

## 삼황사심탕(三黃瀉心湯) 추출물의 lipopolysaccharide 유도에 의한 염증 조절과 대식세포 활성화에 대한 연구

강희<sup>1\*</sup>, 권한울<sup>1</sup>, 소형진<sup>1</sup>, 이정민<sup>1</sup>, 류재환<sup>1</sup>, 최호영<sup>2</sup>

1: 경희대학교 동서의학대학원, 2: 경희대학교 한의과대학 본초학교실

### Effect of Samhwangsashintang Extract on Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Response and Macrophage Activity

Hee Kang<sup>1\*</sup>, Han-Al Kwon<sup>1</sup>, Hyung-Jin So<sup>1</sup>, Jeong-Min Lee<sup>1</sup>, Jae-Hwan Lew<sup>1</sup>, Ho-Young Choi<sup>2</sup>

1: Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin, Gyunggido  
2: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul

#### ABSTRACT

**Objectives** : Samhwangsashim-tang(SHSST), a mixture of Rhei radix et rhizoma, Scutellariae radix, and Coptidis rhizoma, has been regarded as being able to treat bleeding, gastric discomfort, dry mouth, insomnia and purpura due to Blood Heat. Currently, this herbal formula is applied to gastritis, gastric ulcer, hypertension, atherosclerosis or other types of vascular inflammatory disorders.

**Methods** : We extracted this herbal mixture with 30% ethanol and examined for its effects on systemic inflammatory responses and in vitro macrophage activity. Mice were orally given to SHSST for 7 days and then lipopolysaccharide(LPS) was intraperitoneally injected. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in serum were measured 1 h after LPS challenge. Peritoneal macrophages were isolated from thioglycollate-injected mice and used for in vitro cellular activity. Cell death was measured using the MTT method and annexin V/propidium iodide staining. LPS-stimulated signaling molecules necessary for TNF- $\alpha$  expression were determined by Western blotting.

**Results** : Oral administration of SHSST for 7 days resulted in a significant reduction in LPS-stimulated TNF- $\alpha$  release into serum. In vitro treatment of SHSST was cytotoxic in a concentration-dependent manner. However, SHSST caused a concentration-dependent reduction in necrosis and increase in apoptosis in mouse peritoneal macrophages. SHSST inhibited the activation of NF- $\kappa$  B, p38 and JNK signaling molecules in response to LPS.

**Conclusion** : Taken together, our results demonstrated that SHSST was effective in lowering LPS-stimulated TNF- $\alpha$  serum levels, possibly through its modulation of NF- $\kappa$  B, p38 and JNK in macrophages.

**Key words** : Samhwangsashim-tang, inflammation, TNF- $\alpha$ , macrophages

#### 서론

三黃瀉心湯은 문헌상으로는 한나라 시대의 張仲景의 저서 《金匱要略》<sup>1)</sup>에 처음 기재되었으며 大黃, 黃芩, 黃連으로 구성되어 血에 있는 火氣를 내리는 효능으로 血熱에 의한 상부 출혈, 心下痞, 구진, 불면, 發斑 등에 사용되고 현대의학적

질환으로는 위장염, 위출혈, 위궤양, 고혈압<sup>2,3)</sup>에 응용된다.

국민소득이 높아지면서 서구 음식 및 자동차의 보급화로 인해 우리나라도 영양과잉에 의한 비만과 대사성 질환이 급증하고 있다. 혈액내 중성지방, low density lipoprotein (LDL)-콜레스테롤, 당의 증가는 대사성 증후군을 보여주는 중요한 지표이며 심혈관질환 발생 위험도와 밀접한 관련이 있다<sup>4)</sup>. 특히

\*교신저자 : 강희, 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교 동서의학대학원  
· Tel : 031-201-3854 · Email : shehee@khu.ac.kr  
· 접수 : 2012년 10월 26일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 5일

혈관안의 LDL 콜레스테롤이나 다른 지방산이 동맥벽의 내층에 축적되어 산화되면 혈관내피세포를 자극하여 염증성반응을 일으킨다<sup>5)</sup>. 이로 인해 혈액안을 순환하는 단핵세포가 모여들어 대식세포로 분화하고 산화된 LDL 콜레스테롤에 대한 과도한 탐식작용으로 인해 괴사가 일어난다. 이러한 세포괴사와 지방이 축적되면서 석회화가 일어나면 혈관내벽으로 플라크가 형성하여 혈액내 혈소판의 응집을 일으켜 혈관직경이 좁아지게 된다.

