

LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 염증반응에서 MAPK 조절에 의한 加減當歸飲子の 항염증 효과

김태연

세명대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of *Gagam-Danguieumja* through Regulation of MAPK on LPS-Induced Inflammation in RAW 264.7 Cells

Tae-yeon Kim

Dept. of Oriental Pathology, College of Korean Medicine, Se-Myung University

ABSTRACT

Objectives : *Danguieumja* is a traditional medicinal prescription to treat skin disease. It was commonly used for the treatment of itching, chronic urticaria and atopic dermatitis in Korea by the addition or omission of several herbs. This study investigated the anti-inflammatory potential of *Gagam-Danguieumja* (GDE) water extract.

Methods : We examined the effects of GDE on the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide (NO) in a murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells.

Results : GDE inhibited production of NO in a dose dependent manner and also decreased the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2). As a possible molecular mechanism of anti-inflammatory effect increased phosphorylation of mitogen-activating protein kinases (MAPK) by LPS were blocked by GDE treatment.

Conclusions : These results suggest that GDE has an anti-inflammatory therapeutic potential through the inhibition of MAPK phosphorylation, thereby decreasing the expression of pro-inflammatory genes.

Key words : *Gagam-Danguieumja*, anti-inflammation, nitric oxide, inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, mitogen-activating protein kinase

1. 서론

염증은 인체에 침입한 병원체나 내인적으로 유발되는 염증활성인자를 인지하고 제거하기 위해 활성화되는 인체의 적극적인 생체 방어 기전이다. 적절한 염증 반응은 외·내인적 인자로부터 인체를 보호하는 필수 불가결한 반응이나, 과도하고 부적

절한 염증 반응은 정상 조직의 파괴와 더불어 암과 대사성 질환 등 다양한 질환의 원인으로 작용할 수 있다¹.

대식세포를 매개로 한 염증 반응에 있어 nitric oxide(NO) 생성 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin 생합성의 속도조절 단계 효소인 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현 조절과 이들 유전자의 발현에 있어 주요 신호전달 분자인 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 활성화 조절은 염증 반응을 조절하기 위한 핵심요소로서 인식되고 있으며, 이들 인자들의 활성을 조절하여

· 교신저자: 김태연 충북 제천시 세명로 65
세명대학교 한의과대학 병리학교실
TEL: 043-649-1706 FAX: 043-649-1342
E-mail: violet805@hanmail.net

염증 반응을 조절하기 위한 신규 소재 발굴 연구가 활발히 진행되어 왔다².

當歸飲子是 嚴의 濟生方³에 처음 수록된 處方으로 “治心血凝滯, 內蘊風熱, 發見皮膚, 遍身瘡疥, 或腫或痒, 或膿水浸淫, 或發赤疹痞”의 목적으로 立方되어 血燥와 風熱로 인한 瘡疥, 피부 소양증, 만성 두드러기 등의 치료에 응용되고 있다⁴. 加減當歸飲子(*Gagam-Danguieumja*, GDE)⁵는 當歸飲子에 淸熱解毒, 發散風熱, 補陰益氣, 理氣燥濕, 溫補脾胃하는 數種의 약재를 가하여 陰血損傷, 脾虛氣血不調로 쉽게 慢性으로 傳變되는 아토피성 피부염⁴에 사용하기 위하여 作方되었다.

當歸飲子에 대한 연구로는 乾癬에 활용되는 加味當歸飲子에 대한 실험⁶ 및 임상적 고찰^{7,8}, 當歸飲子 水抽出液이 抗 allergy 反應과 mouse의 免疫細胞機能에 미치는 영향⁹, 加味當歸飲子¹⁰, 當歸飲子 加減方¹¹과 外治方 병용^{12,13}이 아토피 동물 모델에 미치는 영향, anticonvulsant hypersensitivity syndrome 치험례 보고¹⁴ 등이 있으나 임상에서 아토피 피부염을 치료하는 처방으로 사용되고 있는 GDE가 MAPK 조절에 미치는 영향에 관한 연구는 아직까지 보고되지 않았다.

