·助陽收澁하는 山茱萸, 開竅하는 麝香의 4가지 약물로 구성된 처방으로 先天의 氣를 補하고 水升火降을 순조롭게 하여 心身을 補益함으로서 장부의 虛損에 대한 예방 및 치료를 하는 방제로 볼 수 있다. 동의보감에는 肝虛藥으로 되어 있으며 그 효능과 조제용법을 세의득효방을 인용하여 기록하고 있다[2]. 그러나 공진단의 대표적인 약인 麝香은 예로부터 희귀고가약품이어 사용이 어려웠고, 근래에 들어와 CITES 부속서 1에 속해 있는 사향에 대한 사용 문제가 사회적인 이슈가 되고 있다.

이러한 공진단 약물 구성에 대한 문제점을 인식하여 최근에 본 연구자들은 鹿茸, 山茱萸, 當歸의 세 가지 약재에 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 약물로 구성된 加減拱辰丹(Gami-GongJin-dan, GGD)을 조제하여 그 추출물인 GGDE을 활용하여 BALB/c계 마우스를 대상으로 ovalbumin (OVA)에 의해 유도된 혈청내 항체와 CCL27/CTACK의 생산, 발부종반응(footpad swelling response) 및 림프절 세포의 CCR10의 발현에 미치는 효과를 조사한 결과 우수한 항염증 효과가 있음을 보고한 바 있다[3]. 더불어 인체에서 발생되는 대부분의 간질환은 염증반응과 함께 산화적 스트레스에 의해서 발생된다는 점을 감안하여, GGDE를 대상으로 항산화 능력을 측정한 후

Balb/c 마우스를 대상으로 acetaminophen(N-acetyl-p-aminophenol, paracetamol, APAP)에 의해 유도된 간독성에 미치는 GGDE의 효과를 조사하여 유의한 결과를 보고하였다[4]. 그러나 GGDE의 항염증 효과를 대식세포에서 검증한 연구보고는 없는 실정이다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부물질에 노출되면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응에 원인이 되는 많은 인자를 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속시킨다[5-7]. 이러한 염증반응은 NO, PGE_2, COX-2, IL-1β과 TNF-α 등과 같은 염증매개물질이 대량 생산되어 인체질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다[8,9].

최근에 한약재를 비롯한 천연물로부터 염증반응 억제 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 전개되고 있다[10-12]. 따라서 본 연구는 加減拱辰丹을 대상으로 열수 추출방법에 의해 제조된 GGDE의 항염증 효과를 검증하기 위하여 LPS로 자극하여 활성화된 Balb/c 마우스 복강대식세포에서 분비되는 NO, PGE_2, IL-1β과 TNF-α 등의 생성 및 이들 염증 매개물 생성에 관여하는 iNOS 및 COX-2의 분자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 유의한 억제 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 약

Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1beta (IL-1β)와 prostaglandin E_2(PGE_2) assay kit은 R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.)사로부터 구입하였다. Lipopolysaccharide(LPS), anti-iNOS, anti-COX-1 및 anti-COX-2 antibody는 Santa cruz biotechnology Inc.(California, U.S.A.)로부터 구입하였다. Brewer's thioglycollate broth 배지, RPMI 1640 배지, Hanks balanced salt solution(HBSS)와 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL사(Grand Islang, NY, USA)로부터 구입하였다. 그리고 COX activity assay kit 는 Cayman Chemical사 (USA)로부터 구입하였다. Penicillin/streptomycin과 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide를 비롯한 기타 사용된 모든 시약은 분석등급으로 Sigma-Aldrich와 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2) GGD의 추출

실험에 사용한 加減拱辰丹 약물의 구성과 추출은 김 등[3,4]의 방법에 준하였다. 요약하면, 鹿茸, 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등은 울산시 소재 약제상(광명당, 대한민국)에서 구입하여 우석대한의과대학 본초방제학교실에서 동정하였다. 잘 건조된 加減拱辰丹 구성 약물 500g를 분말로 제조하여 증류수(3 L)로 3시간 동안 추출기로 열수 추출하였다. 추출물은 0.45μm 필터를 사용하여 여과한 후 동결건조기(Model, EYELA FDU-2100, Japan)에서 건조하여 48.9g를 회수한 후 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3) 실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 암컷 BALB/c계 마우스는 중앙동물실험실사(서울)로부터 구입하였다. 마우스는 1주일간 스트레스를 해소하기 위해 1주일간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실험에 사용하였다.