대식세포는 대사성 산물뿐만 아니라 세포사멸에 의한 부산물, 세균 등을 포획하기도 하지만 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1, IL-6을 분비하여 주위 혈관내피세포를 자극하고 혈액내 백혈구를 조직으로 모이게 한다<sup>6)</sup>. 이러한 제거과정에서 지나친 활성을 보이게 되면 주위의 정상적인 조직까지 손상을 입히게 되므로 만성 염증으로 진행되지 않도록 조절되어야 한다.

三黃瀉心湯에 대한 실험 연구로서 먼저 국내에서는 혈압을 낮추거나 혈관벽을 이완하는 효과가 있음이 증명된 바가 있다<sup>7,8)</sup>. 외국에서는 보고된 바로는 물로 추출한 三黃瀉心湯을 직접 정맥투여를 했을 때 lipopolysaccharides(LPS)로 유도한 저혈압 모델에서 혈압의 하강을 보호 또는 치료해주는 효과가 있었고<sup>9,10)</sup>, thromboxane A2 analogue로 유도한 고혈압 모델에서는 혈압을 떨어뜨리는 효과가 증명되었다<sup>11)</sup>. 또한 三黃瀉心湯 물추출물은 LPS를 처리한 human aortic smooth muscle cell의 염증성반응을 조절하는 것으로 보고되었다<sup>12)</sup>. 본 연구에서는 30% 에탄올로 추출한 三黃瀉心湯을 동물에게 먹인 후 LPS에 대한 전신성 염증 반응에 대한 영향을 확인하였고 마우스 복강의 대식세포를 분리하여 세포독성과 염증성 신호전달을 규명하여 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1) 약물추출

三黃瀉心湯을 구성하는 실험약재들은 모두 경동한방 제약(대전, 한국)에서 구입하였다. 三黃瀉心湯은 대황, 황금, 황련을 2:1:1의 비율로 30% 알콜에 2시간씩 3회 열탕추출을 하여 동건조하였다(수율: 29.16%). 세포실험에 사용된 三黃瀉心湯 stock은 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)에 녹인 후 0.45  $\mu$ m sterile syringe filter (Corning, Germany)를 이용하여 여과한 후 사용하였다.

### 2) 실험동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 생후 8주령의 Balb/c 수컷 마우스(Samtako, Korea)이며 항온항습 상태에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육하였다. 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. LPS(serotype 055:B5)(Sigma)는 1.3 mg/kg의 농도로 복강투여를 한 후 1시간 후에 마취하여 심장채혈을 하였다. 三黃瀉心湯은 LPS로 자극하기 전 1주일간 매일 1회 10 mg/kg, 50 mg/kg, 200 mg/kg씩 경구투여하였다. 참고약물로 dexamethasone (Sigma)를 선택하였고 LPS로 투여하기 1일 전에 5 mg/kg의 농도로 복강투여하였다.

### 3) 복강대식세포 분리

Balb/c 마우스의 복강에 2 ml의 thioglycollate medium (BD, USA)를 주사하고 3일 후에 마우스를 경추탈골한 후 복강에서 8 ml의 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, Korea)을 주사하여 세포를 수집하였다. 원심분리 후 10% fetal bovine serum (FBS)(Welgene)와 1% penicillin-streptomycin (Welgene)가 함유된 DMEM에 suspension한 후 2시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 배양하였다. Non-adherent cell은 제거한 후 실험에 사용하였다.