본 저자는 염증성 질환에 대한 GDE의 효과를 확인하기 위하여 GDE를 RAW 264.7 cells에 전처리한 후 lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 NO의 생성 및 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향과 GDE가 염증반응의 주요 신호전달 분자인 MAPK의 인산화를 차단하여 염증매개물질에 대한 염증 억제 효과를 나타내는지에 대하여 연구한 결과 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재의 추출

본 실험에 사용된 GDE 2첩(240 g)은 세명대학교 제천한방병원에서 구입하였으며 증류수로 水洗한 뒤 3 L의 증류수를 가하여 3 시간 동안 가열 추

출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 취한 뒤 Rotary evaporator(NE-1001, EYELA, JAPAN)로 200 ml가 되도록 감압 농축한 후 -80 °C에서 동결시켰다. 이를 다시 Freeze dryer system (Labconco, USA)을 이용하여 7일 간 동결건조시킨 후 58.9 g의 분말을 얻었다. GDE의 수득율은 23.75%로 -20 °C에 보관하였다가 실험 직전 생리식염수나 배지에 희석하여 microfilter paper(Whatman no. 2, 0.45-0.2 μm)로 syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of *Gagam-Danguieumja*.

Herbal name	Scientific name	Dose (g)
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	8
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	8
生地黃	<i>Rehmanniae Radix Recens</i>	8
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	8
白何首烏	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	6
牛蒡子	<i>Arctii Fructus</i>	4
白蒺藜	<i>Tribuli Fructus</i>	4
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	4
金銀花	<i>Ronicerae Flos</i>	4
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	4
馬齒莧	<i>Portulacea Herba</i>	4
枳實	<i>Aurantii immaturus Fructus</i>	4
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	3
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	3
白芷	<i>Angelicae dahuricae Radix</i>	3
地骨皮	<i>Lycii Radicis Cortex</i>	3
山楂	<i>Crataegi Fructus</i>	2
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	2
神麩	<i>Massa medicata Fermentata</i>	2
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	2
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	2
Total		120

2) 시 약

본 실험에 사용된 LPS(*Escherichia coli* O55:B5), Sodium deoxycholate, NaCl, Tris-HCl, Sodium pyrophosphate는 Sigma-Aldrich, Inc.(St Louis, MO, USA)으로부터, FBS, penicillin, streptomycin, DMEM 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL(NY, USA)로부터, Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), Trizol 및 DMSO는 Amresco(Cochran Road Solon, OH, USA)로부터, Nitric Oxide Detection kit는 Intron Biotechnology(Sungnam, Korea)로부터, EZ-Western Detection Kit는 Dogen(Seoul, Korea)으로부터, DC Protein Assay Kit는 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA, USA)로부터, RNeasy protect mini kit, QuantiTect Reverse Transcription kit, QuantiTect SYBR Green PCR kit는 Quagen(Hilden, Germany)로부터, protein extraction buffer인 Proprep은 Intron Biotechnology(Seoul, Korea)로부터, Rabbit anti-phospho-extracellular-regulated protein kinase(ERK), anti-ERK, anti-phospho-c-Jun NH₂-protein kinase(JNK), anti-JNK, anti-phospho-p38, anti-p38 및 anti-β-actin primary antibody는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)으로부터, Goat Anti-Rabbit HRP-conjugated secondary antibody는 ABCam(Cambridge, MA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 세포배양

RAW 264.7 cells은 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank, KCLB, No. 40071)(Seoul, Korea)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS과 1% penicillin 및 streptomycin을 포함한 DMEM 배양액에서 배양하였다. 세포는 37 °C 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 2일마다 배지를 교환하였으며, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 계대 배양하였다.

2) MTT assay

RAW 264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 96 well plate(Corning, USA)에 5×10⁴ cells/ml의 세포수가 되도록 100 μl씩 분주하여 37 °C, 5%, CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 GDE를 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 5 mg/ml의 MTT를 각 well에 20 μl 넣고 잘 섞어 준 후 4시간 동안 37 °C incubator에서 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO를 200 μl씩 분주하여 well에 생성된 formazan이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 Synergy 2 microplate reader(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

3) NO assay

RAW 264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 96 well plate(Corning, USA)에 5×10⁴ cells/ml의 세포수가 되도록 100 μl씩 분주하여 37 °C, 5%, CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 GDE를 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 전처리하여 1시간 동안 배양한 후, LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 100 μl씩 취해 새로운 96 well plate에 넣은 후 Nitric Oxide Detection kit의 N1 buffer를 50 μl 첨가하고 10분간 incubator에 넣었다가 꺼낸 후, 다시 N2 buffer를 넣고 10분간 상온방치 한 뒤에 Synergy 2 microplate reader(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 3회 측정하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다. 표준품으로 Nitrite standard를 사용하여 표준 용량곡선을 작성하고 질소산화물(nitrite, NO₂)의 생성을 산출하였다.

