

원저

赤芍藥 추출물이 大食細胞에서 NO 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향

한상엽^{1,2} · 이은용²

^{1,2}부천자생한방병원 침구과
²세명대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Effect of *Paeoniae Radix Rubra* Extract on the Production of NO and Prostaglandin E₂ in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages

Han Sang-yeob^{1,2} and Lee Eun-yong²

^{1,2}Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Bucheon Jaseng Hospital of Oriental Medicine
²Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental medicine, Semyung University

Objectives : The objective of this study is to study the effects of hot aqueous extract and ethanol extract from *Paeoniae Radix Rubra* on nitric oxide(NO) and prostaglandin E₂(PGE₂) production in macrophage.

Methods : *Paeoniae Radix Rubra* were extracted in 2 ways. one was extracted with hot aqueous for 4 hr in 100°C and the other one was extracted with 70% ethanol for 4 hr in 70°C. RAW264.7 cells, a mouse macrophage lines, were incubated with different concentrations of the extract for 30 min and then stimulated with LPS at indicated times. Cell toxicity was determined by MTT assay. The concentrations of NO and PGE₂ were measured by griess assay and enzyme immunoassay(EIA).

Results : The hot aqueous and ethanol extracts of *Paeoniae Radix Rubra* significantly inhibited the NO productions in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The hot water extract of *Paeoniae Radix Rubra* significantly inhibited the PGE₂ productions in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conclusions : Our results demonstrated that *Paeoniae Radix Rubra* extract is able to significantly inhibit the production of NO, PGE₂ expression. Hot aqueous extract of *Paeoniae Radix Rubra* has more effective anti-inflammation than ethanol extract.

* 본 연구는 지식경제부의 지역혁신센터사업으로 수행되었음(RIC-07-06-01)
· 접수 : 2011. 1. 18. · 수정 : 2011. 1. 24. · 채택 : 2011. 1. 26.
· 교신저자 : 이은용, 충북 충주시 봉방동 836번지 세명대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 043-841-1735 E-mail : acupley@semyung.ac.kr

Key words : *Paoniae Radix Rubra*, prostagrandin E₂(PGE₂), nitric oxide(NO), anti-inflammatory, hot aqueous extract, ethanol extract

I. 서론

赤芍藥(*Paoniae Radix Rubra*)은 毛茛科(미나리아재비과; *Ranunculaceae*)에 속한 多年生 草本인 赤芍藥(*Paonia lactiflora* PALL)과 川赤芍(*P. veitchii* LYNCH)의 뿌리를 乾燥한 것으로서, 性은 微寒無毒하고, 味는 苦한 약물이며¹⁾, 그 성분은 paeoniflorin, paeonin, paeonol, 정유, tannin 등으로²⁾ 이 중 paeoniflorin는 항염증에 대한 유의성이 실험적으로 입증된 물질이다³⁾.

염증이란 어떤 자극에 대한 생체조직 방어반응의 하나로서 대부분의 병이 이에 속하며, 질환은 주로 염증반응에 관여하는 세포인 macrophage나 monocyte 등이 reactive oxygen species(활성산소종)과 reactive nitrogen species(활성질소종) 및 nitric oxide(NO)나 prostagrandin E₂(PGE₂), 염증성 cytokine 등의 염증매개물질들을 분비하여 발생한다⁴⁻⁷⁾. 이에 따라 천연물로부터 염증 매개물질 조절에 의한 항염증 물질 탐색과 관련한 연구가 활발히 진행되고 있다.

전통적으로 한의학에서는 천연물인 한약재를 복용하는 방법에서 湯劑·散劑·丸劑·膏劑·丹劑·酒劑 등의 제형 방법 중 湯劑가 가장 널리 사용되고 있는데⁸⁾, 현재 유효성·안정성·품질의 균일성 및 유효기간의 설정 등 의약품으로서 갖추어야 할 기본적 요소를 확보하는 데 어려움이 있어⁹⁾, 보다 유효농도가 확보된 제품 개발의 필요성과 여러 가지 extract의 활용도와 중요성이 점차 증대되고 있다.

현재까지 추출법에 따른 유효성의 차이에 대한 연구는 많이 시행되지 않은 상태로, 김 등^{10,11)}의 복합처방에 대한 연구는 있었지만 단미제에 대한 추출법에 따른 유효성 비교에 대한 연구는 없는 상황이다.