### 4) 세포독성 검사

三黃瀉心湯 추출물에 대한 대식세포의 생존율을 확인하기 위해 MTT 방법을 이용하여 formazan으로 환원하는 세포내 효소활성을 통해 간접적으로 측정하였다. 세포를 4×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 96 well plate에 0.1 ml 접종하고 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후에 약제추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 후 5 mg/ml MTT 용액(AMRESCO, USA)을 0.01 ml씩 첨가하여 4시간 반응시킨 후 상등액을 제거하고 0.1 ml DMSO를 가하였다. 96 well microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 560 nm로 흡광도를 측정하였다.

### 5) ELISA

혈청내 사이토카인 농도를 측정하기 위해서 제조사(BD Pharmingen)의 protocol에 따라 ELISA 방법을 수행하였다. 각각의 capture antibody를 phosphate-buffered saline (PBS)에 희석하여 96 well immunoplate에 0.1 ml씩 분주한 후 상온에서 overnight 반응하였다. 각 well을 세척용 완충용액 (0.5% Tween/PBS)으로 세척한 후 blocking buffer (10% FBS/PBS)를 well 당 0.2 ml 넣고 1시간 동안 상온에 두어 반응하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 3회 세척한 후 시료 및 스탠더드를 적당량 희석하여 0.1 ml씩 분주하였다. 2 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 3회 세척 후 biotin이 결합된 2차 항체를 blocking buffer에 희석하여 well 당 0.1 ml씩 처리하여 1 시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척 후에 Streptavidin-HRP 용액으로 20분간 상온에서 반응시킨 후 세척하였다. TMB(BD) 용액을 well 당 0.1 ml 씩 처리한 후 30분 동안 상온에서 반응하였다. 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 well 당 0.05 ml씩 첨가함으로써 완료하였으며, 570 nm에서 96 well microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

### 6) Annexin V/Propidium iodide 분석

Annexin V/Propidium iodide(PI) 염색을 위해 마우스 복강에서 분리한 대식세포를 6 well plate에 접종한 후 한 약추출물과 함께 24시간 배양하였다. 실험방법은 제조사의 protocol (BD Pharmingen)대로 수행하였다. 배지를 제거한 후 cold PBS로 세포를 세척하고 0.1 ml binding buffer에 세포를 suspension하였다. FITC Annexin V 5  $\mu$ l와 PI 5  $\mu$ l를 넣고 15분간 상온에서 어둡게 하여 반응시켰다. 0.4 ml binding buffer를 추가한 후 유세포형광분석을 수행하였

다. 사용된 기계는 flow cytometer(Becton Dickinson, USA)이며 CellQuest 프로그램을 사용하였다.

### 7) Western blotting

세포를 6 well plate에 접종하여 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후 배지를 갈아주었다. 三黃瀉心湯 추출물을 한 시간 먼저 처리한 후에 LPS로 30 분간 자극하였다. 세포를 cold PBS로 2회 세척하고 complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Germany)와 phosphatase inhibitor (Sigma)을 첨가한 lysis solution (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM NaF, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100)으로 파괴하였다. Bradford 방법에 준하여 단백질 농도를 정량한 후 sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer를 넣고 3분간 boiling하였다. 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 단백질을 분리한 후에 젤을 polyvinylidene fluoride membrane으로 transfer하였다. Transfer가 제대로 되었는지를 확인하기 위해 ponceau S staining을 실시하였다. 5% skim milk를 0.1% Tween이 함유된 Tris-buffered saline (TBST)에 녹인 blocking buffer를 만든 후 여기에 membrane을 상온에서 한 시간 blocking하였다. 1:1000으로 희석한  $I\kappa B\alpha$ , GAPDH (모두 Santa Cruz, USA), phospho-JNK/stress-activated protein kinase(SAPK), phospho-p38, phospho-ERK1/2 (모두 Cell Signaling, USA) 로 4°C에 overnight 반응시켰다. Internal control로써 GAPDH을 사용하였다. TBST로 세척 후 1:5000으로 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit antibody로 상온에서 한 시간 반응하였다. TBST로 세척 후 chemiluminescent substrate (ECL, GE healthcare, UK)로 밴드를 확인하였다.