4) Real time RT-PCR

RAW 264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 100 mm cell culture dishes(SPL Lifesciences Inc, Korea)에 5×10⁵ cells/ml의 세포수가 되도록 10 ml씩 분주하여 37 °C 5% CO₂ incubator

에서 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 뒤 GDE(2 mg/ml)를 세포에 처리하여 1시간 동안 배양하고 자극제 LPS(1 µg/ml)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. RNeasy protect mini kit를 이용하여 spin column에 추출된 총 RNA는 QuantiTect Reverse Transcription Kit로 역전사(reverse transcription) 시킨 후 QuantiTect SYBR Green PCR kit를 이용하여 실시간 유전자 증폭(Real-time PCR)을 시행하였다. reaction mixture는 cDNA template 2 µl, SYBR Green PCR master mix 10 µl, primers 각 5

pM에 RNase free water를 넣어 총 20 µl의 양으로 시행하였다. 온도조건은 95 °C에서 15분간 전변성 반응 후, 94 °C 15초, 55 °C 30초, 72 °C 30초의 3단계를 한 주기로 55주기를 반복하였다.

mRNA 발현 정도는 유전자 정량 증폭 장비인 Rotor Gene Q 및 software(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 정량·분석하였으며 iNOS, COX-2의 mRNA 정량 분석 시 housekeeping 유전자인 Cyclophilin을 internal control로 삼아 표준화 시켰다. primer 각각의 염기서열은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. The Primers for RT-PCR Analysis.

Gene	Strand	Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction)
iNOS	Sense	GTGTTCCACCAGGAGATGTTG
	Antisense	CTCCTGCCCACTGAGTTCGTC
COX-2	Sense	TGCATGTGGCTGTGGATGTCATCAA
	Antisense	CACTAAGACAGACCCGTCATCTCCA
Cyclophilin	Sense	ACCCACCGTGTTCCTTCGAC
	Antisense	CATTTGCCATGGACAAGATG

5) Western blot

RAW 264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 100 mm cell culture dishes에 5×10⁵ cells/ml 의 세포수가 되도록 10 ml씩 분주하여 37 °C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 후 GDE(2 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 MAPK 활성을 측정하기 위하여 LPS(1 µg/ml)에 10분 동안 expose하였다. 반응이 종료된 후 배지를 제거하고 Cold PBS로 세척한 후 protein extraction buffer인 Proprep을 사용하여 protein을 추출하였다. Protein content를 DC Protein Assay Kit를 사용하여 정량하여 20 µg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리하고, Hybond-PVDF membrane(Amersham, Little Chalfont, UK)으로 transfer하였다. Transfer된 membrane은 Tris-buffered saline Tween 20(TBST : 20 mM

Tris, pH 7.6, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 용해된 5% skim milk에 1시간 동안 실온에서 blocking한 후 anti-phospho-ERK와 anti-ERK, anti-phospho-JNK와 anti-JNK, anti-phospho-p38과 anti-p38 MAP kinase와 β-actin primary antibody(1:1000 dilution)로 4 °C에서 overnight 반응한 후 TBST로 3회 washing하고, HRP-conjugated secondary antibody(1:1000 dilution)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 EZ-Western Detection Kit로 면역반응성 단백질 밴드를 발색시킨 후, 웨스턴이미지분석시스템인 FUSION-SL2-3500.WL 및 FUSION-CAPT software(Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany)를 사용하여 분석하였다.

3. 統計분석

각 실험군 간의 통계학적 분석은 SPSS 17.0 K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 one

way-analysis of variance를 실시하였으며 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 결 과

1. 加減當歸飲子の 세포독성 실험

GDE가 RAW 264.7 cells의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 흡광도 평균을 100으로 정하고 각 흡광도 값을 환산하여 계산한 결과, 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/ml 농도에서의 상대적 흡광도는 100.0 ± 7.8 , 105.3 ± 7.0 , 109.6 ± 5.3 , 112.2 ± 7.5 , 111.1 ± 6.5 , 99.9 ± 6.2 , 96.7 ± 7.3 , 97.1 ± 7.0 으로, GDE 처리 전 농도에서 대조군과의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

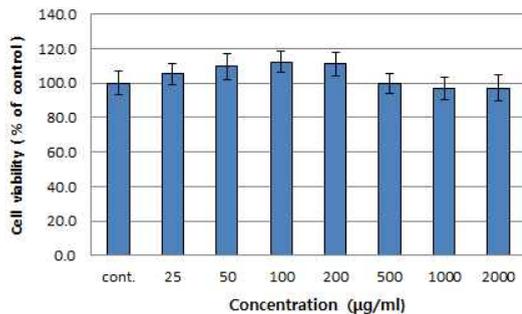


Fig. 1. Effects of GDE extract on the cell viability of RAW 264.7 cells.

