

黃芩芍藥湯의 RAW 264.7 대식 세포에서의 항염증 효과에 관한 연구

김마룡[#], 강옥화, 김성배, 강희정, 김지은, 황형칠, 김인원, 권동렬^{*}

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소, 원광생명공학연구소

The Study of Anti-inflammatory Effect of *Hwanggeumjakyak-tang* Extract in RAW 264.7 Macrophage

Ma-Ryong Kim[#], Ok-Hwa Kang, Sung-Bae Kim, Hee-Jung Kang, Ji-Eun Kim, Hyeong-Chil Hwang, In-Won Kim, and Dong-Yeul Kwon^{*}

Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, and Institute of Biotechnology, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea.

ABSTRACT

Objectives : *Hwanggeumjakyak-tang* (*huangqin shaoyao tang*, HJT) has been used to treat acute enteritis in traditional oriental medicine. However, there has been a lack of studies regarding the effects of HJT on the inflammatory activities and effector inflammatory disease mechanism about macrophage before is not known. So we examined the effect of HJT water extract on pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide (LPS) - stimulated mouse macrophage, RAW 264.7 cells.

Methods : Cells were treated with 2 ug/mL of LPS 1 h prior to the addition of HJT. Cell viability was measured by MTS assay. The production of nitric oxide (NO) was determined by reacting cultured medium with Griess reagent. The expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible NO synthase (iNOS) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) was investigated by Western blot, RT-PCR. The content of level of cytokines (prostaglandin (PG) E₂, interleukin (IL)-6, IL-12, Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)) in media from LPS-stimulated Raw 264.7 cells was analyzed by ELISA kit.

Results : HJT inhibited the production of NO, PGE₂, IL-6 as well as the expressions of iNOS, COX-2 but did not inhibit the production of IL-12, TNF- α , MCP-1 in the murine macrophage, RAW 264.7 cells. HJT also had suppression effects of LPS- induced MAPKs activation

Conclusion : These results suggest that HJT has an anti-inflammatory therapeutic potential, which may result from inhibition of MAPK phosphorylation, thereby decreasing the expression of pro-inflammatory genes.

Key words : *Hwanggeumjakyak-tang*, Anti-inflammation, ELISA, Western blot, RT-PCR

서 론

염증은 인체에 발생하는 질환 중 가장 흔하게 발생하며 또 가장 많이 연구된 것의 하나이다. 생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 즉각적으로 이에 대한 반응을

일으켜 손상을 국소화시키고, 나아가서 손상된 부위를 원상으로 회복시키려는 방향으로 일련의 국소적 반응을 일으키게 된다. 이러한 손상에 대한 초기의 조직반응을 염증이라 한다¹⁾.

염증의 화학적 매개물질은 자신이 염증의 원인이 되는 것은 아니고, 생체의 염증이나 알려지 증상을 일으킬 수 있는

* 교신전자 : 권동렬, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 약학대학 한약학과 본초학교실
· Tel : 063-850-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr
제1저자 : 김마룡, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 약학대학 한약학과 본초학교실
· Tel : 063-850-6802 · E-mail : haking3@naver.com
· 접수 : 2012년 12월 26일 · 수정 : 2013년 1월 9일 · 채택 : 2013년 1월 13일

어떤 자극을 주었을 경우, 생체 내에서 생체반응의 결과 만들어지며, 그것에 의해 염증 반응을 발생 또는 진전시키는 작용을 가진 물질을 말한다²⁾. 이와 같은 염증 매개 물질을 정리하자면 혈관에 작용하는 amines류 (histamine, serotonin, catecholamines), 혈장 단백분해효소인 complement와 arachidonic acid 대사산물인 prostaglandins (PGs), leukotrienes (LT)이 있으며 cytokines, chemokines, NO, 백혈구의 lysosome 내용물, 산소 유래 유리기 등이 있다³⁾.

이들의 염증반응에 대한 역할을 살펴보면 histamine, serotonin, bradykinin, PGs과 같은 혈관 확장 물질은 자극이 가해지면 국소적으로 유리되어 혈관 투과성이 증대시켜 염증을 유발하며⁴⁾ 통칭 complement라고 알려진 일련의 혈장 단백질은 자신이 활성함으로써 국소 염증과 침입 박테리아의 포식 작용을 한다. PGs, LT는 arachidonic acid가 효소 cyclooxygenase (COX)와 lipoxygenase (LO)에 의해 생성되며 혈관투과성 증가, 혈관확장 증가, 호중구 화학주성 유도등 다양한 생리효과를 나타낸다⁵⁾.

Chemokine은 호중구나 단구처럼 chemokine receptor를 가진 세포들을 혈행 밖으로 유인하여 감염조직 내로 오도록 하는 분비단백이다. 이 chemokine은 백혈구 혈관 밖 유출이 일어나는 과정에 화학성 유인 물질과 활성분자로 작용한다. 화학 유인 물질은 백혈구를 염증 부위로 불러들이는 핵심요소이다. 이들은 interleukin (IL)-8, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), Macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1)과 같은 chemokine과 complement 활성화 시에 발생하는 C5a와 같은 펩티드 조각이 포함된다⁵⁾.