### 8) 통계분석

모든 결과는 SPSS 12.0 버전을 이용하여 분석하였으며, 평균의 차이는 non-paired Student's t-test로 분석하였다. P 값이 0,05 미만의 것만을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 결 과

### 1. 三黃瀉心湯 추출물 경구투여가 LPS 자극에 대한 혈액 염증성 사이토카인의 변화

三黃瀉心湯 추출물 투여가 전신성 염증반응 보호에 미치는 영향을 확인하기 위해 마우스에게 10 mg/kg, 50 mg/kg, 200 mg/kg씩 7일간 경구투여한 후 복강으로 LPS를 처리하였다. 복강자극을 한지 1시간째 혈액의 TNF- $\alpha$  와 IL-6의 양을 ELISA로 측정하였다. 실험 결과, 10 mg/kg, 50 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 TNF- $\alpha$  양은 37%, 43%, 40% 억제하였으며 모두 통계적으로 유의하였다 (Figure 1). 참고약물인 dexamethasone은 50 mg/kg과 비슷한 억제율을 보여주었다. 그러나 IL-6의 양은 고농도인 200 mg/kg에서만 유의하게 억제되었다.

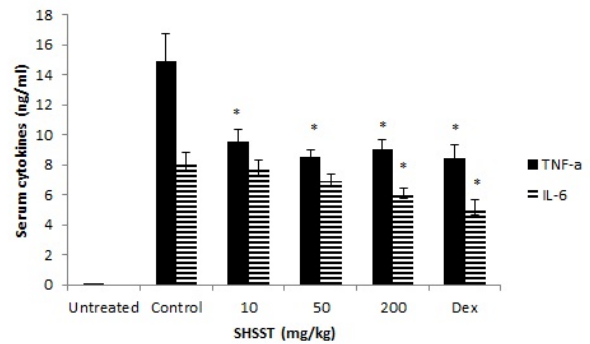


Figure 1. Effect of Samhwangsashim-tang (SHSST) on levels of lipopolysaccharides-stimulated serum cytokines. SHSST extract was orally given to mice for 7 days before intraperitoneal injection of lipopolysaccharides (LPS). Dexamethasone (Dex) was intraperitoneally injected 24 h before LPS stimulation. Serum was obtained 1 h after LPS challenge and the levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-6 were measured using ELISA. Data were mean  $\pm$  SEM of two independent experiments (n=15). \*  $P < 0.05$ , significantly different from control group.

### 2. 三黃瀉心湯 추출물이 대식세포 생존에 미치는 영향

대식세포는 TNF- $\alpha$  를 분비하는 주요 세포이므로 마우스 복강에서 대식세포를 분리하여 三黃瀉心湯추출물이 세포수준에서 미치는 영향에 대하여 확인하기로 하였다. 먼저 三黃瀉心湯 추출물의 세포독성을 알기 위해 MTT 방법을 이용하였다. MTT 방법은 살아있는 세포가 tetrazolium dye를 환원하는 효소에 의해 불용성인 formazon을 형성하는 것을 측정함으로써 간접적으로 세포생존율을 확인하는 방법이다. 에탄올을 30%로 분리하였기 때문에 세포막을 통과할 수 있는 지용성 성분이 더 많이 분리되어 三黃瀉心湯은 비교적 저농도에서도 세포독성을 띠었으며 100  $\mu$ g/ml에서 대조군에 비해 70%의 생존율을 보여주었으며 최대 농도인 400  $\mu$ g/ml에서는 40%의 생존율만을 보여주었다 (Figure 2).

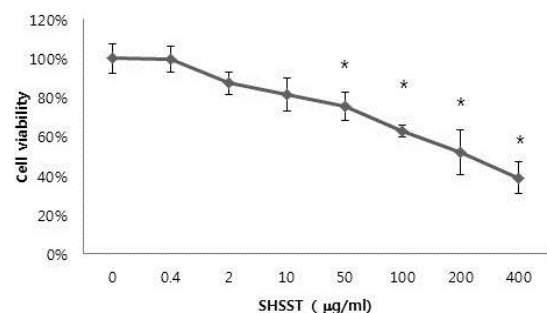


Figure 3. Effect of SHSST on cell viability. Mouse peritoneal macrophages were cultured with SHSST extract for 24 h. The number of live cells was determined using the MTT method. Data were mean  $\pm$  SD of six independent assays. \*  $P < 0.05$ , significantly different from control cells (0  $\mu$ g/ml).