Representative sticks show that cell viability in RAW 264.7 cells by GDE extract (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml) treated for 24h at 37 °C. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods.

GDE : *Gagam-Danguieumja*, MTT : methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

2. 加減當歸飲子の NO 생성 감소 효과

LPS 자극에 의한 RAW 264.7 cells의 NO 생성 증가 기전에 미치는 GDE의 작용을 확인하기 위하여 NO assay를 실시하였다. LPS만 처리한 대조군

의 NO 생성량은 7.02 ± 0.24 µM 이었으며, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도군에서의 NO 생성량은 각각 6.79 ± 0.25 , 7.40 ± 0.21 , 6.76 ± 0.23 , 6.86 ± 0.26 µM로 대조군과 유의한 차이가 관찰되지 않았으나 0.5, 1, 2 mg/ml 농도군에서의 NO 생성량은 5.79 ± 0.21 , 4.54 ± 0.17 , 3.28 ± 0.15 µM로 대조군에 비하여 유의한 감소 효과(* $p < 0.05$, † $p < 0.001$)를 나타내었다(Fig. 2).

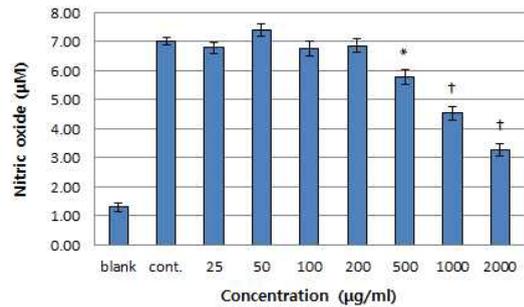


Fig. 2. Effects of GDE extract on nitric oxide concentration in RAW 264.7 cells.

Representative sticks show that nitric oxide concentration in RAW 264.7 cells by GDE extract (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml) treated for 24 h. Nitrite oxide was measured by nitric oxide detection kit's method.

GDE : *Gagam-Danguieumja*, NO : nitric oxide
* $p < 0.05$, † $p < 0.001$ compared with control.

3. 加減當歸飲子の iNOS mRNA 발현 감소 효과

RAW 264.7 cells 에서 iNOS mRNA의 상대적 발현을 관찰한 결과, 무처리군과 GDE 단독 처리군 경우 각각 0.001 ± 0.0 , 0.011 ± 0.001 의 값을 나타내었으며, GDE+LPS 처리군(0.051 ± 0.012)의 경우 LPS 단독 처리군(0.153 ± 0.012)의 33.3%로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3).

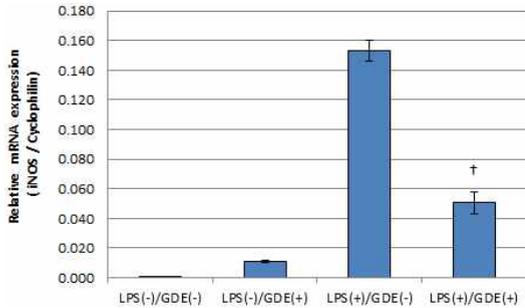


Fig. 3. Degree of relative iNOS mRNA expression by GDE in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Analysis of relative iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells was done by quantitative Real-time RT-PCR. RAW 264.7 cells were treated with GDE (2 mg/ml) or without for 24 h in the absence or presence of LPS (1 μ g/ml). Cyclophilin was used as internal control genes.

GDE : *Gagam-Danguieumja*. LPS : Lipopolysaccharide.
iNOS : inducible nitric oxide synthase

† $p < 0.001$ compared to the only LPS treated group.

4. 加減當歸飲子の COX-2 mRNA 발현 감소 효과

RAW 264.7 cells 에서 COX-2 mRNA의 상대적 발현을 관찰한 결과, 무처리군과 GDE 단독 처리군 경우 각각 0.006 ± 0.001 , 0.103 ± 0.014 의 값을 나타내었으며, GDE+LPS 처리군(5.128 ± 0.814)의 경우 LPS 단독 처리군(7.718 ± 0.788)의 66.4%로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).

