

소청룡탕(小青龍湯) 물 및 에탄올 추출물의 염증 관련 질환 약리 효능에 관한 실험적 연구

전우영, 이미영, 임혜선, 신인식, 김예지, 진성은, 유새롬, 서창섭
김정훈, 하혜경, 정수진, 김은순, 신나라, 김성실, 신현규
한국한의학연구원 한약기초연구그룹

ABSTRACT

Experimental Studies on the inflammation-related diseases pharmacological effect of water and 70% ethanol extracts from Socheongnyong-tang

Woo-Young Jeon, Mee-Young Lee, Hye-Sun Lim, In-Sik Shin, Yeji Kim, Seong Eun Jin
Sae-Rom Yoo, Chang-Seob Seo, Jung-Hoon Kim, HyeKyung Ha, Soo-Jin Jeong, Ohn Soon Kim
NaRa Shin, Seong-Sil Kim, Hyeun-Kyoo Shin

Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : The present study aimed to investigate the pharmacological activity of water and ethanol (EtOH) extracts from Socheongnyong-tang (SCNT) on inflammation and its related disease.

Methods : The cells were treated with nontoxic concentrations of water and EtOH extract from SCNT in BEAS-2B, HaCaT, RAW 264.7 and 3T3-L1 cells. These cells were stimulated by tumor necrosis factor (TNF)- α , TNF- α /interferon (IFN)- γ , and lipopolysaccharide (LPS), respectively.

-
- Corresponding Author : Hyeun-Kyoo Shin
 - Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Expo-ro, Yuseung-gu, Daejeon 305-811, Republic of Korea.
 - Tel : +82-42-868-9464 Fax : +82-42-864-2120 E-mail : ssamggun85@kiom.re.kr, hkshin@kiom.re.kr
 - 접수 : 2012/ 09/ 28 수정 : 2012/ 12/ 10 채택 : 2012/ 12/ 12

3T3-L1 cells were differentiated by insulin. After incubation, supernatant were collected and biological indicator measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results : Our results indicate that the water and EtOH extract of SCNT significantly inhibited the production of regulated on activation normal T-cell expression and secreted (RANTES) by treatment of TNF- α in BEAS-2B cell, and significantly reduced the production of RANTES and macrophage-derived chemokine increased by treatment of TNF- α /IFN- γ in HaCaT cell. Moreover, those extracts significantly decreased the activity of nitric oxide and prostaglandin E₂ in LPS-induced RAW 264.7, and significantly inhibited the increased activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase and expression of leptin induced by differentiation in 3T3-L1 cell.

Conclusions : These results indicate that both water and EtOH extract of SCNT has powerful effects on inflammation and its related disease. Therefore, SCNT can be developed as a potential pharmacological agent related various diseases. Although the significant effects were observed in both SCNT water and EtOH extract, the EtOH extract was more effective on most experiments than its water extract. Taken together, these findings indicate that the SCNT EtOH extract may have more potential pharmacological agent.

Key word : Socheongnyong-tang, Asthma, Allergy, Inflammation, Obesity

1. 서 론

경제가 발전함에 따라 생활환경 및 식생활의 변화로 인하여 전 세계적으로 천식(asthma), 아토피(atopy) 및 비만(obesity) 등과 같이 만성 염증과 관련된 질병의 발병률이 급격하게 증가하고 있는 추세이다.

천식과 아토피는 가장 대표적인 알레르기성 질환으로, 만성염증성 질환이며 재발률이 매우 높은 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 또한 비만(obesity)은 지방 조직 및 간에 지질이 과다하게 축적됨으로써 발병되는 질병으로 염증 매개인자들이 활성화 되며,

비만환자의 경우 염증반응이 더욱 더 촉진 되는 것으로 알려져 있다³⁾.

소청룡탕은 한국, 일본 및 중국에서 전통적으로 사용 되어온 한약처방으로써, 주로 호흡기계 질병인 천식, 기관지염 및 알러지성 비염에 자주 사용되어져 왔다⁴⁾. 마황(Ephedrae Herba), 작약(Paeonia Radix), 오미자(Schisandrae Fructus), 반하(Pinelliae Tuber), 건강(Zingiberis Rhizoma), 계지(Cinnamomi Ramulus), 세신(Asari Radix et Rhizoma) 및 감초(Glycyrrhizae Radix et Rhizoma) 8개의 약재로 구성되어 있으며, 이러한 당제 및 각 약재에 대한 다양한 효능이 연구되고 있다. 소청룡탕은 알러지

성 친식 동물모델에 있어 T helper cell type 면역 반응을 억제하여 기도염증 및 기도과민성을 억제한다고 보고되었으며⁵⁾, oleic acid를 이용한 폐 손상 모델에 있어서도 염증반응을 완화시킨다고 보고되었다⁶⁾. 그러나, 소청룡탕과 관련된 이전 연구들은 주로 호흡기계 질환에 대한 연구로 국한되어 있으며, 염증성 질환인 아토피 및 비만 등에 대한 연구는 미비한 실정이다.

전 등⁷⁾의 실험보고에 의하면, 한약재는 70% 에탄올 추출물과 물 추출물에서의 활성성분의 분포 및 함량에 차이가 있으며, 효능에도 차이를 보인다고 하였다. 이에 본 연구에서는 소청룡탕 추출의 용매를 달리하여 용매별 추출에 따른 활성성분 분석과 효능을 평가하기 위하여, 염증 및 염증과 관련된 질환에 대한 활성을 물 추출물과 70% 에탄올 추출물을 이용하여 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 소청룡탕의 구성 한약재(Table 1)는 광명당제약(Ulsan, Korea)에서 각각 구입하였다. 구입한 한약재는 이재현 교수(Dongguk University,

Gyeongju, Korea)와 서영배 교수(Daejeon University, Daejeon, Korea) 2인의 전문가 감별 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본(2012-KE13-1~2012-KE13-8)은 한국한의약연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, phosphate-buffered saline 은 Gibco BRL(NY, USA)에서 구입하였고, Cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo(Kumamoto, Japan)을 사용하였다. 3T3-L1 differentiation Medium은 Zenbio Inc. (USA)에서 제품을 구입하여 사용하였다. Tumor necrosis factor(TNF)- α , interferon(IFN)- γ , human-regulated on activation normal T-cell expression and secreted(RANTES)/CCL5 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit, human-macrophage-derived chemokine(MDC)/CCL22 ELISA Kit 및 Mouse-Leptin ELISA kit는 R&D systems(Minneapolis, MN, USA), lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), Griess reagent는 Promega Corporation(Madison, WI, USA), prostaglandin E₂ (PGE₂) ELISA kit는 Cayman Chemical Co.(Ann Arbor, MI, USA), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity Assay kit는 TAKARA(Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