이에 저자는 赤芍藥 추출물의 열수 추출과 에탄올 추출에 따른 세포에 대한 독성, 대식세포에서의 NO의 생성, PGE₂의 생성 등 항염증 효과에 대해 실험적 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 방법

1. 시료의 조제

赤芍藥은 (주)HMAX에서 구매하여 사용하였다. 열수 추출 조제방법은 적작약 300g을 중량하고 3차 증류수 2L와 혼합하여 100℃로 4시간 동안 중탕하여 열수 추출하였으며, 여과지로 여과한 추출액을 rotary evaporator를 이용하여 100ml까지 농축하고 -80℃로 동결하였다. 농축한 동결액을 freezing dryer system (Labconco, USA)을 이용하여 7일간 동결 건조하였다. 에탄올 추출 조제방법은 적작약 300g을 중량하고 70% 에탄올 2L와 혼합하여 70℃로 4시간 추출하였으며, 상층액을 여과지로 여과하였으며 rotary evaporator를 이용하여 농축하였다.

2. 실험

1) 세포배양

실험에 사용된 세포는 생쥐대식세포 주인 RAW 264.7 세포주를 ATCC(USA)로부터 분양받아 사용하였다. 10% inactivated fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin·streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)을 배양액으로 사용하여 37℃, 5% CO₂가 공급되는 조건의 배양기에서 배양하였다.

2) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosman¹²⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96well plate는 1×10⁵cell/well 농도로 접종한 후 16시간 동안 37℃, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 세포를 안정화시켰다. 안정화시킨 세포에 시료를 농도별로 처리하고 16시간 동안 배양 후 MTT 용액(5μg/ml)을 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고

DMSO(dimethylsulfoxide) 300 또는 100 μ l를 넣어 보라색의 formazan이 용출되도록 하여 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) NO 생성량 측정

세포로부터 생성되는 NO의 양은 세포 배양액 중 존재하는 NO₂⁻ 형태를 Griess 시약 반응을 이용하여 측정하였다. 세포를 well당 1×10⁵이 되도록 96well plate에 깔고 16시간 동안 37℃, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 세포를 안정화했다. 안정화한 세포에 lipopolysaccharide(10 μ g/ml의 LPS)와 시료를 농도별로 처리하고 16시간 동안 배양하였다. 배양상층액 100 μ l와 Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride 50 μ l & 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ 50 μ l) 100 μ l를 섞어 흡광도 540nm에서 측정하였다.

4) PGE₂ 생성량 측정

E₂의 측정은 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems(Minneapolis, USA)에서 구매하여 사용하였으며, 측정방법은 제조사의 설명서를 준용하였다. 실험방법은 RAW 264.7 세포에 한약 추출물을 1시간 전처리하고 10 μ g/ml의 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 18시간 배양한 후 세포 배양 상층 액을 거뒀다. PGE₂ 측정에 사용하였는데, 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96well plate에 각각의 배양액을 100 μ l씩 loading하였다. 여기에 primary antibody solution 50 μ l와 PGE₂ conjugate 50 μ l씩 첨가하여 4℃에서 overnight시킨 다음, 기질 용액을 200 μ l씩 처리하여 5~20분간 반응시킨 후, 50 μ l의 stop solution을 처리하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 통계처리 및 그래프 작성

실험결과는 SPSS Window program(Ver 10.0)을 이용하였으며, 측정값은 평균값±표준편차(mean±standard error)로 나타내었고, p<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 효과를 판정하기 위한 통계학적 분석은 graphpad prism program의 student's t-test를 실시하였다. 그래프 작성은 Microsoft Office Excel 2010을 사용하였다.

III. 결 과

1. 赤芍藥 추출물이 세포독성에 미치는 영향

1) 열수 추출한 赤芍藥 추출물

赤芍藥의 농도가 세포 내에서 독성을 일으키는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정된 결과, 열수 추출한 赤芍藥의 대조군 생존율을 100±4.98%로 설정하였을 때 1, 5, 25, 125, 625 및 3,125 μ g/ml에서 각각 101.677±6.72, 99.92±0.91, 105.83±5.88, 90.53±5.11, 87.50±1.99 및 69.41±11.02%로 나타났으며, 625 및 3,125 μ g/ml 처치군에서 세포 생존율이 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