2. 방 법

1) 복강 대식세포의 분리 및 배양

건강한 8주령의 수컷 마우스 복강에 Brewer's thioglycollate broth를 마리 당 2 mL씩 복강내로

주사기를 이용하여 주입하고 3일 후 생쥐를 후경골탈추법으로 즉사시킨 다음 heparin (5 U/mL)이 첨가된 HBSS 10 mL을 복강에 주입하고 복강을 잘 마사지 하였다. 마사지 후 26케이지 10 mL용 주사기를 이용하여 복강으로 유입된 세포를 얻은 후 3회 HBSS로 원심세척하였다. 분리된 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 배양접시에 접종한 후 37℃와 5% CO_2가 유지되는 배양기에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후 대식세포외 다른 세포를 제거하기 위해서 냉각 HBSS을 이용하여 3회 반복 세척하였다. 부착된 마우스 복강 대식세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 접종한 후 실험 목적에 따라 시간을 정하여 배양하여 사용하였다.

2) MTT 분석

복강대식세포의 생존율은 여러 농도의 추출물을 2시간 동안 처리한 후 LPS (1 μg/mL)을 주입하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 요약하면, 세포는 1×10^6/mL의 밀도로 RPMI 1640 배지에 접종하여 3시간 후에 여러 가지 농도로 GGD 추출물을 처리하였다. 24시간동안 배양한 후 0.5 mg/mL MTT용액을 well 당 100 μL을 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하였다. 그 후 96 well 플레이트를 800 rpm에서 3분간 원심시키고 100 μl DMSO를 첨가하여 용해시킨 후 MTT-formazan 생성물을 570 nm에 흡수되는 빛의 양을 측정함으로써 결정했다.

3) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μL의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μL씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37℃에서 10분간 반응시켰다. 그 샘플 빛의 흡수는 spectrophotometer(MD, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산산염의 농도 정도는 아질산염의 표준곡선으로부터 계산하였다.

4) PGE_2와 COX 활성 측정

복강대식세포(1×10^6/mL)를 여러 가지 농도(50-400 μg/mL)의 GGD 추출물을 2시간동안 전 처리한 후 LPS (1 μg/mL)로 자극 한 후 18시간과 24시간 동안 배양하였다. 배양 24시간 후에 상층액을 얻어 PGE_2를 측정하였다. 또한 배양 18시간 후에 부착세포를 PBS로 3회 세척하고 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS)를 주입하여 세포 용출액을 얻고 COX-2 활성과 iNOS와 COX-2 발현 분석에 사용하였다. PGE_2의 측정방법은 R&D사(Minneopolis, U.S.A.)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였고, COX-2의 활성은 블레드포드 방법에 따라 단백질을 정량하고 COX-2 activity assay kit (Cayman Chemical, USA)을 이용하여 Cyman사에서 제공하는 방법에 준하여 측정하였다.

5) iNOS와 COX-2의 Western blot

추출물이 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 μg을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 triton-tris buffered saline (TTBS)로 4℃에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 tris buffered

saline (TBS)로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1:1,000) 또는 anti-COX-2 (1:500)를 주입하여 3시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 goat anti-rabbit IgG(1:2,000)을 첨가하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 enhanced chemiluminescence (ECL)방법으로 발색시켰다.

6) 사이토카인 측정

마우스 복강대식세포를 1×10^6/mL로 적정하여 24 well 배양용기(flat form)에 1 ml 씩 분주한 후 藥物 (0-400 μg/mL)을 2시간동안 전처리하고 1 μg/mL LPS로 자극한 후 37℃ CO_2 배양기(5% CO_2/95% 대기)에서 24시간 배양하였다. 배양액을 얻고 1,000 rpm으로 세포를 원심침전시키고 상층액을 얻어 -70℃에서 보관하면서 사이토카인 측정에 사용하였다. TNF-α와 IL-1β의 정량은 24시간 동안 측적된 량을 측정하였다. 측정방법은 R&D사(Minneopolis, U.S.A.)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였다.

7) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준오차(mean ± SD)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 $p<0.05$로 정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포 생존율에 미치는 GGDE의 영향

GGDE가 LPS가 처리된 복강대식세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 복강대식세포(1×10^6/mL)를 RPMI 1640(1% P/S, 10% FBS) 배지를 사용하여 세포 부유액을 만든 다음 여러 가지 농도의 GGDE를 주입하고 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS만 자극하였을 경우 75.3±4.8%로 감소되었으나, GGDE 처리군은 농도에 의존적으로 세포생존율이 증가되었다. 특히 100-400 μg/mL GGDE 처리군에서는 그 효과가 유의하게 증가되었다($p<0.05$)(Fig. 1).

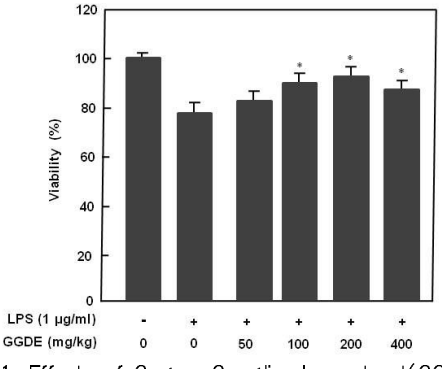

Fig. 1. Effects of Gagam-Gonglin-dan extract(GGDE) on cell viability in LPS-treated peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages (1×10^6/mL) from Balb/c mice were pretreated with or without GGDE at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 μg/mL) for 24 h. Cell viability were measured by MTT assay as described in the section of Materials and Methods. Data are means ± SD of three independant experiments. *$p<0.05$ versus control group treated with LPS alone.

2. NO 생성에 미치는 GGDE의 영향

GGDE가 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 복강대식세포(1×10^6/mL)를 접종하고 3시간 후에 GGDE을 50-400 μg/mL의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS (1 μg/mL)로 자극한 후 24시간 배양하고 배양액에 축척된 아질산염을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2A과 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 LPS로 자극하였을 경우 19.5±2.1 μM로 증가되었으나, GGDE 처리군은 농도에 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다. 특히 100-400 μg/mL GGDE 처리군에서는 그 효과가 유의하게 증가되었다($p<0.05$와 $p<0.01$). NO 생성에 있어 GGDE의 억제효과에 대

한 기전을 알아보기 위하여 배약세포의 iNOS 발현을 조사하였다. 그 결과 NO 생성에 대한 GGDE의 억제 현상과 같이 iNOS 발현이 농도에 의존적으로 억제하였다. 이러한 결과는 GGDE가 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 2).

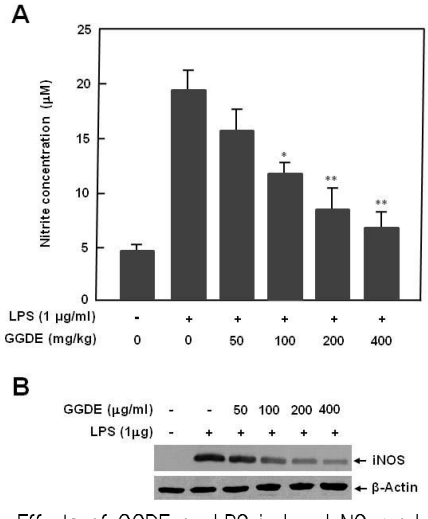

Fig. 2. Effects of GGDE on LPS-induced NO production and iNOS expression in peritonial macrophages.

Peritoneal macrophages (1×10^6/mL) from Balb/c mice were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 μg/mL for 18 h (NO) or 24 h (iNOS). (A) NO produced by cells was measured by the method of Griess. (B) Western blot analysis on iNOS expression was carried out as described in the section of Materials and Methods. Data are means ± SD of three independant experiments. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ versus control group treated with LPS alone.

3. PEG_2 생성에 미치는 GGDE의 영향

GGDE가 PGE_2 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 복강대식세포(1×10^6/mL)를 접종하고 3시간 후에 GGDE을 50-400 μg/mL의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS (1 μg/mL)로 자극한 후 24시간 배양하고 먼저 배양액에 축척된 PGE_2을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 LPS로 자극하였을 경우 1895.45±189.57 pg/mL로 증가되었으나, GGDE 처리군은 농도에 의존적으로 PGE_2 생성율이 감소되었다. 특히 100-400 μg/mL GGDE 처리군에서는 그 효과가 유의하게 증가되었다($p<0.05$와 $p<0.01$). 이와 같이 GGDE가 PGE_2 생성 억제에 대한 효과를 알아본 후 COX-2의 활성 및 발현에 미치는 GGDE의 영향을 알아보기 위하여 복강대식세포(1×10^6/mL)를 접종하고 3시간 후에 GGDE를 50-400 μg/mL의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS (1 μg/mL)로 자극한 후 18시간 배양하고 세포를 수확하여 lysis buffer로 세포를 용출시키고 COX-2의 활성과 발현을 측정하였다. 그 결과 PGE_2 생성에 대한 GGDE의 억제 현상과 같이 COX-2 활성과 발현이 농도에 의존적으로 억제하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 GGDE가 COX-2 활성과 발현을 억제함으로써 PGE_2 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