Table 1. Composition of SCNT

Latin name	Amount (g)	Company of purchase	Source
Epherdrae Herba	5.625	Kwangmyungdang	Korea
Paeoniae Radix	5.625	Kwangmyungdang	Korea
Schisandrae Fructus	5.625	Kwangmyungdang	Korea
Pinelliae Tuber	5.625	Kwangmyungdang	Korea
Zingiberis Rhizoma	3.75	Kwangmyungdang	Korea
Cinnamomi Ramulus	3.75	Kwangmyungdang	Korea
Asari Radix et Rhizoma	3.75	Kwangmyungdang	Korea
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	3.75	Kwangmyungdang	Korea
Total	37.5		

2. 시 약

표준물질인 coumarin과 cinnamic acid는 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, albiflorin, paeoniflorin, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 schizandrin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 또한 liquiritin은 NPC BioTechnology Inc.(Daejeon, Korea)로부터 구입하였다. HPLC를 이용하여 측정된 각 표준물질의 순도는 모두 98.0% 이상이었다. 시료전처리 및 HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile, ethanol 및 물은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, acetic acid는 특급시약으로 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

3. 표준액 및 검액의 조제

8종의 표준품인 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizin

및 schizandrin (Fig. 1) 등에 대한 표준용액은 메탄올을 이용하여 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다. 검량선은 albiflorin과 liquiritin 0.78-100.00 µg/mL, paeoniflorin 1.56-200.00 µg/mL 및 coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 schizandrin은 0.39 -50.00 µg/mL의 농도범위에서 표준용액을 이용하여 작성하였다.

소청롱탕 추출물은 Table 1과 같이 구성한약재를 무게 비율로 배합하여 물과 70% 에탄올을 시료의 10배(각각 375 mL)로 각각 첨가하여 2시간 전탕 한 후 동결건조 하여 물 추출물 9.7 g(수율 25.9%)과 에탄올 추출물 6.9 g(수율 18.4%)을 얻었다. HPLC 분석을 위하여 물과 에탄올 추출물에 대하여 각각 200 mg을 정확히 측정된 후 물을 넣어 20 mL로 맞춘 후 0.2 µm membrane 여과 (Woongki Science, Seoul, Korea) 후 검액으로 하였다.

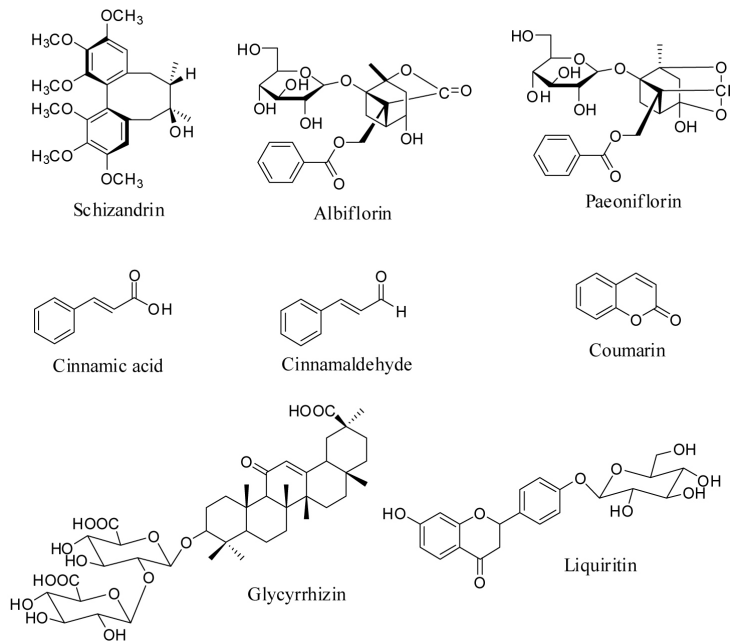


Fig. 1. Chemical structures of eight constituents in Socheongnyong-tang.

4. HPLC 분석

소청룡탕 내 주요성분인 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 schizandrin의 함량을 분석하기 위하여 Shimadzu사의 LC-20A 시스템을 사용하여 측정하였다. HPLC는 LC-20A 시스템(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)은 pump(LC-20AT), on-line degasser(DGU-20A₃), column oven(CTO-20A), auto sampler(SIL-20AC) 및 PDA detector(SPD-M20A)로 구성되어 있다. 분석 data는 LC solution software(Version 1.24)를 이용하여 처리하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Gminin C₁₈(5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘러주었으며 주입량은 10 μ L였다. 이동상은 A(1.0% acetic acid가 함유된 물)와 B(1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile)를 사용하여 기울기 용매조건((A)/(B) = 85/15 (0 min) \rightarrow (A)/(B) = 35/65 (35 min) \rightarrow (A)/(B) = 0/100 (45 min, hold for 5 min) \rightarrow (A)/(B) = 85/15 (55 min, hold for 15 min))으로 흘러주었으며, 검출파장은 230 nm(albiflorin과 paeoniflorin), 254 nm(glycyrrhizin과 schizandrin) 및 280 nm(liquiritin, coumarin, cinnamic acid 및 cinnamaldehyde)에서 검출하였다.

5. 세포 배양

BEAS-2B(human bronchial epithelial cell line), RAW 264.7(Mouse Macrophage cell line) 세포주와 3T3-L1, 마우스 유래 지방 전구 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)으로부터 분양 받아 사용하였고, HaCaT(human keratinocyte cell line) 세포주는 세종대학교 이나경 교수님(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. BEAS-2B 세포주와 HaCaT 세포주는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin을 첨가하였고, RAW 264.7(Mouse Macrophage cell line)

세포주는 5.5% FBS가 포함된 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin을 첨가하였으며, 3T3-L1 세포주는 10% new born calf serum(NCS)가 포함된 DMEM 배지로, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 비만세포로서의 분화를 유도하기 위해 지방 전구 세포가 100% confluence 하게 되면 이로부터 2일 후에 분화 유도물질인 5 μ g/mL insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 가 포함된 3T3-L1 differentiation medium을 2일 동안 처리하였고, 다시 10% FBS와 1 μ g/mL insulin을 포함한 DMEM으로 2일간 배양하였다. 분화 유도 4일째부터는 10% FBS가 포함된 DMEM으로 교환하며 2일에 한 번씩 세포를 분화시켰다.

6. 세포독성 평가

BEAS-2B(6 \times 10³ cells/well), HaCaT(1 \times 10³ cells/well), RAW 264.7(3 \times 10³ cells/well)세포는 96 well plate에서 18시간 배양한 후에 추출용매별 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였고, 3T3-L1(5 \times 10⁴ cells/well) 세포는 8일간 분화를 유도하면서 추출용매별 시료를 농도별로 처리하였다. 이어서 CCK-8 용액 10 μ L를 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 microplate reader(Benchmark Plus, Bio-Rad, MN, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 상대적인 세포 생존율(% of control)을 계산하였다. 이후의 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도를 기준으로 진행하였다.