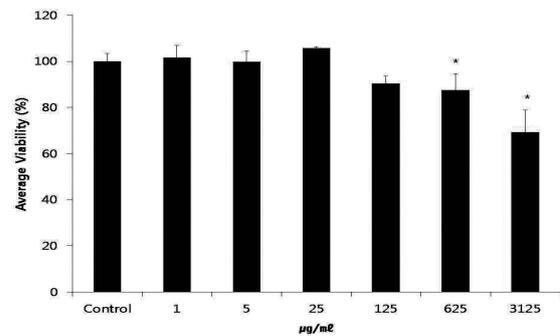


Fig. 1. The cytotoxic effect of PRRHAE on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay

PRRHAE : *Paeoniae Radix Rubra* hot aqueous extract.

Control : control group(not treated).

1 : 1 μ g/ml PRRHAE treated group.

5 : 5 μ g/ml PRRHAE treated group.

25 : 25 μ g/ml PRRHAE treated group.

125 : 125 μ g/ml PRRHAE treated group.

625 : 625 μ g/ml PRRHAE treated group.

3125 : 3125 μ g/ml PRRHAE treated group.

Values are represented as mean±SD.

* : statistically significant difference from the control group, as determined by the student's t-test as p<0.05.

2) 에탄올 추출한 赤芍藥 추출물

에탄올 추출한 赤芍藥의 대조군 생존율을 100±3.39%로 설정하였을 때 1, 5, 25, 125, 625 및 3,125 μ g/ml에서 각각 99.68±5.29, 98.24±4.63, 95.93±0.51, 96.21±2.99, 95.63±7.09 및 59.58±9.36%로 나타났으며, 3,125 μ g/ml 처치군에서 세포생존율이 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

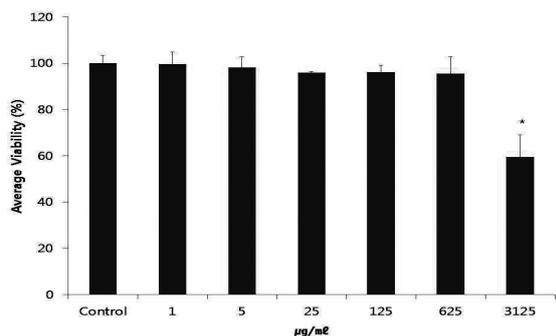


Fig. 2. The cytotoxic effect of PRREE on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay
 PRREE : *Paeoniae Radix Rubra* ethanol extract.
 Control : control group(not treated).
 1 : 1µg/ml PRREE treated group.
 5 : 5µg/ml PRREE treated group.
 25 : 25µg/ml PRREE treated group.
 125 : 125µg/ml PRREE treated group.
 625 : 625µg/ml PRREE treated group.
 3125 : 3125µg/ml PRREE treated group.
 Values are represented as mean±SD.
 * : statistically significant difference from the control group, as determined by the student's *t*-test as $p < 0.05$.

2. 赤芍藥 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

1) 열수 추출한 赤芍藥 추출물

열수 추출한 赤芍藥의 경우 NO 생성물을 조사한 결과, 적작약 추출물을 처리하지 않은 Control군에서

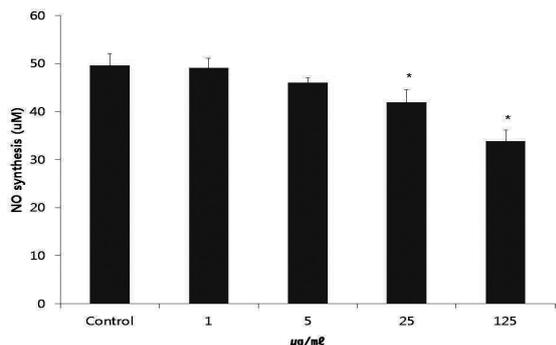


Fig. 3. Effect of PRRHAE on RAW 264.7 macrophage cells by NO synthesis assay
 PRRHAE : *Paeoniae Radix Rubra* hot aqueous extract.
 Control : LPS 10µg/ml control group(not treated).
 1 : LPS + 1µg/ml PRRHAE treated group.
 5 : LPS + 5µg/ml PRRHAE treated group.
 25 : LPS + 25µg/ml PRRHAE treated group.
 125 : LPS + 125µg/ml PRRHAE treated group.
 Values are represented as mean±SD.
 * : statistically significant difference from the control group, as determined by the student's *t*-test as $p < 0.05$.