Cytokine은 세포에서 분비되며 그에 대한 적정수용체를 가진 근처 세포들의 행동에 영향을 미치는 단백에 대한 일반적인 이름이다. Cytokine은 IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ 등이 대표적이데 IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α 와 다수의 chemokine들이 redundant effect와 pleiotropic effect를 나타내어 염증 반응을 일으키며 IL-12는 NK세포의 활성 유도, T림프구의 활성 및 분화를 유도하며 IFN- γ 은 급성기 반응의 후기에 작용하여 대식세포를 유인하고 활성화 시킴으로써 만성염증에 기여한다⁵⁾.

NO는 효소 nitric oxide synthetase (NOS)에 의하여 L-Arginine, 분자산소, NADPH 및 기타 cofactors로부터 합성되어 혈관 평활근의 이완, 혈소판응집과 부착을 감소시키고, 비만세포 매개의 염증의 여러 특징들을 억제하며, 백혈구 침윤의 조절자로 작용한다⁵⁾.

항염증 약들은 이런 염증의 화학적 매개물질의 대사과정을 억제함으로써 효과를 나타내기 때문에 염증의 화학적 매개물질을 조절하여 염증반응을 조절하기 위한 신규 후보소재를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

실험에 사용한 황금작약탕(黃芩芍藥湯)은 원대(元代)의 주단계(朱丹溪)가 저술한 『단계의집(丹溪醫集)』의 『단계수경(丹溪手鏡) 증권 하리편(下利篇)』에 처음 수록되었고 사리복통후중(瀉利腹痛後重), 신열(身熱) 및 맥이 홍질(洪疾)할 때 사용한다 하였다⁶⁾. 그 후에 명대(明代)의 장개빈(張介賓)이 저술한 『경약전서(景岳全書)』에서도 설사이질(泄瀉痢疾)에 복통(腹痛) 또는 심한 신열(身熱)과 후중(後重), 맥홍삭(脈洪數) 등에 사용한다 하였으며⁷⁾ 『동의보감(東醫寶鑑)』에서는 이질

로 피골이 나오고 몸에 열이 나며 배가 아프고 맥이 홍(洪), 삭(數)한 것을 치료한다고 하였다⁸⁾. 황금작약탕은 황금, 백작약, 감초로 구성되어 있는데 황금작약탕의 효능은 진통작용과 설사억제작용에 대한 연구⁹⁻¹⁰⁾가 보고 되어 있으나 그 밖에 염증 관련된 연구 보고는 미흡하다.

이를 토대로 황금작약탕도 강한 항염효과가 있을 거라 생각하고 잘 밝혀지지 않은 황금작약탕의 항염효과와 기전에 대해 실험해 보았다.

그리고 내독소로 잘 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)는 국소 급성염증을 강화하여 감염원을 제거하도록 TNF- α , IL-6, IL-1과 같은 cytokines을 분비하게 한다²⁴⁾.

이에 본 연구는 황금작약탕 물 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 황금작약탕 물 추출물을 처리하여 방출하는 NO, PGE₂ 및 여러 cytokine의 생성을 측정하여 염증을 억제하는 기전을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

LPS (E. coli lipopolysaccharide), RPMI-1640 배지는 Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, FBS) 및 항생제는 Gibco BRL (USA)로부터 구입하였다. 조직배양 플레이트와 직경 100 mm 페트리접시는 Nunc Inc. (Naperville, USA)로부터 구입하여 사용하였다. PGE₂, IL-6, IL-12, MCP-1, TNF- α 은 효소결합면역측정 (ELISA) 키트를 R&D Systems inc. (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였으며, COX-2, iNOS, MAPKs (ERK, JNK) 단일세포 항체 및 peroxidase conjugated된 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, USA)에서 구입하였다.

2) 약재

황금작약탕에 들어가는 약재인 황금, 백작약, 감초는 대한약국(Iksan, Korea)에서 구입하였다.

3) Primer 준비

RT-PCR을 위해 여러 개의 primer를 사용하였다. Primer의 구성은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

cDNA		Primer sequence
IL-6	forward	5'-CATGTTCTCTGGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACTAGGTTTTCGCCAGTA-3'
TNF- α	forward	5'-GCACAGCCTCTCCTCACAGAG-3'
	reverse	5'-ACCCGTAGGGCGATTACAGT-3'
iNOS	forward	5'-AGCCCAACAATACAAATGACCCCTA-3'
	reverse	5'-TTCTGTGTTTCTATTTCCTTTGT-3'
COX-2	forward	5'-CACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'
	reverse	5'-GATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3'
β -actin	forward	5'-ATGAAGATCCTGACCGAGCGT-3'
	reverse	5'-AACGCACTCAGTAACAGTCCG-3'

2. 방법

1) 시료의 조제방법

황금작약탕 물 추출물은 구성 약재를 원 처방과 같은 비율로 100 g을 취하여 증류수를 용매로 하여 2 시간 열수 추출하였다. 추출액을 0.45 μm 필터로 여과한 후에 감압 동결 건조를 하였으며, 11.0 g이 얻어져 4℃에 보관하였다. 실험을 하기 위해 추출물은 PBS (phosphate buffered saline)에 녹였다. 황금작약탕은 황금, 백작약, 감초로 구성되어 있다 (Table 2).