### 3. 三黃瀉心湯 추출물의 세포사멸에 대한 영향

三黃瀉心湯 추출물이 대식세포에 대한 세포독성을 확인하였으므로 이러한 세포사멸의 주된 기전이 necrosis나 apoptosis에 의한지를 살펴보기 위해 Annexin V/PI staining을 수행하였다. 일반적으로 apoptosis가 일어나는 세포는 세포질에 접하는 세포막의 phospholipid phosphatidylserine이 바깥쪽으로 이동하는 특징이 있으며 Annexin V는 바로 외측으로 이동한 phospholipid phosphatidylserine과 결합한다<sup>13)</sup>. 또한 PI는 apoptosis나 necrosis로 막손상을 입은 세포안으로 투과한다. 따라서 Annexin V나 PI에 의해 모두 염색이 되지 않는 세포는 구조적으로 살아있는 세포로 볼 수 있다. 유세포분석방법으로 살아있는 세포(viable), 괴사가 일어난 세포(necrotic), apoptosis가 진행된 세포(apoptosis)를 확인한 결과 三黃瀉心湯은 농도의존적으로 apoptosis를 유도하되 괴사는 반대로 감소되었다(Figure 3).

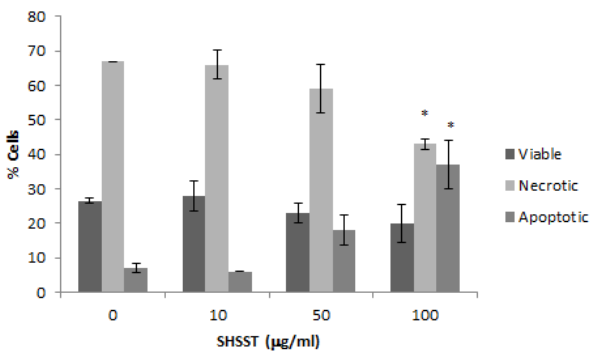


Figure 3. Effect of SHSST on Annexin V/Propidium iodide staining. Staining for Annexin V and propidium iodide (PI) was performed 24 h after culture with SHSST. Viable cells were defined as both Annexin V and PI negative; Necrotic cells as PI positive; Apoptotic cells as Annexin V positive. Data were mean  $\pm$  SD of three independent assays. \*  $P < 0.05$ , significantly different from control cells (0  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 4. 三黃瀉心湯 추출물이 세포내 염증성 신호전달물질에 미치는 영향

대식세포가 분비하는 TNF- $\alpha$ 는 자극이 세포안으로 전달될 때 세포질에 있는 다양한 신호전달물질에 의해 유전자수준에서 먼저 발현된 후 합성되어야 한다. LPS나 다른 염증성 자극을 핵내로 전달하는 대표적인 단백질은 NF- $\kappa$ B와 mitogen-activated protein (MAP) kinase이다. NF- $\kappa$ B는 정상적인 조건에서는 세포질의 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 결합되어 핵내로 이동하지 못하나 LPS를 포함한 염증성 자극은 I $\kappa$ B $\alpha$ 를 분해함으로써 NF- $\kappa$ B가 자유롭게 핵내로 이동하여 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현을 촉진한다<sup>14,15)</sup>. MAP kinase에 속하는 대표적인 단백질은 p38, JNK, ERK1/2가 있으며 이들은 TNF- $\alpha$  유전자의 반감기와 번역(translation)을 조절하고 TNF- $\alpha$ 의 프로모터에 결합하는 AP-1 전사인자의 활성을 조절한다<sup>16,17)</sup>. 三黃瀉心湯추출물을 세포에 1시간 전처리하고 나서 LPS로 30분간 자극후 세포내 단백질을 분리하여 Western blotting 방법으로 분석하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ 의 경우 LPS만을 처리했을 때 완전히 분해되어 밴드에 나타나지 않았으나 三黃瀉心湯을 처