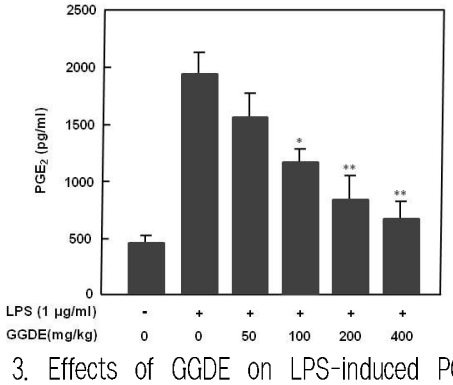

Fig. 3. Effects of GGDE on LPS-induced PGE_2 production in peritonial macrophages.

Peritoneal macrophages (1×10^6/mL) from Balb/c mice were pretreated with or without GGD at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 μg/mL for 24 h. PGE_2 produced by cells was measured by ELISA as described in the section of Materials and Methods. Data are means ± SD of three independant experiments. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ versus control group treated with LPS alone.

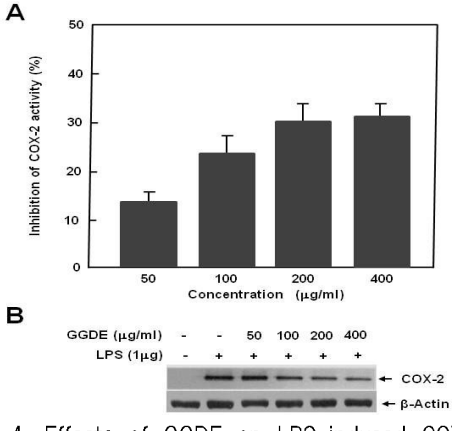

Fig. 4. Effects of GGDE on LPS-induced COX-2 activity and expression in peritonial macrophages.

Peritoneal macrophages (1×10^6/mL) from Balb/c mice were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 μg/mL for 18 h. (A) COX-2 activity of cell lysate was measured using COX-2 assay kit. (B) Western blot analysis on COX-2 expression was carried out as described in the section of Materials and Methods. Data are means ± SD of three independant experiments.

4. 염증성 사이토카인 생성에 미치는 GGDE의 영향

IL-1β와 TNF-α는 대표적인 전염증성 사이토카인으로 알려져 있는데, GGDE가 전염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 여러 가지 농도(50-200 μg/mL)의 GGDE을 2시간 동안 복강대식세포에 처리하고 1 μg/mL LPS로 자극하여 18시간 동안 배양한 후 배양액에서 TNF-α와 IL-1β을 측정하였다. Fig. 5와 같이 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 LPS로 자극하였을 경우 IL-1β와 TNF-α는 각각 4,225.35±360.58 pg/ml과 2,056.80±293.20 pg/mL 로 증가되었으나, GGDE 처리군은 농도에 의존적으로 전염증성 사이토카인 생성이 감소되었다. IL-1β는 200-400 μg/mL GGDE 처리군에서 그 효과가 유의하게 감소되었고($p<0.01$). TNF-α는 100-400 μg/mL GGDE 처리군에서 그 효과가 유의하게 감소되었다($p<0.05$)와 $p<0.01$). 이러한 결과는 GGDE가 전염증성 사이토카인을 효과적으로 억제시킬 수 있는 약물임을 시사해 주었다(Fig. 5).