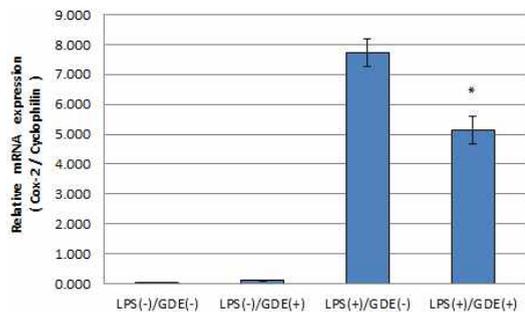


Fig. 4. Degree of relative COX-2 mRNA expression by GDE in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Analysis of relative COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 cells was done by quantitative Real-time RT-PCR. RAW 264.7 cells were treated with GDE (2 mg/ml) or without for 24 h in the absence or presence of LPS (1 μ g/ml). Cyclophilin was used as internal control genes.

GDE : *Gagam-Danguieumja*. LPS : lipopolysaccharide.
COX-2 : cyclooxygenase-2

* $p < 0.01$ compared to the only LPS treated group.

5. 加減當歸飲子の MAPKs 경로의 인산화 억제 효과

RAW 264.7 cells 에서 MAPKs 경로의 인산화 정도를 western blot을 통해 관찰한 결과, GDE+LPS 처리군의 P-p38, P-ERK(P-p44 · P-p42), P-JNK(P-p54 · P-p46) 발현은 각각 69.7%, 61.1% · 68.2%, 80.0% · 91.3%로 LPS 단독 처리군(100%)에 비하여 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5, 6, 7, 8).

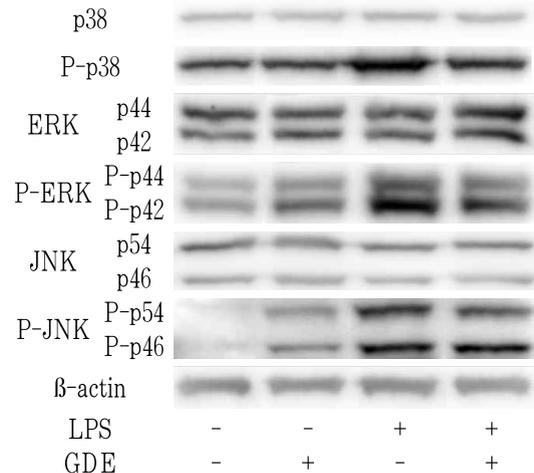


Fig. 5. Effect of GDE on LPS-induced phosphorylation (P-) of MAPKs in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with GDE (2 mg/ml) or without for 1 h before being incubated with LPS (1 μ g/ml) for 10 min. Whole-cell lysates were analyzed by western blot analysis.

GDE : *Gagam-Danguieumja*. LPS : lipopolysaccharide

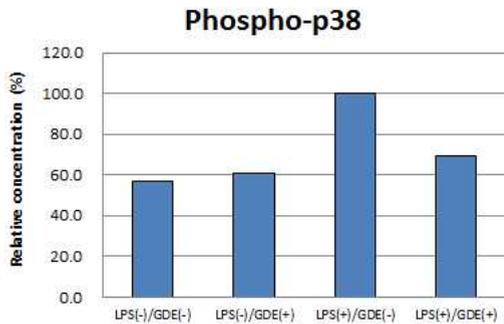


Fig. 6. Effect of GDE on LPS-induced phosphorylation of p38 in RAW 264.7 cells.

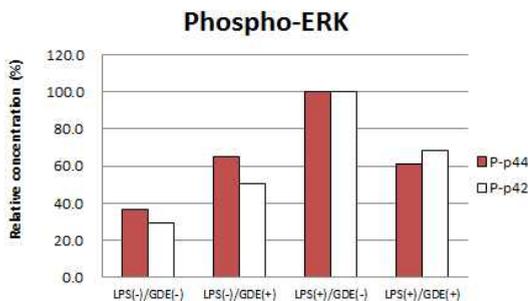


Fig. 7. Effect of GDE on LPS-induced phosphorylation of ERK in RAW 264.7 cells.

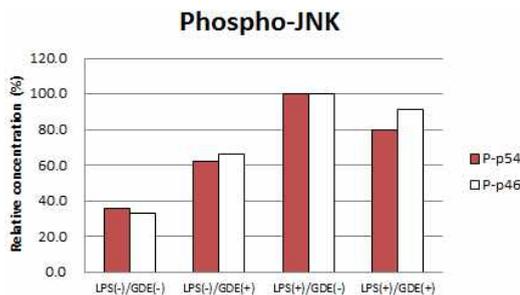


Fig. 8. Effect of GDE on LPS-induced phosphorylation of JNK in RAW 264.7 cells.