7. BEAS-2B 세포에서 RANTES 분비량 측정

BEAS-2B(3 \times 10⁴ cells/well) 세포를 48 well plate에 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 18시간 배양한 후, 배지를 제거하여 serum-free DMEM으로 1회 세척한 후에 배지를 교체하고, 추출용매별 시료와 TNF- α (10 ng/mL)를 동시에 처리하여 24시

간 동안 배양하였다. ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상등액 내에 존재하는 RANTES의 분비량을 측정하였다.

8. HaCaT 세포에서 RANTES 및 MDC 분비량 측정

HaCaT(1×10^6 cells/well) 세포를 6 well plate에 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 18 시간 배양한 후, 배지를 제거하여 serum-free DMEM으로 1회 세척한 후에 배지로 교체하고, 추출용매별 시료와 TNF- α 와 IFN- γ (각각 10 ng/mL)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상등액 내에 존재하는 RANTES 및 MDC의 분비량을 측정하였다.

9. RAW 264.7 세포에서 NO(nitric oxide) 및 PGE₂분비량 측정

RAW 264.7(2.5×10^5 cells/well) 세포를 48 well plate에 5.5 % FBS가 포함된 DMEM 배지에 18 시간 배양한 후, 추출용매별 시료와 LPS(1 μ g/mL)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각각, Griess reagent와 ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상등액 내에 존재하는 NO 및 PGE₂의 분비량을 측정하였다.

10. 3T3-L1 세포에서 GPDH 활성 및 leptin 분비량 측정

3T3-L1(1×10^5 cells/well) 세포를 48 well plate에 10% NCS가 포함된 DMEM 배지에 8일간 분화를 유도하면서, 추출용매별 시료를 처리하였다. 분화

유도 후, ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상등액 내에 존재하는 leptin의 분비량을 측정하였고, 상등액을 수거한 세포는 assay kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 GPDH의 활성을 측정하였다.

11. 통계처리

모든 실험값은 Mean \pm S.E.M.으로 표시하였다. 실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA 검정을 적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test를 이용하여 *P*-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 분석조건의 확립

소청룡탕의 구성 약재 중 작약의 주요성분인 albiflorin과 paeoniflorin, 계지의 주요성분인 coumarin, cinnamic acid 및 cinnamaldehyde, 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin 및 오미자의 주요성분인 schizandrin을 분석 대상으로 1.0% acetic acid가 함유된 물과 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile을 기울기 용매 조건으로 하여 35분 이내에 분리하였다. PDA 검출 파장은 230 nm, 254 nm 및 280 nm에서 각각 검출하였다. 검액에서의 peak는 주요 성분 peak의 retention time과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였으며, 8종의 성분은 8.77, 9.64, 11.55, 17.60, 20.52, 23.12, 30.98 및 31.45분에 각각 검출되었다(Fig. 2).

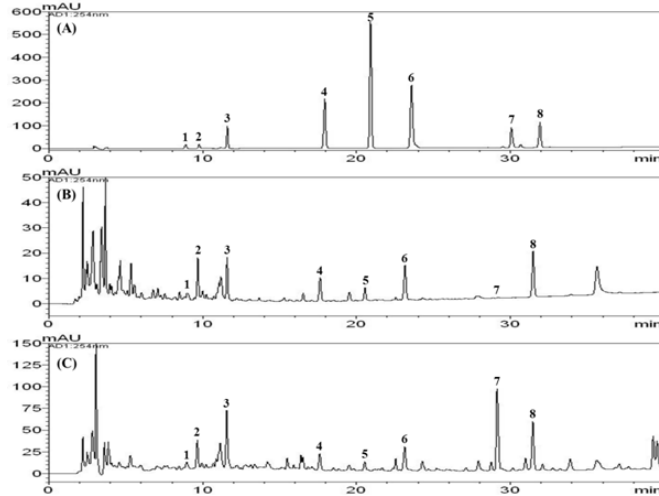


Fig. 2. HPLC chromatogram of a standard mixture (A), water extract (B), and EtOH extract (C). Albiflorin (1), paeoniflorin (2), liquiritin (3), coumarin (4), cinnamic acid (5), cinnamaldehyde (6), glycyrrhizin (7), and schizandrin (8).

2. 함량분석

소청룡탕의 함량분석을 위한 표준용액의 검량선은 Table 2와 같으며 8종 성분의 상관계수가 0.9995 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 6종 성분의 피크 면적과 머무름 시간에 대한 재현성은 모두 상대표준편차가 1.00%와 0.05% 이내로 양호한 재현성을 나타내었다. 검량선과 재현성 결과는 Table 2에 나타내었다.

이상과 같이 확립된 소청룡탕의 물과 에탄올

추출물을 HPLC-PDA를 이용하여 동시분석을 실시하고 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 schizandrin 등 8종 성분에 대한 함량을 분석하였다. 함량 분석 결과 물 추출물에서 glycyrrhizin은 검출이 되지 않았으며 그 외 7종의 성분은 0.03-2.07 mg/g으로 나타났으며, 에탄올 추출물에서 8종 성분이 모두 0.05-3.18 mg/g으로 각각 나타났다(Table 3).

Table 2. Linear ranges, regression equation, LOD, LOQ, and repeatability

Component	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression equation ^a	Correlation coefficient (r^2)	Repeatability (% RSD)	
				Retention time	Peak area
Albiflorin	0.78-100.00	$Y = 11446.68x - 9521.54$	0.9998	0.05	0.05
Paeoniflorin	1.56-200.00	$Y = 11710.55x - 11754.55$	1.0000	0.05	0.60
Liquiritin	0.78-100.00	$Y = 15742x - 4464.81$	0.9999	0.04	0.86
Coumarin	0.39-50.00	$Y = 44991.78x - 4464.81$	0.9997	0.03	0.73
Cinnamic acid	0.39-50.00	$Y = 81948.89x - 14191.11$	0.9999	0.03	0.72
Cinnamaldehyde	0.39-50.00	$Y = 122613x - 20278.53$	0.9999	0.03	0.72
Glycyrrhizin	0.39-50.00	$Y = 11615.46x - 2971.52$	0.9996	0.02	0.80
Schizandrin	0.39-50.00	$Y = 17962.63x - 3512.27$	0.9995	0.02	0.57

^aY = peak area (mAU) of the components. x = concentration ($\mu\text{g/mL}$) of the components.

Table 3. Analytical results (mg/g) of the 8 compounds in SCNT

Component	Water extract			EtOH extract		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Albiflorin	0.11	0.00	0.83	0.15	0.00	0.31
Paeoniflorin	2.07	0.01	0.35	3.18	0.01	0.34
Liquiritin	0.53	0.00	0.66	1.64	0.00	0.11
Coumarin	0.12	0.00	0.09	0.22	0.00	0.18
Cinnamic acid	0.03	0.00	0.59	0.05	0.00	0.13
Cinnamaldehyde	0.12	0.00	0.48	0.18	0.00	0.78
Glycyrrhizin	ND ^a	-	-	0.24	0.00	0.16
Schizandrin	0.26	0.00	0.36	0.58	0.00	0.13

^aND : not detected

3. 소청룡탕이 BEAS-2B 세포에서 RANTES의 발현에 미치는 영향

BEAS-2B 세포에 대한 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물의 세포 독성을 확인하였다(Fig. 3A and 3B). 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 1000 µg/mL 이하의 농도에서 대조군 대비 세포 생존능력이 90% 이상으로 나타났으며, 본 실험에 적용된 독성이 없는 최고 농도를 500 µg/mL로 설정하였다.