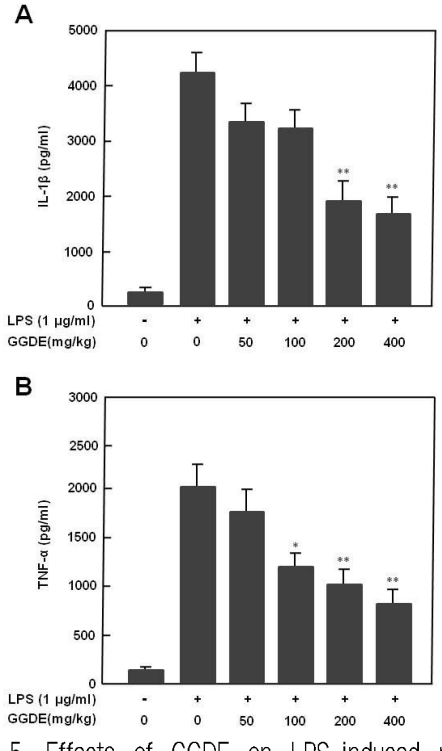

Fig. 5. Effects of GGDE on LPS-induced pro-inflammatory cytokine production in peritonial macrophages.

Peritoneal macrophages (1×10^6/mL) from Balb/c mice were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without LPS (1 μg/mL) for 24 h. Pro-inflammatory cytokine production of cell supernatants was measured using each ELISA assay kit against IL-1β or TNF-α as described in the section of Materials and Methods. (A) and (B) were shown the levels of IL-1β and TNF-α, respectively. Data are means ± SD of three independant experiments. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ versus control group treated with LPS alone.

Ⅳ. 고 찰

加減拱辰丹는 鹿茸, 山茱萸, 當歸의 세 가지 약재에 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 약물로 배합된 한약제다[3,4]. 최근에 본 연구자들은 加減拱辰丹 추출물을 활용하여 OVA에 의해 유도된 피부 알레르기 반응을 억제하는 효과를 보고하였으며[3], 더불어 추출물 자체의 항산화능을 바탕으로 APAP에 의해 유도된 간독성을 완화시키는 효과를 보고하였다[4]. 따라서 본 연구는 加減拱辰丹의 항염증 효과를 밝히기 위하여 마우스 복강대식세포를 LPS 자극에 의해 생성되는 염증 매개물을 조사하였다. 그 결과 본 연구에서 사용된 加減拱辰丹 추출물인 GGDE는 세포독성이 없었고, LPS에 유발되는 세포독성을 억제하는 효과가 있었다. 또한 염증 매개물인 NO와 PGE2의 생성억제는 iNOS와 COX-2 분자 발현 억제를 통하여 나타남을 확인하였다. 더불어 전염증성 사이토카인인 IL-1β와 TNF-α을 효과적으로 억제하는 효능을 밝혔다.

拱辰丹의 본방에서 麝香는 항염 효과가 보고되었지만, 예로부터 희귀고가약품이어 사용이 어려웠고 근래에 들어와 CITES 부속서 1에 속해 있는 사향에 대한 사용 문제가 사회적인 이슈가 되기도 했다. 따라서 사향을 대체할 수 있는 理氣藥류를 가감하여 사용하는 처방들이 소개되어 지고 있다. 동의보감을 보면 공진단과 같은 조문에 黑元이라는 처방이 당귀와 녹용만으로 사향을 사용하지 않더라도 공진단과 같은 의미의 약효를 낼 수 있다는데 착안하여 기존의 공진단에 사향을 제외한 새로운 처방의 조합을 만들 수 있다고 하였다[2].

본 加減拱辰丹의 구성 약물 중 黃芩은 baicalin, baicalein 및 wogonin 등 항산화 뿐만 아니라 항염증 효과가 우수하여 항노화, 항염증 및 항알레르기 소재로 활용가치가 매우 높은 한약재로 평가되고 있다[10-12]. 또한 오미자는 전통적으로 한국과 중국에서 호흡곤란 및 기침 등 호흡기질환과 다한증 및 오열, 몽정, 이질, 불면증 및 기억상실증 등 다양하게 인체에 사용해왔다. 최근에 오미자 열매로부터 추출한 유용 화합물인 schizandrin계열은 지질산화작용을 억제하고[8] glutathione 매개 항산화작용을 증진시키는 것으로 알려져 있다[13]. 더불어 枸杞子[14], 山藥[15], 陳皮[16], 天麻[17], 藿香[18], 桂皮[19] 등 각각의 구성약물도 항산화 작용뿐만 아니라 항염증 작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 이들 약물을 전체적으로 배합한 본 加減拱辰丹의 추출물을 대상으로 마우스 복강대식세포의 항염증 작용에 대한 보고는 없는 실정이다.