리한 세포에서는 농도의존적으로 I $\kappa$ B $\alpha$  단백질이 확인되어 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 억제되었음을 알 수 있었다 (Figure 4). MAP kinase의 활성은 인산화된 형태로 나타나는데 三黃瀉心湯은 p38을 농도의존적으로 억제하되 JNK의 경우 저농도에서 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 ERK의 인산화에는 영향을 주지 않았다(Figure 4). 이를 통해 三黃瀉心湯에 들어있는 다양한 성분들이 각각의 MAP kinase에 영향을 주는 것으로 보인다.

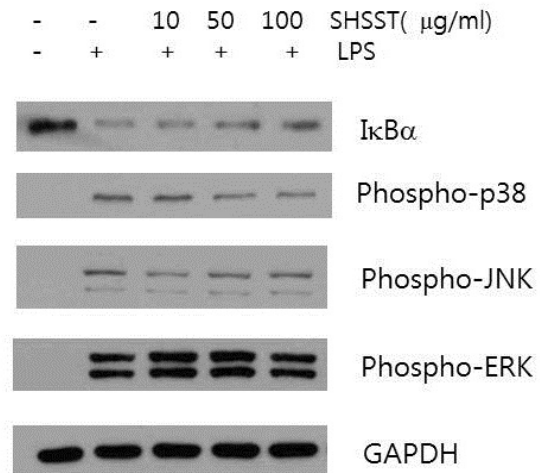


Figure 4. Effect of SHSST on LPS-stimulated I $\kappa$ B $\alpha$ , p38, JNK and ERK activation. Peritoneal macrophages were pretreated with SHSST for 1 h and then stimulated with LPS (100 ng/ml) for 30 min. The whole protein was extracted and analyzed by Western blotting. GAPDH was used as internal control. One of three independent assays was shown.

## 고찰

대식세포는 세포막의 여러 가지 다양한 수용체를 통해 조직으로 들어온 이물질과 수명이 다한 세포를 포획하여 제거함으로써 면역반응과 조직대사 산물의 제거에 중요한 역할을 한다<sup>6)</sup>. 이러한 수용체는 미생물과 자가 조직에서 유래한 물질을 모두 인식하며 원인이 어디에서 오든지 대식세포의 염증성 반응을 촉진할 수 있다.

염증반응을 일으키는 세포내 신호전달경로는 대부분 NF- $\kappa$ B 단백질에 의한 것과 MAP kinase를 경유한다. 염증성 신호전달을 일으키는 수용체로 알려진 대표적인 단백질은 Toll-like receptor(TLR)s가 있으며 이중 LPS는 TLR4 수용체를 통해 NF- $\kappa$ B와 MAP kinase를 활성화함으로써 TNF- $\alpha$  발현을 유도한다. TNF- $\alpha$ 는 국소적으로 많이 존재할 경우 혈관내피세포의 활성화, 백혈구 이동, 혈소판응집을 일으켜 미생물이 주위 조직으로 퍼지는 것을 막아준다<sup>18)</sup>. 그러나 전신의 대식세포를 자극하게 되면 뇌의 시상하부에 있는 체온 조절중추센터를 자극하여 체온을 올리고 간의 acute phase proteins 분비를 자극하며 골수의 백혈구 생산을 늘린다. TNF- $\alpha$ 의 혈액내 농도가 더 높아지면 혈압이 떨어지고 전신의 혈관내 응고가 일어나 여러 장기에 혈액공급이 원활하지 못해 허혈상태에 빠지는 패혈증이 일어난다.