소청룡탕의 물과 에탄올 추출물에 대한 RANTES의 발현 억제 효과를 알아보기 위해, BEAS-2B

세포에 TNF-α (10 ng/mL)를 처리하여 RANTES의 발현을 유도시켰다. 그 결과, TNF-α에 의한 RANTES의 발현은 처리하지 않은 군의 비해 69 배로 증가되는 것을 확인하였고, 증가한 RANTES의 발현은 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 모든 농도에서 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 3C). 특히, 이러한 억제 효과는 물 추출물 보다 에탄올 추출물이 모든 농도에서 90% 이상의 유의성 있는 강한 억제 효과를 나타냈다($p < 0.01$).

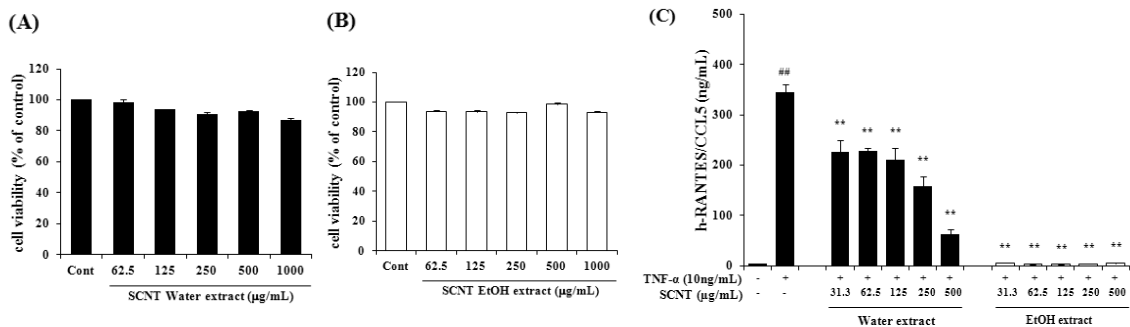


Fig. 3. Effect of SCNT water and EtOH extract in BEAS-2B cells.

Cytotoxicity were investigate to detected the cell viability on SCNT water and EtOH extract (A and B). The cell were incubated in 96 well plate at 6×10^3 cells/well. After 18h, cells were treated with various concentrations (62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) of SCNT water and EtOH extract. RANTES expression were induced by TNF-α-stimulate (C). The cell were incubated in 48 well plate at 3×10^4 cells/well. After 18h, cell were co-treated with various (31.3, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL) of SCNT extracts (Water and EtOH extract) and TNF-α (10 ng/mL). Each bar represents the mean±SEM (n=3). Significant differences at # $P < 0.01$ compared with the none treated TNF-α groups and ** $P < 0.01$ compared with the only TNF-α treated groups.

4. 소청룡탕이 HaCaT 세포에서 RANTES 및 MDC의 발현에 미치는 영향

HaCaT 세포에 대한 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하였다(Fig. 4A and 4B). 소청룡탕의 물 추출물은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서, 에탄올 추출물은 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 대조군 대비 세포 생존능력이 90% 이상으로 나타났다. 따라서, 본 실험에 적용된 독성이 없는 최고 농도를 각각 소청룡탕의 물 추출물은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 에탄올 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 설정하였다.

소청룡탕의 물과 에탄올 추출물에 대한 RANTES 및 MDC의 발현 억제 효과를 알아보기 위해, HaCaT 세포에 TNF- α 와 INF- γ 의 병행 처리하여(각각 10 ng/mL) RANTES와 MDC의 발현을 유도시켰다. 그 결과, TNF- α 와 INF- γ 의 병행 처리에 의한 RANTES

와 MDC의 발현은 처리하지 않은 군의 비해 각각 38배, 22배로 증가되는 것을 확인하였다. 이렇게, 증가한 RANTES의 발현을 소청룡탕의 물 추출물에서는 모든 농도에서 유의성 있게 농도 의존적인 감소를 나타냈고($p < 0.01$), 에탄올 추출물에서는 낮은 농도에서는 효과가 없었지만, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.01$). 반면에, 증가된 MDC의 발현은 소청룡탕의 물 추출물이 낮은 농도에서는 효과가 없었지만 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 유의미한 감소를 나타냈다(각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$). 특히, 에탄올 추출물은 모든 농도에서 MDC의 발현을 감소시켰고, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 농도 의존적으로 70% 이상의 유의성 있는 억제 효과 ($p < 0.01$)를 나타냈다(Fig. 4C and 4D).

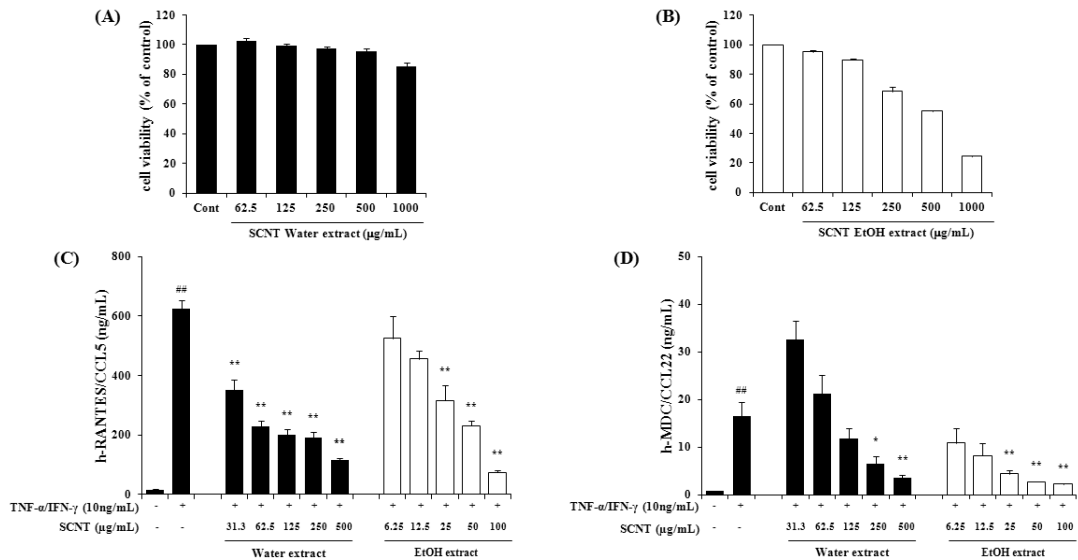


Fig. 4. Effect of SCNT water and EtOH extract in HaCaT cells.