는 $49.57 \pm 2.50 \mu\text{M}$ 농도로 나타난 반면, 赤芍藥을 1, 5, 25 및 $125 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 군에서 각각 49.13 ± 1.99 , 46.07 ± 0.97 , 41.91 ± 2.64 및 $33.85 \pm 2.26 \mu\text{M}$ 로 나타났으며, 25 및 $125 \mu\text{g/ml}$ 처치군에서는 대조군에 비해 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 3).

2) 에탄올 추출한 赤芍藥 추출물

에탄올 추출한 赤芍藥의 경우 nitric oxide 생성물을 조사한 결과 적작약 추출물을 처리하지 않은 Control군에서는 $68.28 \pm 2.72 \mu\text{M}$ 농도로 나타난 반면, 赤芍藥을 1, 5, 25, 125 및 $625 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 군에서는 각각 65.03 ± 2.37 , 61.76 ± 2.71 , 62.37 ± 1.94 , 55.14 ± 1.71 및 $32.09 \pm 1.47 \mu\text{M}$ 로 나타났으며, 25 및 $125 \mu\text{g/ml}$ 처치군에서는 대조군에 비해 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 4).

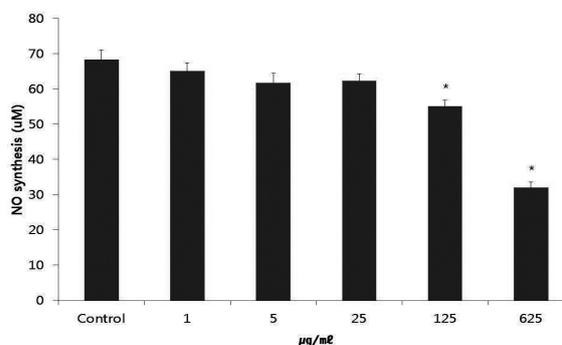


Fig. 4. Effect of PRREE on RAW 264.7 macrophage cells by NO synthesis assay
 PRREE : *Paeoniae Radix Rubra* ethanol extract.
 Control : LPS 10µg/ml group(not treated).
 1 : LPS + 1µg/ml PRREE treated group.
 5 : LPS + 5µg/ml PRREE treated group.
 25 : LPS + 25µg/ml PRREE treated group.
 125 : LPS + 125µg/ml PRREE treated group.
 625 : LPS + 625µg/ml PRREE treated group.
 Values are represented as mean±SD.
 * : statistically significant difference from the control group, as determined by the student's *t*-test as $p < 0.05$.

3. 赤芍藥 추출물이 PGE₂ 생성에 미치는 영향

1) 열수 추출한 赤芍藥 추출물

PGE₂ 생성물을 조사한 결과 적작약 추출물을 처리하지 않은 Control군에서는 $821.24 \pm 1.63 \text{pg/well}$ 로 나타났고, 열수 추출한 赤芍藥 실험군에서는 50, 100, 150 및 $200 \mu\text{g/ml}$ 로 처리한 군에서는 각각 847.60 ± 5.61 , 839.01 ± 7.58 , 740.40 ± 9.07 및 $715.75 \pm 10.26 \text{pg/well}$ 로 나타났으며, 150 및 $200 \mu\text{g/ml}$ 처치군에서는 대조군에 비

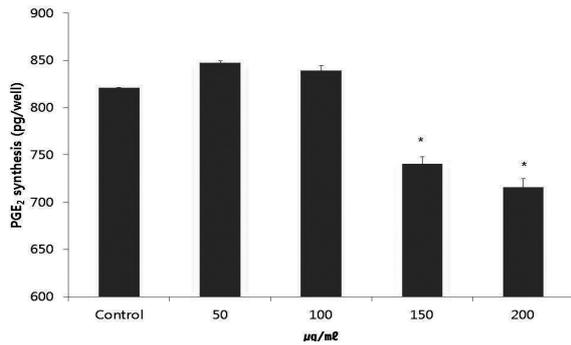


Fig. 5. Effect of PRRHAE on RAW 264.7 macrophage cells by PGE₂ synthesis assay

PRRHAE : *Paeoniae Radix Rubra* hot aqueous extract.

Control : LPS 10µg/ml group(not treated).

50 : LPS + 50µg/ml PRRHAE treated group.