본 연구의 동물실험에서 三黃瀉心湯은 10mg/kg과 같은 낮은 농도에서도 LPS에 의한 전신성 자극에 대해 혈액내

TNF- $\alpha$  농도를 억제하였다. 또한 200 mg/kg 범위안에서는 농도의존적인 억제가 아니었으며 모두 비슷한 억제율을 보여주었다. 추측컨대 三黃瀉心湯 추출물에 함유된 소염 성분이 다량으로 존재하는 것으로 보이며 위장관 흡수나 표적 세포안으로 전달되는 경로에서 포화상태에 도달한 것으로 사료된다.

세포수준에서 三黃瀉心湯 추출물은 MTT 방법에서는 세포 독성을 띠는 것으로 나타났으며 세포사멸의 구체적인 상태를 유세포분석으로 확인한 결과 오히려 三黃瀉心湯은 농도의존적으로 세포괴사를 억제하고 apoptosis를 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 apoptosis의 증가가 대사에 관여하는 효소의 활성을 측정하는 MTT 방법으로는 구분되지 않았던 것으로 보인다. 三黃瀉心湯 물추출물을 심근세포인 H9c2 cell line에 처리한 후 허혈/재관류와 같은 자극을 가했을 때 MTT 방법에 의한 감소는 일어나지 않았으나 apoptosis는 억제되었다는 보고가 있다<sup>19)</sup>. 이러한 차이는 아마도 본 연구에 사용된 추출용매가 30% 에탄올이기 때문에 지용성 성분이 물추출법에 비해 더 많이 존재하여 세포안으로 더 많이 작용해서 세포독성을 띠었을 가능성과 아울러 본 연구에 사용된 실험조건은 허혈과 같은 강력한 스트레스를 유발하지 않았기 때문일 것이다. 특히 세포괴사와 달리 apoptosis에 의한 세포사멸은 주위 조직으로 염증성 물질을 유리하지 않기 때문에 三黃瀉心湯의 이러한 활성은 추후 연구가 필요하다.

三黃瀉心湯의 대식세포내 염증성 신호전달분자에 대한 영향을 확인한 결과 I $\kappa$ B $\alpha$  분해와 p-38의 인산화는 농도의존적으로 감소하되 JNK의 인산화는 반대로 저농도에서만 약하게 감소하였다. 이를 보전데 다양한 성분들이 각기 다른 분자에 작용함으로써 TNF- $\alpha$  발현에 조절한다고 추측할 수 있다. 그러나 三黃瀉心湯 추출물에 함유된 대표적인 폴리페놀류 중 상당수가 위장관에서 흡수되어 간을 거치면서 대사가 되기 때문에<sup>20)</sup> 세포실험에서 얻은 결과가 실제 동물실험에서 나타나는 세포내 효과와 같은 농도범위라고 보기는 어려울 것이다. 다른 연구팀이 사용한 三黃瀉心湯 물추출의 경우 정맥주사를 실시하였는데 약리효과를 보여준 농도범위가 10-30 mg/kg이었다<sup>8,9)</sup>. 본 실험의 경구투여에서 효과를 보인 가장 낮은 농도는 10 mg/kg이었으므로 위장관과 간을 통과한 후에 혈액으로 들어간 유효성분의 농도간에 차이가 날 것이며 세포에 직접적으로 작용한 성분이 같지 않을 것이다.

요약하건데 三黃瀉心湯 경구투여는 LPS에 대한 전신성 염증반응을 보호하는 효능이 있으며 대식세포에 직접 처리하였을 때는 세포보호를 하면서도 세포대사를 저하하고 I $\kappa$ B $\alpha$  분해와 p38, JNK 활성을 감소시켜 TNF- $\alpha$  발현을 억제하는 것으로 확인되었다.

## 결론

30% 에탄올주정으로 추출한 三黃瀉心湯을 이용하여 염증반응에 대한 보호 효과와 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 규명하였으며 다음과 같은 결론을 확인하였다.

1. 일주일간 三黃瀉心湯을 경구투여한 후 LPS에 대한 전신 자극에 대해 혈액내 TNF- $\alpha$  수치가 감소하였다.

2. 三黃瀉心湯 추출물을 마우스 복강대식세포에 직접 처리했을 때 세포괴사를 줄여주고 apoptosis를 증가하였다.