Cytotoxicity were investigate to detected the cell viability on SCNT water and EtOH extract (A and B). The cell were incubated in 96 well plate at 1×10^5 cells/well. After 18h, cells were treated with various concentrations (62.5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of SCNT water and EtOH extract. RANTES and MDC expression were induced by TNF- α /INF- γ -stimulate (CandD). The cell were incubated in 6well plate at 1×10^6 cells/well. After 18h, cell were co-treated with various (6.25, 12.5, 25, 31.3, 50, 62.5, 100, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of SCNT extracts (water and EtOH extract) and TNF- α /INF- γ (10 ng/mL), respectively. Each bar represents the mean \pm SEM (n=3). Significant differences at $^{##} P < 0.01$ compared with the none treated TNF- α /INF- γ groups and $^{**} P < 0.01$, $^{*} P < 0.05$ compared with the only TNF- α /INF- γ treated groups.

5. 소청룡탕이 RAW 264.7 세포에서 NO 및 PGE₂의 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 대한 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물의 세포 독성을 확인하였다(Fig. 5A and 5B). 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 1000 µg/mL 이하의 농도에서 대조군 대비 세포 생존능력이 90% 이상으로 나타났으며, 이는 소청룡탕이 1000 µg/mL까지의 농도에서는 독성이 없음을 확인하였다. 또한, 에탄올 추출물은 모든 농도에서 세포 생존능력이 증가한 것으로 보아 세포증식 효과가 있는 것으로 판단되었다. 따라서 본 실험에 적용된 독성이 없는 최고 농도를 1000 µg/mL로 설정하였다.

소청룡탕의 물과 에탄올 추출물에 대한 NO 및 PGE₂의 발현 억제 효과를 알아보기 위해, RAW 264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 NO와 PGE₂의 발현을 유도시켰다. 그 결과, LPS에 의한 NO와 PGE₂의 발현은 처리하지 않은 군에 비해 각각 26

배, 19배로 증가되는 것을 확인하였다. 이렇게, 증가한 NO의 발현을 소청룡탕의 물 추출물에서는 최고 농도와 최저 농도를 제외한 중간의 농도에서 유의성이 있는 감소를 나타냈는데($p < 0.01$), 이는 소청룡탕 물 추출물의 250 µg/mL 농도가 NO의 생성을 억제하는 최대 효능 농도로 보여진다. 에탄올 추출물에서는 최고 낮은 농도를 제외한 나머지 모든 농도에서는 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 나타냈으며, 특히 1000 µg/mL 농도에서는 40% 이상의 유의성 있는 억제 효과를 나타냈다($p < 0.01$). 또한, 증가한 PGE₂의 발현은 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 모든 농도에서 유의성이 있는 감소를 나타냈으며($p < 0.01$), 특히, 이러한 억제 효과는 물 추출물 보다 에탄올 추출물의 250 µg/mL 이상의 농도에서 90% 이상의 유의성 있는 강한 억제 효과를 나타냈다(Fig. 5C and 5D).

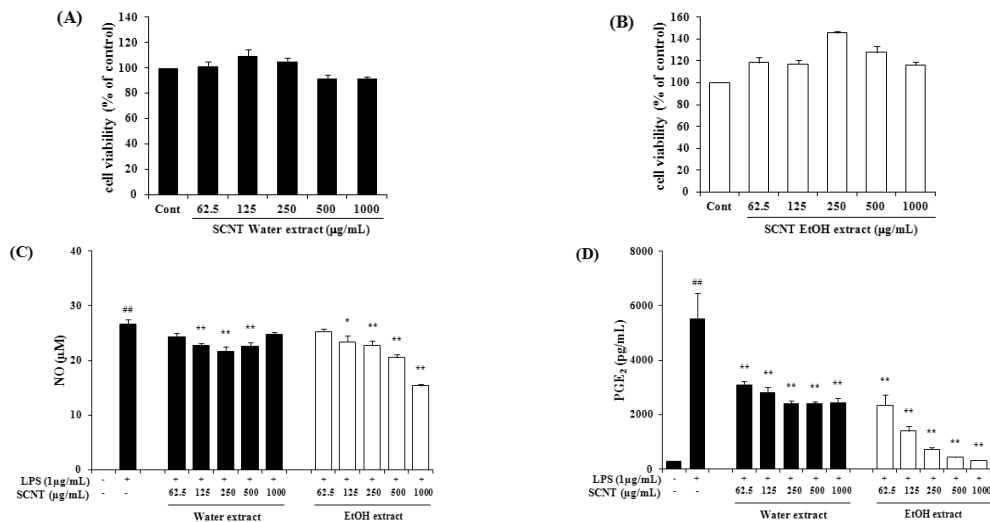


Fig. 5. Effect of SCNT water and EtOH extract in RAW 264.7 cells.

Cytotoxicity were investigate to detected the cell viability on SCNT water and EtOH extract (A and B). The cell were incubated in 96 well plate at 3×10^3 cells/well. After 18h, cells were treated with various concentrations (6.25, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) of SCNT water and EtOH extract. NO and PGE₂ expression were induced by LPS-stimulate (C and D). The cell were incubated in 48 well plate at 2.5×10^5 cells/well. After 18h, cell were co-treated with various (62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) of SCNT extracts (Water and EtOH extract) and LPS (1 µg/mL). Each bar represents the mean±SEM (n=3). Significant differences at # $P < 0.01$ compared with the none treated LPS groups and ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared with the only LPS treated groups.

6. 소청룡탕이 3T3-L1 세포에서 GPDH의 활성화 및 leptin의 발현에 미치는 영향

3T3-L1 세포 대한 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하였다(Fig. 6A and 6B). 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 대조군 대비 세포 생존능력이 90% 이상으로 나타났으며, 이는 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물이 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 농도에서는 독성이 없음을 확인하였다. 따라서 본 실험에 적용된 독성이 없는 최고 농도를 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 설정하였다.

소청룡탕의 물과 에탄올 추출물에 대한 GPDH의 활성화 및 leptin의 발현 억제 효과를 알아보기 위해, 3T3-L1 세포를 분화시켜 GPDH의 활성화와 leptin의 발현을 유도시켰다. 그 결과, 분화유도에 의한 GPDH의 활성화와 leptin의 발현은 유도하지 않은 군에 비

해 각각 9배, 2.5배로 증가되는 것을 확인하였다. 이렇게 증가한 GPDH의 발현을 물 추출물에서는 모든 농도에서 유의성이 있는 감소를 나타냈으며 ($p < 0.01$), 에탄올 추출물에서도 마찬가지로 모든 농도에서 유의성 있는 감소를 나타냈지만 ($p < 0.01$), 최고 농도에서 다시 증가한 것을 미루어보면 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도가 증가한 GPDH의 활성을 70% 이상 억제함으로써 최대 효능 농도로 보여진다. Leptin의 발현은 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 모든 농도에서 유의미한 농도 의존적인 억제 효과를 보여 주었다($p < 0.01$). 특히, 이러한 억제 이러한 억제 효과는 물 추출물 보다 에탄올 추출물의 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 80% 이상의 유의성 있는 강한 억제 효과를 나타냈다(Fig. 6C and 6D).