IV. 고찰

當歸飲子は 嚴의 濟生方³에 처음 수록된 處方으로 四物湯을 기본방으로 하여 補肝腎하는 何首烏, 風熱을 거하여 皮膚搔痒과 瘡을 치료하는 白茯苓, 風熱을 發散시키는 荊芥 防風, 托瘡生肌하는 黃芪,

諸藥을 調和시키고 解毒作用을 하는 甘草¹⁵⁻¹⁷를 가하여 “治心血凝滯, 內蘊風熱, 發見皮膚, 遍身瘡疥, 或腫或痒, 或膿水浸淫, 或發赤疹瘡”의 목적으로 立方되었으며 血燥와 風熱로 인한 瘡疥, 皮膚 소양증, 만성 두드러기 등의 치료에 응용되고 있다⁴. 當歸飲子에 대한 연구로는 乾癬에 활용되는 加味當歸飲子에 대한 실험⁶ 및 임상적 고찰^{7,8}, 當歸飲子 水抽出液이 抗 allergy 反應과 mouse의 免疫細胞機能에 미치는 영향⁹, 加味當歸飲子¹⁰, 當歸飲子加減方¹¹ 단독 사용 또는 外治方 병용^{12,13}이 아토피 동물 모델에 미치는 영향, 열·피부발진·소양감·립프절종대 등을 특징으로 하는 anticonvulsant hypersensitivity syndrome 치험례¹⁴ 등이 있다.

GDE⁵는 宋代 曹世榮의 活幼心書에서 아토피 피부염의 한의학적 범주 중 하나인 胎熱의 원인으로 ‘此因在胎 母受時氣邪毒 或外感風熱 或食五辛薑麵過多 治令熱蘊於內 熏蒸胎中’¹⁸이라 한 것에 근거하여 當歸飲子에 清熱解毒, 發散風熱, 補陰益氣, 行氣燥濕, 溫補脾胃하는 數種의 약재를 가하여 陰血損傷, 脾虛氣血不調로 쉽게 慢性으로 傳變되는 아토피성 피부염⁴에 사용하기 위하여 作方되었다.

염증 신호는 세포 내에서 다양한 신호전달 분자들을 활성화시키는데, 이 중 MAPK는 인산화를 통하여 nuclear factor-κB(NF-κB), activator protein-1 (AP-1), activating transcription factor-2, cAMP-responsive element binding protein을 포함한 다양한 전사인자들을 활성화시키는 핵심 신호전달 분자로 보고되고 있다^{19,20}. 따라서 대식세포를 매개한 염증 반응에 있어 NO 생성 효소인 iNOS, prostaglandin 생합성의 속도조절 단계 효소인 COX-2의 발현 조절과 이들 유전자의 발현에 있어 주요 신호전달 분자인 MAPK의 활성 조절은 염증 반응을 조절하기 위한 핵심요소로서 인식되고 있다².

대식세포(macrophage)는 LPS를 비롯한 다양한 병원체 유래 인자에 의해 활성화되며, 외래 인자 탐식을 위하여 NO, prostanoid 등의 지방대사체, tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin(IL)-1β,

IL-6 등의 전염증성 cytokine, chemokine 등 염증 매개인자를 유리함으로써 외래 인자를 제거하기 위한 내재면역계의 호능세포로서 중요한 역할을 담당한다¹. 본 연구에 사용된 RAW 264.7 cell은 항염증 약물의 효능을 검증하고, 전구 염증 매개 인자들의 유도를 주도하는 신호전달경로의 억제효능을 가진 약물을 평가하기 위한 실험모델로 가장 일반적으로 사용하고 있다²¹. 본 연구에서 RAW 264.7 cell의 생존률과 증식을 저해하지 않는 GDE의 농도를 조사한 결과 2 mg/ml 이하의 농도에서 GDE가 정상세포와 유의한 차이를 보이지 않았다.

LPS는 생체 내에서 염증을 일으키는 inflammagen으로 널리 사용되어 왔다. LPS는 염증반응 병원체의 중심적 역할을 하며, nitric oxide(NO), prostaglandin E₂(PGE₂) 및 leukotriene과 같은 염증매개체의 생성을 자극하며, 이 염증매개체의 신호경로를 자극한다^{22,23}. 본 연구에서는 GDE의 염증성 질환에 대한 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 cells에 LPS를 처리함으로써 NO 생성, iNOS와 COX-2 발현, MAPK의 인산화를 유도하였다.