100 : LPS + 100µg/ml PRRHAE treated group.

150 : LPS + 150µg/ml PRRHAE treated group.

200 : LPS + 200µg/ml PRRHAE treated group.

Values are represented as mean±S.D.

* : statistically significant difference from the control group, as determined by the Student's *t*-test as *p*<0.05.

해 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

2) 에탄올 추출한 赤芍藥 추출물

에탄올 추출한 赤芍藥의 경우 PGE₂ 생성률을 조사한 결과 적작약 추출물을 처리하지 않은 Control군에서는 821.24±1.63 pg/well로 나타났으며, 에탄올 추출한 赤芍藥 실험군에서는 50, 100, 150 및 200µg/ml로 처리한 군에서는 각각 834.52±10.34, 820.88±14.65, 807.62±12.11 및 816.65±17.32pg/well로 나타났으며, 유

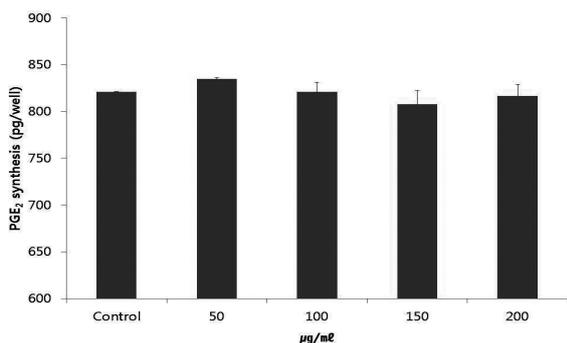


Fig. 6. Effect of PRREE on RAW 264.7 macrophage cells by PGE₂ synthesis assay

PRREE : *Paeoniae Radix Rubra* ethanol extract.

Control : LPS 10µg/ml group(not treated).

50 : LPS + 50µg/ml PRREE treated group.

100 : LPS + 100µg/ml PRREE treated group.

150 : LPS + 150µg/ml PRREE treated group.

200 : LPS + 200µg/ml PRREE treated group.

Values are represented as mean±SD.

의성은 나타나지 않았다(Fig. 6).

IV. 고찰

赤芍藥(*Paeoniae Radix Rubra*)은 毛茛科(미나리아재비과 ; *Ranunculaceae*)에 속한 多年生 草本인 赤芍藥(*Paeonia lactiflora* PALL)과 川赤芍(*P. veitchii* LYNCH)의 뿌리를 乾燥한 것이다. 性は 微寒無毒하고, 味는 苦한 藥물로¹⁾, “女人一切病을 主하고 并産前後 諸疾하고 除血痺한다.”¹³⁾하여 活血 및 清熱涼血 작용을 강조하였다.

대식세포(Macrophage)는 동물체 내 모든 조직에 분포하며 인체 내 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로서, 외부로부터 침입하는 이물질이나 세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 食菌作用을 하는 고전적인 기능과 함께 다양한 염증매개물질들을 분비하여 초기 염증반응에서 핵심적인 역할을 한다¹⁴⁾.

대식세포는 병원균과 같은 외부 자극원의 자극에 활성화되어 혈관 활성아민류(vascular amines), arachidonic acid metabolites(prostaglandins, leukotriene, lipoxin 등), 염증 사이토카인류(TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF), 혈소판활성인자(platelet activating factor), PGE₂, 산화질소(NO), 활성산소종(ROS) 등 다양한 염증 매개물질들을 분비하여 면역조절을 통해 생체 내 방어기능과 항상성 유지 기능을 조절하는 반면, 염증을 유발하여 각종 肺疾患이나 만성 氣管支炎, 氣管支 천식, 류마티스 關節炎, 多發性 硬化症, 退行性 腦疾患, 動脈硬化 등의 만성 염증질환으로의 진행에 기여하게 된다^{15,16)}.

RAW 264.7 cell은 대식세포주로서 LPS 등과 같은 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어서 일반적으로 세포독성이 있는 물질들의 독성검정을 위해 유용하게 사용되고 있다¹⁷⁾. 이러한 RAW 264.7 cell의 염증 활성화에 LPS를 사용하였다.