인체에 나타나는 거의 모든 질환에는 염증반응이 동반되므로 이를 개선 또는 치료하는 데는 항염증 효과를 나타내는 약물을 일반적으로 사용하고 있다. 본 연구에서 사용한 加減拱辰丹의 유효물질 추출은 열수추출법을 활용하여 GGDE를 제조하였고, 염증 매개물로 잘 알려진 NO와 PGE2의 생성에 미치는 GGDE의 효과를 조사하였다. 그 결과 NO의 생성억제에 대한 GGDE의 기전은 iNOS를 통하여 이루어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포를 LPS로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO을 생하면서 활성화 된다[5,11]. 또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은 양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 활성화된 대식세포로부터 과량의 prostanoid생성은 면역반응에 관여하여 다양한 염증성 질환의 원인이 된다[5,11]. 따라서 본 연구는 먼저 GGDE가 PGE2의 생성에 대한 억제 효과가 있음을 확인하고 그 분자기전을 알아보기 위해서 COX-2 활성과 발현을 조사한 결과 흥미롭게도 PGE2의 생성 억제와 같이 COX-2

활성과 발현을 억제하는 효과가 있었다(Fig. 4)

한편 인체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 NO와 PGE2와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필연적으로 염증성 사이토카인이 동반되는데, 대표적인 사이토카인이 IL-1β와 TNF-α이다. IL-1β는 대표적인 전 염증성 사이토카인이다. IL-1β의 수용체는 TNF-α의 수용체와 명확히 다른 구조를 가지고 있는데도 면역 생물학적 기능으로 볼 때 다른 사이토카인보다 TNF-α와 매우 밀접한 관련이 있다. 일반적으로 IL-1β는 생체에서 매우 낮은 농도로 작용하는데, 낮은 농도에서는 세포 성장이나 체내 항상성 유지에 필요하지만, 염증반응이나 상처 또는 면역학적 자극을 주었을 때는 대량으로 생산되어 인체 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다[20]. 또한 TNF-α는 주로 활성화된 대식세포에서 대량 생산되지만, 림포이드계의 세포(lymphoid cells), 비만세포(mast cells), 내피세포(endothelial cells)을 비롯하여 생체에 존재하는 다양한 세포에서도 생산된다. 특히 LPS 또는 IL-1으로 자극할 경우 대량 생산된다. 피부조직에서 LPS로 자극하였을 때 TNF-α가 생성되어 비만세포를 비롯한 면역세포의 침윤이 촉진되고 염증반응을 촉진시키는 효과가 있어 TNF-α를 전염증성 사이토카인라 한다[21]. 따라서 TNF-α를 효과적으로 억제할 수 있는 소재의 발굴은 인체에서 나타나는 염증성 질환을 개선 또는 치료하는데 활용될 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 마우스 복강 대식세포를 대상으로 LPS로 자극한 후 IL-1β와 TNF-α의 생성능에 미치는 GGDE의 효과를 조사하였다. 그 결과 GGDE는 효과적으로 이들 전염증성 사이토카인 생성을 억제하는 우수한 효과가 있음을 밝혔다. 그러나 GGDE의 염증 매개물질의 생성과 전염증성 사이토카인의 생성 억제에 대한 분자기전은 앞으로 더 연구해야할 과제로 남아 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 GGDE는 LPS에 의해 유도되는 NO와 PGE2와 같은 염증 매개물뿐만 아니라 IL-1β와 TNF-α와 같은 전염증성 사이토가인을 억제하는 효과가 우수하였다. 이러한 효과는 鹿茸, 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 생약에 포함된 항산화 성분뿐만 아니라 항염증에 관여하는 여러 가지 성분이 복합적으로 작용하는 효과라 추정 된다. 그러므로 加減拱辰丹은 각종 인체질환에서 나타나는 염증을 개선 또는 치료하는데 활용할 수 있는 좋은 처방이라 사료된다.