NO는 nitric oxide synthases(NOS) 효소군에 의하여 L-arginine으로부터 합성된다. NOS는 인체내 생리학적 합성조절에서 중요한 역할을 하는데 이들은 neuronal NOS(nNOS), inducible NOS(iNOS), endothelial NOS(eNOS)와 같은 3가지의 형태로 존재한다. 그 중, iNOS는 염증조절을 일으키는 중요한 효소 중 하나이다²³. iNOS는 Ca²⁺ 비의존성 경로를 통해서 장시간에 걸쳐 증가하여 다량의 NO를 형성한다²⁴⁻²⁶. iNOS 발현은 murine macrophage, 내피세포, 평활근세포 및 심근 세포 등 많은 세포에서 관찰되고 있다. 인간의 iNOS는 염증성질환이 있는 환자의 macrophage에서 다량의 NO를 생성하여 세균 침입을 억제하거나 혹은 T-세포증식을 억제하여 극소 염증반응을 하향시키는 방어에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다²⁷. 그러나 과도한 iNOS의 발현은 NO의 생성량을 증가시켜 그 자체의 독성 효과에 의해 주위 세포의 손상

을 야기한다²⁸. 본 연구에서 NO 생성을 감소시키는 GDE의 농도를 조사한 결과 500 µg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 감소 효과를 확인할 수 있었으며 GDE 처리군의 iNOS mRNA 발현 또한 미처리군에 비해 억제됨을 확인할 수 있었다.

iNOS와 더불어 대표적인 전구염증매개 효소인 COX는 arachidonic acid를 염증매개 인자인 prostaglandins (PGs)로 전환시키며 COX-1과 COX-2로 존재한다. 그 중 COX-2는 정상적인 생리조건에서는 거의 발현되지 않으나 사이토카인, 박테리아 독소, LPS와 같은 염증 신호에 의해 발현되어 많은 양의 PGs를 생성하여 염증을 유도한다. 따라서 COX-2의 억제는 염증과 통증을 감소시킬 수 있다²⁹⁻³². 본 연구에서 GDE 처리군의 COX-2 mRNA 발현 또한 미처리군에 비해 억제됨을 확인할 수 있었다.

다양한 외부자극에 의한 전사인자의 활성화로 전구염증매개 효소인 COX-2나 iNOS 발현이 유도되는 과정은 현재까지 비교적 잘 특성화된 주요 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소인 ERK, JNK 및 serine/threonine-protein kinase 중 하나인 p38을 통해 설명되고 있다³³.

이들 MAPKs는 모두 다양한 세포의 자극에 반응해 upstream MAPK kinase(MEK)에 의해 tyrosine과 threonine에서 인산화가 일어남으로써 활성화된다. 상기 MAPKs의 활성화는 그 후에 다른 kinase나 전사 인자를 인산화·활성화 시키고, 결국 표적 유전자의 발현을 변화시킨다³³. 본 실험에서 RAW 264.7 cells에서 LPS로 유도된 JNK1·2, ERK1·2와 p38 MAPK 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 westernblot을 통하여 확인한 결과 GDE는 MAPKs 신호전달 체계에 억제효과가 있었다.

결과적으로 본 실험에서 GDE는 LPS로 자극된 RAW 264.7 cells에서 NO생성을 억제하였다. 이와 같은 항염증반응효과는 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 효과적으로 감소시킴으로써 일어나며, MAPK 경로의 억제를 통해 NO생성을 경감시키는 것으로 사료된다. 이러한 결과들을 통해 GDE는 항염증

효과를 지니고 있으며 향후 GDE가 단백질 수준에서 염증 발현에 관여하는 iNOS와 COX-2의 억제 효과 확인, NF- κ B signaling 관련 여부, COX-2에 의해 생성되는 염증매개인자인 PGs 확인 등의 추가적인 연구를 통해 피부 질환을 비롯한 각종 염증 질환의 효과적인 치료처방으로 제시될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

GDE가 염증에 관여하는 여러 인자들에 미치는 영향을 알아보고자, LPS로 활성화시킨 RAW 264.7 cells에서 염증과 관련된 NO의 양, iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 효과와, MAPK 경로에 미치는 효과에 대하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GDE는 NO 생성을 억제하였다.
2. GDE는 iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 감소시켰다.
3. GDE는 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로인 p38, ERK, JNK의 인산화를 억제하였다.