현재까지 대식세포에서 NO, PGE₂, inducible nitric oxide synthase(iNOS), interleukin-6(IL-6) 등과 같은 염증 매개물질의 생성에 대해, 이를 억제하는 항염증과 관련한 약재 추출물의 연구 동향을 살펴보면, 羌活¹⁸⁾ · 金銀花¹⁹⁾ · 連翹²⁰⁾ · 土茯苓²¹⁾ · 黃芪²²⁾로 제조된 약재 추출물이 항염증에 유의성을 보인다고 보고하였으나,

赤芍藥 추출물의 항염증효과에 대한 보고는 없었다.

NO는 높은 반응성을 가진 free radical로서 nano mol 단위 농도에서의 생성은 면역계의 방어인자로서 중요한 생리적 역할을²³⁾ 하는 반면에, micro mol 단위의 과도한 생성은 염증⁶⁾을 포함한 다양한 병리과정에 관여한다고 보고되고 있다. 이러한 과도한 NO의 생성은 IFN- γ , TNF- α 와 같은 cytokine과 세균의 내독소인 LPS 등의 자극에 의해 대식세포에서 iNOS가 발현됨에 따라 일어난다²⁴⁾. 일반적으로 iNOS의 발현은 면역 반응의 활성화 시 유발되어 염증반응을 심화시키는 데 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며²⁵⁾ Cyclooxygenase-2(COX-2) 역시 arachidonic acid를 prostaglandin(PG)로 전환시키는 효소로서 PGE₂를 생성시켜서 염증의 여러 병리과정에 관여한다고 보고되고 있다²³⁾.

PGE₂는 NO와 마찬가지로 손상된 부위나 조직에서 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로서 COX-2에 의해 합성되는데, 과량 생산되면 과도한 면역반응을 야기하여 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 각종 염증성 질환을 유발시키게 된다²⁷⁾. 따라서 PGE₂ 생성 억제제는 염증과 통증을 완화시킴으로써 염증질환 치료에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다²⁷⁻²⁹⁾. 조직이 손상되면 물리적인 손상뿐 아니라 염증을 매개하는 물질들이 다량 생성되기 때문에 통증이 유발되는데, 이 중 PGE₂는 조직손상이 일어나는 부위에서 생성되어 말초신경 말단부위에 작용하여 통증에 대한 역치를 감소시키게 된다³⁰⁾. 즉 NO와 마찬가지로 PGE₂의 생성 억제는 같은 각종 면역질환을 포함한 염증성질환 치료에 중요한 도움이 될 수 있다.

추출법에 따른 유효성의 차이에 대한 연구는 많이 시행되지 않은 상태로, 김 등^{10,11)}의 복합처방에 대한 연구는 있었지만 단미제에 대한 추출법에 따른 유효성 비교에 대한 연구는 없는 상황이다.

이에 저자는 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 연구하기 위해 LPS로 염증 유발된 RAW 264.7 대식세포를 선정하여 赤芍藥을 재료로 한 추출물을 대식세포에 투여하여 赤芍藥 추출물의 세포독성에 대해 관찰하고자 MTT assay를 시행하였고, 赤芍藥 추출물이 염증반응에 있어서 중요한 free radical인 NO에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 NO의 분비량을 측정하였으며, PGE₂의 생성에 미치는 변화를 관찰하고자 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems(Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험

하였다. 또한 각각의 실험에서 적작약을 열수 추출과 에탄올 추출법으로 달리 추출하여 실험적 영향을 비교 관찰하였다.

赤芍藥 추출물의 농도가 세포 내에서 독성을 일으키는 지 확인하기 위해 실험한 결과, 열수 추출한 赤芍藥 추출물 625 μ g/ml와 3125 μ g/ml에서 통계학적으로 유의한 감소가 나타났으며(Fig. 1), 에탄올 추출한 赤芍藥 추출물은 3125 μ g/ml에서 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다(Fig. 2).

赤芍藥이 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 단독으로 LPS 10 μ g/ml를 처리하고 실험한 군과 LPS10 μ g/ml에 열수 추출한 赤芍藥과 에탄올 추출한 赤芍藥을 1, 5, 25, 125 μ g/ml 농도로 처리한 군과 NO 생성물을 비교하였는데, 열수 추출한 赤芍藥을 25, 125 μ g/ml 농도로 처리한 군에서 유의한 감소를 보였는데(Fig. 3), 이는 열수 추출한 赤芍藥의 농도가 25, 125 μ g/ml에서는 염증 유발물질인 NO 생성에 유의한 억제 효과가 있다는 것을 의미한다. 세포에 독성이 없으면서도 NO생성에 유의한 억제 효과가 있는 것으로 보아 赤芍藥 열수 추출물에 항염증 효과가 있음을 알 수 있었고, 결과에 625, 3125 μ g/ml 농도로 처리한 기준이 빠지게 된 것은 세포독성으로 인한 영향이 포함된 결과로 직접 언급하지 않았다.