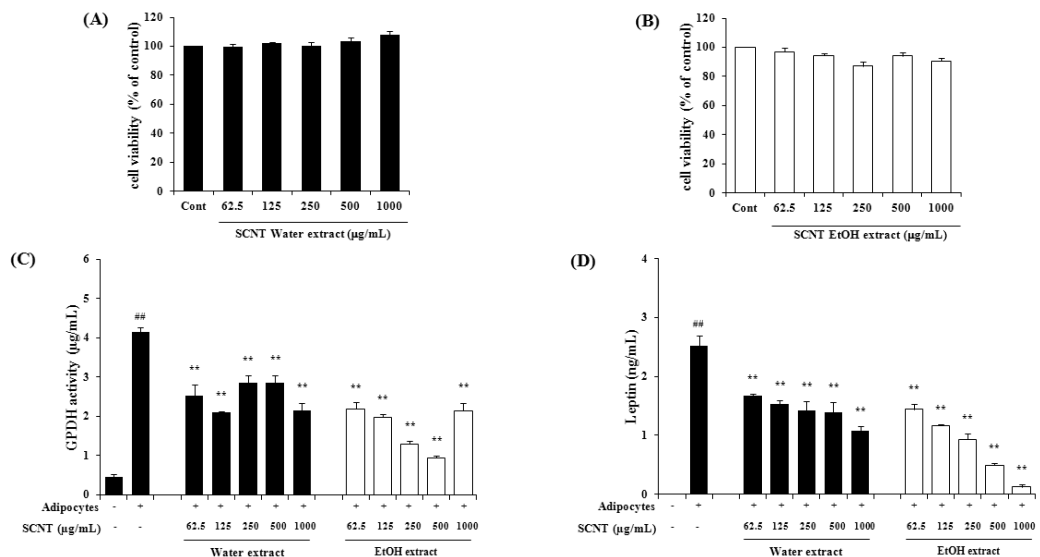


Fig. 6. Effect of SCNT water and EtOH extract in 3T3-L1 cells.

Cytotoxicity were investigate to detected the cell viability on SCNT water and EtOH extract (A and B). The cell were incubated in 96 well plate at 5×10^4 cells/well. During the differentiation induction, cells were treated with various concentrations (6.25, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of a water and EtOH extract. GPDH Activity and leptin expression were induced by cell differentiation (C and D). The cell were incubated in 48 well plate at 1×10^5 cells/well. After the differentiation induction, cell were treated with various (62.5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of SCNT extracts (water and EtOH extract). Each bar represents the mean \pm SEM (n=3). Significant differences at $^{\#} P < 0.01$ compared with the undifferentiation groups and $^{**} P < 0.01$ compared with the only differentiation.

IV. 고 찰

최근 의약품의 연구동향은 많은 부작용이나 내성이 등으로 인해 심각한 문제를 야기하고 있으므로, 세계적으로 천연물인 한약제제로부터 유래한 생리활성물질에 관한 연구가 활발히 추진되고 있다. 한약제제의 다양한 생리활성 작용은 이미 많은 보고를 통해 입증되었다^{8,9)}.

소청룡탕은 8종의 한약재로 구성되어 있는 한약처방으로, 최근 연구에서는 동물 모델을 사용하여 항염증 작용¹⁰⁾ 및 Th2 관련 사이토카인의 분비를 억제한다고 보고 되어있다¹¹⁾. 소청룡탕을 구성하는 마황¹²⁾, 작약¹³⁾, 세신 추출물은 항염증의 효과¹⁴⁾가 있다고 보고되었고, 오미자와¹⁵⁾ 건강은 항산화의 효과¹⁶⁾, 반하는 항천식의 효과¹⁷⁾, 감초는 항알러지의 효과¹⁸⁾ 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 또한, 구성약재들의 주요성분인 Albiflorin과 paeoniflorin은 골수이상에 대한 치료 효과¹⁹⁾, liquiritin의 신경보호작용²⁰⁾, coumarin의 항염증 효과²¹⁾, cinnamicacid²²⁾과 schizandrin의 항산화 작용²³⁾, cinnamaldehyde의 PGE₂ 생성 억제 효과²⁴⁾, glycyrrhizin의 면역조절작용²⁵⁾을 가진다는 보고를 통하여, 소청룡탕은 염증과 관련된 질환에서 이로운 효과를 가질 것이라고 기대했다. 하지만 소청룡탕 추출물과 이를 구성하는 약재 및 주요 성분에 대한 약리적 활성 효과에 대해서는 이미 보고 되어 있지만, 소청룡탕의 용매별 추출물에 따른 성분 함량 및 약리 효능을 비교한 연구는 발표된 바 없었다. 따라서 본 연구에서는 소청룡탕을 선정하여, 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물의 구성약재에 대한 주요 성분을 동시분석하고, 염증과 관련된 다양한 질환 모델에서 나타나는 약리적 효능의 차이를 관찰하였다. 동시분석결과, 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 모든 성분들의 함량이 높게 추출되어 나옴을 알 수 있었다. 이는 약리학적 효능에 있어서 물 추출물보다 에탄올 추

출의 효능이 더 강하게 나타날 것이라고 판단되었다.

염증 반응은 외부 자극에 대한 생체 조직의 방어와 치유에 핵심적인 역할을 할 뿐만 아니라 많은 질병의 병리 발상에 관련되어 있는 중요한 과정이다. 염증 반응의 궁극적인 목적은 손상 원인을 제거하여 조직 손상을 국소화 시킴으로써 본래의 상태로 수복하거나 재생하려는 기전이다²⁶⁾. 하지만 염증반응이 만성으로 발전하게 되면 반대로 조직의 손상을 촉진하여 인체의 여러 장기에 해로운 영향을 주게 된다. RANTES는 염증 반응을 하도록 촉진하는 proinflammatory 케모카인으로 T 세포, 단핵구, 수지상세포, 자연살해세포(natural killer cells), 호산구와 호염구에서 화학 주성의 활성을 매개하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 또한 기도 상피세포가 자극 되었을 때 분비되어, 호산구의 이동, eosinophil cationic protein(ECP)의 배출 및 반응성 산소계(reactive oxygen species)의 생산 유도를 일으키고, 후기 천식 반응에서 호산구의 보충과 관련되어 있다²⁸⁾. Homma 등²⁹⁾은 RANTES/CCL5의 과발현이 천식을 포함한 기도 염증의 발병에 관여할 수 있다고 보고 하였다. 따라서 기관지 상피세포로부터 호산구와 관련된 RANTES의 발현에 대한 조절은 천식성 질환에 대한 치료 수단이 될 수 있다. 우리의 결과는 BEAS-2B 세포에서 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 TNF- α 에 유도되어 증가한 RANTES의 발현 억제 조절을 통해 항천식 효과를 나타낸다고 보여주었다. 특히, 이러한 억제 효과는 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 크게 나타냄으로써, 물 추출물보다 에탄올 추출물이 항천식 효과에 있어서 더 강한 영향력을 끼칠 것이라고 사료된다.