V. 결 론

최근에 본 연구자들은 鹿茸, 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 11가지약제로 구성된 加減拱辰丹을 처방하고 그 추출물을 활용하여 OVA에 의해 유도된 피부 알레르기반응 억제와 추출물의 항산화능을 바탕으로 APAP에 의해 유도된 간독성을 개선시키는 효과를 보고하였다. 본 연구는 LPS로 자극된 마우스 복강대식세포에서 염증 매개물질의 생성과 이들 물질의 생성에 관여하는 분자의 발현에 미치는 加減拱辰丹의 추출물인 GGDE의 영향을 조사하였다. 그 결과 GGDE는 LPS 자극에 의해 활성화된 마우스 복강대식세포에서 iNOS와 COX-2의 분자발현을 억제함으로써 NO와 PGE2와 같은 염증 매개물의 생성을 억제와 IL-1β와 TNF-α등 전염증성 사이토가인 생성을 억제하는 효과가 우수하였다. 그러므로 加減拱辰丹의 항염증 효과는 인체질환에서 나타나는 각종 염증성 질환을 개선 또는 치료할 수 있는 가능성이 있어 앞으로 그 활용가치가 높아질 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년 우석대학교 교내학술연구비 지원을 받았음을 밝힙니다.

참고문헌

1. 危亦林. 世醫得效方. 서울:도서출판 醫聖堂. 1990:71.
2. 許浚. 新對譯東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 2007:1251.
3. 김홍준, 황성연, 목지예, 황병순, 정승일, 장선일. Balb/c 마우스에서 ovalbumin 면역반응에 대한 加味拱辰丹 추출물의 억제효과. 大韓本草學會誌. 2009;24:127-35.
4. 김홍준, 목지예, 박광현, 정승일, 황병순, 황성연, 조정근, 장선일. Acetaminophen 유도 마우스 간 손상에 대한 加減拱辰丹 추출물의 간보호 효과. 大韓本草學會誌. 2010;25:149-57.
5. Ahmad, N., Chen, L.C., Gordon, M.A., Laskin, J.D., Laskin, D.L. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. Journal of Leukocyte Biology. 2002;71:1005-11.
6. Barnes, P.J., and Karin, M. Nuclear factor-κB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. New England Journal Medecine. 1997;336:1066-71.
7. Coker, P.K., Laurent, G.J. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. European Respiratory Journal. 1998;11:1218-21.
8. De Nardin, E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. Annals of Periodontology. 2001;6:30-40.
9. Isomaki, P. and Punnonen, J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. Annals of Medicine. 1997;29:499-507.
10. Krakauer, T., and Li, B.Q, Young, H.A. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. FEBS Lett. 2001;500:52-5.
11. Chen, Y.C., Shen, S.C., Chen, L.G., Lee, T.J. and Yang, L.L. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. Biochem Pharmacol. 2001;61:1417-27.
12. Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Jekal SJ, Pae HO, Choi BM, Yun YG, Kwon TO, Chung HT, Kim YC. Hepatoprotective effect of baicalin, a major flavone from Scutellaria radix, on acetaminophen-induced liver injury in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2003;25:585-94.
13. Ip SP, Ko KM. The crucial antioxidant action of schisandrin B in protecting against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice: a comparative study with butylated hydroxytoluene. Biochemistry and Pharmacology. 1996;52:1687-93.
14. Han EH, Kim JY, Kim HG, Choi JH, Im JH, Woo ER, Jeong HG. Dihydro-N-caffeoyltyramine down-regulates cyclooxygenase-2 expression by inhibiting the activities of C/EBP and AP-1 transcription factors. Food Chem Toxicol. 2010;48:579-86.
15. Yang MH, Yoon KD, Chin YW, Park JH, Kim J. Phenolic compounds with radical scavenging and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activities from Dioscorea opposita. Bioorg Med Chem. 2009;17:2689-94.
16. Murakami A, Nakamura Y, Ohto Y, Yano M, Koshiba T, Koshimizu K, Tokuda H, Nishino H, Ohigashi H.Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. Biofactors. 2000;12:187-92.
17. Hwang SM, Lee YJ, Kang DG, Lee HS. Anti-inflammatory effect of Gastrodia elata rhizome

in human umbilical vein endothelial cells. Am J Chin Med. 2009;37:395-406.
18. Abdolghaffari AH, Baghaei A, Moayer F, Esmaily H, Baeeri M, Monsef-Esfahani HR, Hajiaghaee R, Abdollahi M. On the benefit of Teucrium in murine colitis through improvement of toxic inflammatory mediators. Hum Exp Toxicol. 2010;29:287-95.
19. Brahmachari S, Jana A, Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, reduces microglial and astroglial inflammatory responses. J Immunol. 2009;183:5917-27.
20. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. Eur Cytokine Netw. 1994;5:517-31.
21. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1991;88:4220-4.