또한 에탄올 추출한 赤芍藥에서는 125, 625 μ g/ml 농도로 처리한 군에서 유의한 감소를 보였는데(Fig. 4), 이는 에탄올 추출한 赤芍藥의 농도가 125, 625 μ g/ml에서는 염증 유발물질인 NO 생성에 유의한 억제 효과가 있다는 것을 의미한다. 열수 추출한 赤芍藥 추출물과 에탄올 추출한 赤芍藥 추출물의 농도가 본 실험에서는 공통적으로 NO 생성에 억제 효과를 나타내는 농도가 125 μ g/ml라는 것이 발견되어 향후 항염증 억제제로서의 赤芍藥 추출액 농도에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

赤芍藥이 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 LPS 처리하지 않은 정상군에서는 큰 변화가 나타나지 않은 반면 LPS군에서는 821.24 \pm 1.63 pg/well로 PGE₂ 생성에 큰 변화가 나타났다. 열수 추출한 赤芍藥에서는 150 및 200 μ g/ml로 처리한 군에서는 통계학적으로 유의한 감소가 나타나(Fig. 5), 열수 추출한 赤芍藥이 중요한 염증매개물질의 하나인 PGE₂ 생성에 유의한 억제 효과가 있다는 것을 알 수 있었으나 에탄올 추출한 赤芍藥 실험군에서는 유의한 감소가 나타나지 않았다(Fig. 6). 이는 赤芍藥 추출법에 따라서 PGE₂ 생성에 미치는 영향에 차이가 있음을 추정

할 수 있다. 따라서 赤芍藥의 추출법으로는 이 실험의 결과만을 놓고 보았을 때는 에탄올 추출법보다는 열수 추출에 의한 赤芍藥 추출물의 생성이 보다 의미 있는 추출법이라고 사료된다.

상기 실험 결과, RAW 264.7 대식세포를 열수 추출한 赤芍藥과 에탄올 추출한 赤芍藥으로 처리한 후 NO 생성량, PGE₂ 생성에 미치는 영향을 평가한 결과 대조군에 비해 통계적으로 유의한 감소가 나타났다.

이러한 결과로 보아 赤芍藥 추출물은 3125 μ g/ml의 과량 투여 시에는 오히려 세포에 독성을 초래한다는 사실을 알게 되었고 NO 생성량 감소, PGE₂ 생성 억제에 의한 항염증효과를 보여주는 것으로 사료되며, 추출법에 따른 항염증 효과의 차이가 존재한다는 것이 밝혀진 만큼 앞으로 다른 약재들에서의 추출 용매의 다양화 및 적용 농도에 대한 연구가 지속적으로 활성화 되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증반응을 알아보기 위해 열수 추출과 에탄올 추출로 추출된 赤芍藥 추출물이 세포독성, NO 생성량, PGE₂ 생성물에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 열수 추출한 赤芍藥 추출물은 1, 5, 25, 125 μ g/ml에서 세포생존율에서 유의한 감소를 나타내지 않았다.
2. 에탄올 추출한 赤芍藥 추출물은 1, 5, 25, 125, 625 μ g/ml에서 세포생존율에서 유의한 감소를 나타내지 않았다.
3. 열수 추출한 赤芍藥 추출물 25, 125 μ g/ml 처치군은 LPS 단독처리군에 비하여 NO의 생성을 유의하게 감소시켰다.
4. 에탄올 추출한 赤芍藥 추출물 125, 625 μ g/ml 처치군은 LPS 단독처리군에 비하여 NO의 생성을 유의하게 감소시켰다.
5. 열수 추출한 赤芍藥 추출물 150, 200 μ g/ml 처치군은 LPS 단독처리군에 비하여 PGE₂의 생성물을 유의하게 감소시켰다.