MDC는 Th2 사이토카인을 생산하는 세포를 선택적으로 유도하는 강한 화학주성인자로, 아토피성 피부염과 같은 질병에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다³⁰⁾. 이전 보고에 따르면, HaCaT 세포에서, TNF- α 와 INF- γ 의 병행 처리로 인해 앞

에서 언급한 RANTES와 MDC의 발현이 증가한다고 보고되었다³¹⁾. 이전의 연구에서 인간 각질형성 세포로부터 TNF- α 와 TNF- α /INF- γ 로 자극시켰을 때, RANTES와 MDC/CCL22와 같은 chemokines의 발현이 비정상적으로 방출되며, 이 chemokines들은 아토피성 피부염과 같은 알레르기 질환의 발병에서 핵심적인 역할을 한다고 보고하였다³²⁾. 이처럼, RANTES를 비롯한 MDC와 같은 chemokines의 발현을 억제함으로써 아토피성 피부염과 같은 질환에 치유 효과를 줄 수 있다. 우리의 결과는 HaCaT 세포에서 소청룡탕의 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 TNF- α 와 INF- γ 의 병행 처리로 증가한 RANTES와 MDC의 증가한 발현을 억제시킴으로써 항아토피 작용이 있을 것으로 사료되었다. 또한, 에탄올 추출물은 물 추출물보다 MDC의 발현을 강하게 억제 하는 것으로 보아, 아토피성 피부염에 관련된 질병에서 더 뛰어난 효과를 보여줄 것이라고 사료된다.

염증반응의 지표물질인 NO는 LPS 또는 염증성 사이토카인 등에 의해 발현이 유도되며 과다한 NO 생산은 염증 반응을 더욱 심화시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 일으킨다³²⁾. PGE₂는 염증반응에 깊이 관여하며, 종양의 세포 사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다³³⁾. 신 등³⁴⁾은 LPS와 같은 외부자극으로부터 증가되는 염증 매개체인, NO, PGE₂의 발현을 억제함으로써 항염증 효과가 있다고 입증하였다. 우리의 연구 결과는 RAW 264.7 세포에서 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물이 LPS에 의해 증가한 염증반응과 관계된 NO와 PGE₂의 발현을 억제하는 효과를 통해서 항염증 작용을 나타냄을 보여주었다. NO와 PGE₂의 발현에 대한 억제 능력을 비교해보면, 물 추출물 보다는 에탄올 추출물이 더 강하게 나타내는 것을 통해, 에탄올 추출물이 항염증 작용에 더 탁월한 효과를 가질 것이라고 사료된다.

비만인 상태의 조직에는 대식세포가 많이 침윤

함으로써, 지방조직 세포내의 염증매개체들을 분비하고 지방전구세포(pre-adipocytes)들의 증식을 유도하여, 지방세포로의 분화를 촉진한다³⁵⁾. 지방세포의 분화에 대한 탐침자로 사용된 GPDH는 지질 생합성에서 주요한 역할을 하며³⁶⁾, 3T3-L1세포가 지방세포로 전환되는 동안 GPDH 활성은 증가하게 된다. 혈중 leptin은 체중 및 체 지방 축적과 관련이 있으며 에너지 균형유지를 위한 뇌와 지방조직 사이의 신호전달물질로 알려져 있다³⁷⁾. 이전의 연구에서 3T3-L1 세포는 분화가 시작되면, 세포내 지방 축적이 일어나 GPDH와 leptin과 같은 효소 및 유전자의 발현이 증가하게 되는데 이를 억제함으로써 항비만 효과에 기여한다고 보고하였다³⁸⁾. 우리의 연구 결과는 3T3-L1 세포에서 분화에 의해 증가한 GPDH의 활성화와 leptin의 발현을 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물이 크게 감소시켰으며, 이는 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물이 항비만 작용을 가지고 있다고 보여진다. 특히, 물 추출물보다는 에탄올 추출물이 증가한 leptin의 발현을 억제하는데 더 강한 효과를 나타냄으로써, 항비만 효과에 더 큰 영향을 줄 것 이라고 사료된다.

이상의 실험결과로 미루어 볼 때, 에탄올 추출물이 물 추출물 보다 염증과 관련된 인자들의 생성에 더 좋은 효과를 보이지만, 에탄올 추출물이 물추출물 보다 최대 비독성 효능농도가 낮기 때문에 임상에 적용시 소청룡탕 물 추출물을 에탄올 추출물로 대체하기는 어려울 것으로 사료된다.

V. 결론

소청룡탕의 물과 에탄올 추출물을 분석한 결과, 에탄올 추출물이 물 추출물보다 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 schizandrin의 성분들의 함량이 높게 추출되었다. 소청룡탕의 물과 에탄올 추출물 모두 BEAS-2B 세포와 HaCaT 세포에서 각각

TNF- α 와 TNF- α /INF- γ 의 병행치리로 인해 자극되어 증가한 RANTES 및 MDC의 발현을 크게 억제하였다. 또한 RAW 264.7세포에서 LPS로 자극되어 증가한 NO 및 PGE₂의 생성과 3T3-L1 세포에서 분화 유도 후, 증가한 GPDH의 활성 및 leptin의 발현을 유의적으로 감소시켰다. 실험 결과로 볼 때, 물 추출물 보다 에탄올 추출물의 억제 효과가 더 강하게 나타났으며, 이는 분석결과에서 각각의 약제들의 지표 성분들의 함량이 더 높게 나왔던 것과 관계가 있는 것으로 사료된다. 따라서, 소청룡탕의 에탄올 추출물이 물 추출물보다 염증과 관련된 각종 질환에 치료 효능이 더 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준화방치방EBM구축사업 (K12031)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee SI, Shin MH, Lee HB, Lee JS, Son BK, Koh YY, Kim KE, Ahn YO. Prevalences of symptoms of asthma and other allergic diseases in Korean children: a nationwide questionnaire survey. *J Korean Med Sci.* 2001;16(2):155-64.
2. Heinzmann A, Daser A. Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(3):170-80.
3. Kim MS. Inflammation in obesity-induced metabolic disease. *Bulletin of Food Technology.* 2010;23(1):28-39.
4. Amagaya S, Iizuka A, Makino B, Kubo M, Komatsu Y, Cheng FC, Ruo TI, Itoh T, Terasawa K. General pharmacological properties of Sho-seiryu-to (TJ-19) extracts. *Phytomedicine.* 2001;8(5):338-47.
5. Ko E, Rho S, Cho C, Choi H, Ko S, Lee Y, Hong MC, Shin MK, Jung SG, Bae H. So-Cheong-Ryong-Tang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(5):739-43.
6. Yang CQ, Ishitsuka Y, Moriuchi H, Golbidi S, Jin ZJ, Irikura M, Irie T. Protection afforded by a herbal medicine, Sho-seiryu-to (TJ-19), against oleic acid-induced acute lung injury in guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(7):925-32.
7. Jeon WK, Yoo BK, Kim YE, Park SO, Park SM, KO BS. Effect of extracts for herbal medicines on the inhibition of whole blood aggregation. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2007;50(4):352-7.
8. Ohtake N, Nakai Y, Yamamoto M, Ishige A, Sasaki H, Fukuda K, Hayashi S, Hayakawa S. The herbal medicine Shosaiko-to exerts different modulating effects on lung local immune responses among mouse strains. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(2-3):357-66.
9. Lee SY, Kim HW, Kim GY, Choi CH, Yun YC, Jeong HW. Protective Effects and Anti-oxidative effects of Sipjeon-Daebo-Tang and Gami-Sipjeon-Daebo-Tang in C6 glioma cell. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2009;23(6):1292-8.
10. Nagai T, Nakao M, Shimizu Y, Kodera Y, Oh-Ishi M, Maeda T, Yamada H. Proteomic Analysis of Anti-inflammatory Effects of a Kampo (Japanese Herbal) Medicine "Shoseiryuto (Xiao-Qing-Long-Tang)" on Airway Inflammation in a Mouse Model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:604196.