이러한 결과를 바탕으로 GDE는 항염증효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부의 지역혁신센터사업으로 수행되었음(RIC-07-06-01).

참고문헌

1. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Innate immunity : Tenney S. Kuby Immunology, 6th ed. New York: Freeman press: 2007, p. 52-73.
2. 박상미, 변성희, 김영우, 조일제, 김상찬. 桑葉 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과. 대한본초학회지 2012;27(3):31-8.
3. 嚴用和. 濟生方. 中國醫學大系卷十一. 서울: 여강출판사; 1987, p. 522.
4. 차관배, 김윤식, 설인찬. 아토피 피부염에 관한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집 2005;14(2):113-26.
5. 세명대학교 부속 세천한방병원. 원내 처방집. 제천: 인성사; 2009, p. 211.
6. 이진학, 노석선. 乾癬에 활용되는 加味當歸飲子에 대한 실험적 연구. 대한외관과학회지 1999; 19(2):113-42.
7. 심상신, 김종한, 최정화. 당귀음자가감을 응용한 건선 환자 1례에 대한 임상적 고찰. 대한한방안ibi인후피부과학회지 2002;5(1):336-42.
8. 민들레, 장성진, 박은정. 當歸飲子加減方과 外治法을 병용한 小兒 乾癬 치험 1례. 대한한방소아과학회지 2012;26(3):20-9.
9. 노석선. 當歸飲子 水抽出液이 抗 allergy 反應과 mouse의 免疫細胞機能에 미치는 영향. 원광대학교 대학원, 1990.
10. 한재경, 김윤희. 加味當歸飲子가 아토피 동물 모델에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지 2005; 19(1):34-52.
11. 한경훈, 박은정, 이해자. 當歸飲子 加減方의 처방별(A, B) 아토피성 알레르기반응 조절 효과 비교 연구. 대한한방소아과학회지 2005;19(2):13-30.
12. 김성훈, 최정화, 김종한, 박수연. 當歸飲子 加減方과 外治法 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 한방안ibi인후피부과학회지 2005; 18(1):27-49.
13. 송성필, 손대범, 황치환, 송승현, 황충연. 當歸飲子와 三黃洗劑加味方 병용이 NC/Nga 아토피 생쥐에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2007; 21(5):1210-8.

14. 류순현, 최요섭, 김정진, 정기현, 김영석, 김태경. 當歸飲子로 好轉된 中風患者의 anticonvulsant hypersensitivity syndrome 1例. *대한한방내과학회지* 2002;23(2):268-73.
15. 이상인. 방제학. 서울: 영림사; 1990, p. 171-2.
16. 이상인, 안덕균, 신민호, 노승현, 이영종, 김선희. 한약임상응용. 서울: 정보사; 1998, p. 90-1, 107-8, 356-7, 433-6.
17. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울: 영림사; 2000, p. 127, 131, 518, 534, 540, 583.
18. 曹世榮. 活幼心書(明本論). 上海: 大東書局; 1933, p. 2-8.
19. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Acute and chronic inflammation : Mitchell S. Pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 2006, p. 47-86.
20. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002;20:55-72.
21. 김범희, 이용태, 강경화. LPS로 유도된 RAW 264.7 염증모델에서 MARK 조절에 의한 羊乳의 항염증효과. *동의생리병리학회지* 2010;24(1):80-4.
22. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1998;273(2):974-80.
23. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol* 1992;32:297-311.
24. Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* 1991;266:12544-7.
25. Korhonen R, Lahti A, Hämäläinen M, Kankaanranta H, Moilanen E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol* 2002;62(3):698-704.
26. Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, et al. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 2001;21(6):1809-18.
27. Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur J Neurosci* 2002;16(11):2103-12.
28. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002;40(2):140-155.
29. Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 2001;20(29):3921-6.
30. Marina L, Kamal RM, Andrew F, Gary B, Jeremy S, Andrew RC. Regulation of Cyclooxygenase 2 mRNA Stability by the Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Signaling Cascade. *Mol Cell Biol* 2000;20(12):4265-74.
31. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2 :regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1535-42.
32. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, Van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 2000;43(1):4-13.
33. 김영선, 이성근, 이기상. 大薊가 LPS로 유도된 Mouse BV2 Microglial cells의 염증반응에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2008;29(4):1048-60.