따라서 赤芍藥 추출물이 일정 농도에서는 세포에

독성을 유발시키지 않으며 활성화된 대식세포로부터 유발되는 NO 및 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제함으로써 각종 염증질환 치료를 위한 약물로 사용할 수 있을 것으로 사료되고 또한 농도 및 추출용매의 다양화를 통해 약재 추출물의 항염증 효과 극대화에 활용 될 수 있을 것으로 기대한다.

VI. 참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1991 : 195.
2. 안덕균. 한국본초도감. 서울 : 교학사. 2003 : 713.
3. Shu YZ, Hatori M, Akao T, Kobashi K, Kagei K, Fukuyama K, Tsukihara T and Namba T. Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria. Chem. Pharm. Bull. 1987 ; 35 : 3726.
4. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol. 2001 ; 2(10) : 907-16.
5. Chang YH, Lee ST, Lin WW. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages:involvement of eicosanoids. J Cell Biochem. 2001 ; 81(4) : 715-23.
6. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005 ; 4(4) : 471-9.
7. Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. Trends Immunol. 2006 ; 27(1) : 24-31.
8. 이상인, 김동걸, 노승현, 이영중, 주영승. 방제학. 서울 : 영림사. 1992 : 29-36.
9. 리상인. 새로운 한약제제의 개발에 관한연구(-淸熱解毒湯 忍冬藤의 제형화에 관한연구-)보고서. 한국한의학연구원. 1998 : 106-7.
10. 김유승, 류봉하, 김진성. 元氣生脈散의 추출물별 항산화작용과 쥐의 운동피로 회복효과. 대한한방내과학회. 2009 ; 30(1) : 94-106.
11. 허태석, 고은정, 정희재, 이형구, 배현수, 정승기. 加味淸上補下湯의 물과 에탄올 추출법에 따른 항알레르기 효과에 對한 研究. 대한한방내과학회지.

- 2006 ; 27(1) : 40-54.
12. 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.
 13. 허준. 동의보감. 서울 : 동의보감출판사. 2005 : 2171.
 14. Guo LY, Hung TM, Bae KH, Shin EM, Zhou HY, Hong YN, Kang SS, Kim HP, Kim YS. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *European journal of pharmacology*. 2008 ; 591(1-3) : 293-9.
 15. 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) : 249-58.
 16. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992 ; 6(12) : 3051-64.
 17. 염정호. 니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 NO의 역할. *대한산업의학회지*. 2001 ; 13(3) : 274-7.
 18. 김창민, 박용기. 강활의 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증물질 생성에 대한 효과. *대한분초학회지*. 2009 ; 24(1) : 170-7.
 19. 윤용갑, 김규민, 이성준, 유승훈, 장선일. 금은화 수용성 추출물의 LPS 유도 염증매개물 억제 효과. *대한분초학회지*. 2007 ; 22(3) : 118-23.
 20. 곡정강, 정승기, 정희재, 김진주. 連翹의 LPS로 유도된 Raw 264.7 Cell에서의 抗炎症 효과. *대한한방내과학회지*. 2010 ; 31(2) : 54-63.
 21. 오성원, 김병우. 土茯苓의 RAW 264.7 세포에 대한 항염효과. *대한한방내과학회지*. 2009 ; 30(2) : 288-95.
 22. 김현수, 김연숙, 정준희, 김이화. 황기추출물이 LPS로 염증유도된 RAW 264.7 대식세포주에서 산화질소 및 프로스타글란딘 생성에 미치는 영향. *세명대학교 한의학연구소 논문집*. 2007 ; 10(10) : 45- 55.
 23. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999 ; 39 : 191-220.
 24. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: acytotoxic activates macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1988 ; 157(1) : 87-94.
 25. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol*. 1995 ; 34 : 71-90.
 26. Duerksen-Hughes PJ, Day DB, Laster SM, Zachariades NA, Aquino L, Gooding LR. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J Immunol*. 1992 ; 149(6) : 2114-22.
 27. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*. *Cancer letters*. 2004 ; 203 : 127-37.
 28. Lee DU, Kang YJ, Park MK, Lee YS, Seo HG, Kim TS, Kim CH, Chang KC. Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF-alpha, iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. *Life sciences*. 2003 ; 73 : 1401-12.
 29. Kim KW, Ha KT, Park CS, Jin UH, Chang HW, Lee IS, Kim CH. Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. *Vascular pharmacology*. 2007 ; 47 : 99-107.
 30. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clinical immunology(Orlando, Fla)*. 2006 ; 119(3) : 229-40.