11. Ko E, Rho S, Cho C, Choi H, Ko S, Lee Y, Hong MC, Shin MK, Jung SG, Bae H. So-Cheong-Ryong-Tang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(5):739-43.
12. Lee E. Effect of Ephedrae Herba on Immunomodulatory Activity in Lipopolysaccharide-Exposed Rats and Raw 264.7 Cells. *Korean J Plant Res.* 2009;22(5):431-7.
13. Im DY, Lee KI. Nitric Oxide Production Inhibitory Effect and Antibacterial Activity of the Extract and Fractions from Paeoniae Radix. *Kor J Pharmacogn.* 2012;43(2):173-8.
14. Jung WS, Yoo HM, Seo SW, Cho JK, Son JW, Park MC, Choi CM, Yeom SR, Hwang SW, Kim YW, Song DS, Chae YS, Park SJ, Shin MK, Song HJ. Anti-inflammatory effect of extract of *Asarum sieboldii* in LPS-stimulated Murine peritoneal macrophage. *Kor. J. Herbology.* 2006;21(2):189-95.
15. Jeon YH, Kil JH, Lim SM, Kim MH, Kim MR. Analysis of antioxidative activity and Antimutagenic Effect of Ethanol Extract from *Schizandra chinensis* Baillon. *J East Asian Soc Dietary Life.* 2008;18(5):746-52.
16. Jeong GS, Li Bin, Lee DS, Choi HG, Kim YC. Neuroprotective effects of the extract of zingiberis Rhizoma. *Kor J Pharmacogn.* 2010;41(3):190-5.
17. Jeong DH, Kim JH, Park SY, Choi JH. Effects of *Pinelliae Rizoma* (PR) on asthma induced intra-nasal instillation of ovalbumin in mice. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* 2008;21(1):38-54.
18. Kim JM, KIM DJ, Kim TH, Baek JM, Kim HS, Choe M. Effects of Water Extract of *Glycyrrhiza uralensis* on β -Hexosaminidase Release and Expression of the Cytokines of RBL-2H3 Mast Cells. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2010;18(4):231-7.
19. Xu W, Zhou L, Ma X, Chen Y, Qin B, Zhai X, You S. Therapeutic effects of combination of paeoniflorin and albiflorin from *Paeonia radix* on radiation and chemotherapy-induced myelosuppression in mice and rabbits. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(8):2031-7.
20. Sun YX, Tang Y, Wu AL, Liu T, Dai XL, Zheng QS, Wang ZB. Neuroprotective effect of liquiritin against focal cerebral ischemia/reperfusion in mice via its antioxidant and antiapoptosis properties. *J Asian Nat Prod Res.* 2010;12(12):1051-60.
21. Selim YA, Ouf NH. Anti-inflammatory new coumarin from the *Ammi majus* L. *Org Med Chem Lett.* 2012;2(1):1.
22. Sova M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem.* 2012 Jul;12(8):749-67.
23. Hu D, Cao Y, He R, Han N, Liu Z, Miao L, Yin J. Schizandrin, an Antioxidant lignan from *Schisandra chinensis*, ameliorates A β (1-42)-Induced memory impairment in mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:721721.
24. Zhang C, Li C, Sui F, Lu Y, Li L, Guo S, Yang N, Geng D, Jiang T. Cinnamaldehyde decreases interleukin-1 β induced PGE2 production by down-regulation of mPGES-1 and COX-2 expression in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2012;37(9):1274-8.
25. Tu CT, Li J, Wang FP, Li L, Wang JY, Jiang W. Glycyrrhizin regulates CD4(+)T cell response during liver fibrogenesis via JNK, ERK

- and PI3K/AKT pathway. *Int Immunopharmacol*. 2012; In press.
26. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*. 2000;6(5):347-73.
 27. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990;347(6294):669-71.
 28. Teran LM, Davies DE. The chemokines: their potential role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(9):1005-19.
 29. Homma T, Matsukura S, Hirose T, Ohnishi T, Kimura T, Kurokawa M, Ieki K, Odaka M, Suzuki S, Watanabe S, Sato M, Kawaguchi M, Schleimer RP, Adachi M. Cooperative activation of CCL5 expression by TLR3 and tumor necrosis factor- α or interferon- γ through nuclear factor- κ B or STAT-1 in airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 Suppl 1:9-17.
 30. Nakazato J, Kishida M, Kuroiwa R, Fujiwara J, Shimoda M, Shinomiya N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(7):605-13.
 31. Kim JH, Lim HS, Ha H, Seo CS, Shin HK. Inulae Flos and Its Compounds Inhibit TNF- α - and IFN- γ -Induced Chemokine Production in HaCaT Human Keratinocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:280351.
 32. Shoji N, Asano K, Furuta A, Hirano K, Suzuki H. Effect of histamine H1 receptor antagonists on TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production from CD14+ cells induced by antigenic stimulation in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155(1):38-51.
 33. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. 1996;316(Pt 1):209-15.
 34. Shin S, Joo SS, Jeon JH, Park D, Jang MJ, Kim TO, Kim HK, Hwang BY, Kim KY, Kim YB. Anti-inflammatory effects of a *Houttuynia cordata* supercritical extract. *J Vet Sci*. 2010;11(3):273-5.
 35. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
 36. Harding JW Jr, Pyeritz EA, Copeland ES, White HB 3rd. Role of glycerol 3-phosphate dehydrogenase in glyceride metabolism. Effect of diet on enzyme activities in chicken liver. *Biochem J*. 1975;146(1):223-9.
 37. Reidy SP, Weber J. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000;125(3):285-98.
 38. Juman S, Yasui N, Okuda H, Ueda A, Negishi H, Miki T, Ikeda K. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the production of adipocytokines, leptin, tumor necrosis factor - α and resistin, during differentiation to adipocytes in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(4):490-4.