3. 三黃瀉心湯 추출물은 TNF- $\alpha$  발현에 중요한 NF- $\kappa$ B와 p38, JNK 활성을 저해하는 효능이 있다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업(B110081)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Kim JB. A treatise on Essential prescriptions of the Golden coffer (Gum-Gye-Yo-Rak-Byun-Suk). Hanyunmoonhwasu, 2003 : 449-50.
- Lin WC, Tan TW. The role of gastric muscle relaxation in cytoprotection induced by san-huang-xie-xin-tang in rats. *J Ethnopharmacol*, 1994 ; 44(3) : 171-9.
- Chung MH, Han SK. Effect of composite preparation of crude drugs on experimentally induced hyperlipidemia in rats - Sam Whang Sasim Tang and Whang Ryun Haedok Tang. *Kor J Pharmacogn*, 1996 ; 27(4) : 397-407.
- Onat A. Metabolic syndrome: nature, therapeutic solutions and options. *Expert Opin Pharmacother*, 2011 ; 12(12) : 1887-990.
- Lundberg AM, Hanson GK. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clinical Immunol*, 2010 ; 134 : 5-24.
- Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*, 2007 ; 37 : S9-S17.
- Kim EJ, Kim HY, Lee JY, Lee JK, Kim SJ, Choi KM, Kang DA. Effect of Samhwangsasim-tang, Samigangap-tang and Bangtan-tang on blood pressure in strok prone spontaneously hypertensive rats. *Korean J Herbol*, 2011 ; 26(1) : 75-80.
- Kim JB, Kwon OK, Son CW, Shin HM. Vasodilatory effects of Samhwangsasim-tang on vascular smooth muscle. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*, 2004 ; 8(5) : 1382-6.
- Lo YC, Tsai PL, Huang YB, Shen KP, Tsai YH, Wu YC, Lai YH, Chen IJ. San-Huang-Xie-Xin-Tang reduces lipopolysaccharide-induced hypotension and inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol*, 2005 ; 96(1-2) : 99-106.
- Lo YC, Lin YL, Yu KL, Lai YH, Wu YC, Ann LM, Chen IJ. San-Huang-Xie-Xin-Tang attenuates inflammatory responses in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. *J Ethnopharmacol*, 2005 ; 101(1-3) : 68-74.
- Tsai HH, Chen IJ, Lo YC. Effects of San-Huang-Xie-Xin-Tang on U46619-induced

- increase in pulmonary arterial blood pressure. *J Ethnopharmacol*. 2008 ; 117(3) : 457–62.
12. Wang YS, Lin RT, Cheng HY, Yang SF, Chou WW, Juo SH. Anti-atherogenic effect of San-Huang-Xie-Xin-Tang, a traditional Chinese medicine, in cultured human aortic smooth muscle cells. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 133(2) : 442–7.
  13. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* (5th ed). Garland Science, 2008 : 1117.
  14. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev*. 2004 ; 18 : 2195–224.
  15. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immuno*. 2009 ; 9 : 692–703.
  16. Brook M, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. Regulation of tumour necrosis factor  $\alpha$  mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett*. 2000 ; 483 : 57–61.
  17. Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) translation: Glucocorticoids inhibit TNF- $\alpha$  translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol*. 1997 ; 17(11) : 6274–82.
  18. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders, 2009 : 273–8.
  19. Liou SF, Hsu JH, Liang JC, Ke HJ, Chen IJ, Wu JR, Yeh JL. San-Huang-Xie-Xin Tang protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via inhibition of oxidative stress-induced apoptosis. *J Nat Med*. 2012 ; 66(2) : 311–20.
  20. Shia CS, Hou YC, Juang SH, Tsai SY, Heish PH, Ho LC, Lee Chao PD. Metabolism and pharmacokinetics of San-Huang-Xie-Xin-Tang, a polyphenol-rich Chinese medicine formula, in rats and ex-vivo antioxidant activity. *Evid Med complement Alternat Med*. 2011 ; 2011 : 721293.