Table 2. The composition of Hwanggeumjakyaktang

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Weight (g)
黃芩	Scutellariae Radix	7.5
白芍藥	Paeoniae Radix	7.5
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	3.75

2) 세포 배양

설치류 대식 세포주 (murine macrophage cell line, RAW 264.7)는 한국 세포주 은행으로부터 구입하여 사용하였다 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology American Tissue Culture Collection). RAW 264.7 세포는 항생제 및 항균제(100 U/mL의 penicillin G, 100 U/mL의 streptomycin)를 첨가하고 10%의 열처리 우태아 혈청 (heat inactivated FBS)을 첨가한 완전한 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂ 의 습한 대기, 37℃의 온도조건으로 배양하였다.

3) MTS 분석

세포 생존력은 MTS assay를 이용하였다. 황금작약탕을 처리한 세포에 20 μL의 MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium), 5 mg/mL) 용해액을 첨가한 후 37℃에서 1시간 보존한 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) NO 생성량 측정

황금작약탕 물 추출물 (250 μg/mL and 500 μg/mL)의 농도로 전처리하고 여기에 LPS (200 ng/mL)를 각각 주입한 다음 RAW 264.7 세포를 24시간 배양하였다. 그 상층액에 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)와 동량으로 주입한 후 10분간 실온에서 방치하였다. 아질산의 농도는 570 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 세포가 없는 배양액은 아질산이 0-70 μM로 나타나, 이 값을 표준으로 하여 여러 실험군 흡광도 값을 통해 아질산 값을 계산하였다.

5) ELISA

먼저 RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 5×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 황금작약탕 물추출물 (250 μg/mL and 500 μg/mL)을

30분 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/mL)로 RAW 264.7 세포를 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 IL-6, IL-12, MCP-1, TNF-α 생성량을 ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

6) PGE₂ 측정

먼저 RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 5×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 황금작약탕 물 추출물 (250 μg/mL and 500 μg/mL)을 각각 30분 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/mL)로 RAW 264.7 세포를 자극한 후 세포부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE₂ 생성량을 EIA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

7) RNA 분리 및 RT-PCR

황금작약탕 물 추출물에 의한 염증인자 NO의 억제와 iNOS 및 COX-2, IL-6 mRNA, TNF-α mRNA 발현과의 상관성을 알아보기 위하여 RT-PCR 로 mRNA 발현을 조사하였다. RNA 및 RT-PCR RNA 세포의 준비는 100 mm 세포배양 접시에 5×10⁶ cells/mL 세포로 분주한 다음, 하루 밤 동안 안정화 시켰다. 이 세포에 황금작약탕을 처리한 후, LPS로 처리하고 24시간 후에 세포를 모아 PBS로 세척하여 easy blue (Intron co.) 1 mL를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200 μL를 넣고 다시 교반하여 13,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액 400 μL에 이소프로판올을 가하여 다시 원심 분리하여 RNA 펠렛을 얻었다. 여기서 얻어진 RNA에 MuLV reverse transcriptase, 1 mM dNTP 0.5 μg을 넣어 cDNA를 만들었다. 여기에 iNOS, COX-2, IL-6, TNF-α, β-actin 프라이머를 넣고 thermal cycler를 이용하여 증폭시켰다. 이때 iNOS는 94℃에서 45초, 60℃에서 45초, 70℃에서 1분 동안 27 cycle로 반응시켰으며, COX-2는 94℃에서 30초, 57℃에서 45초, 72℃에서 30초 동안 36 cycle로 반응시켰고, IL-6, β-actin은 94℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 1분 동안 30 cycle로, TNF-α 는 94℃에서 15초, 60℃에서 25초, 72℃에서 20초 동안 45 cycle로 반응시켰다. 만들어진 RNA를 2% 아가로스 겔에 전기 영동시켜 UV 검출기로 확인하였다.

8) Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20-30 μg의 lysate를 8-12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD,

Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1:1000) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2 (1:1000) (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1-3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

9) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차 (S.E.M.)를 구하여 그 유의성은 Student's t-test 분석법을 이용하여 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. 황금작약탕 물 추출물이 세포생존율에 미치는 영향

황금작약탕 물 추출물 (HJT)이 세포독성에 영향을 주는지 알아보기 위해 MTS 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. HJT를 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 측정된 50, 100, 250 µg/mL농도에서 세포독성은 나타나지 않았다. 그러나 500 µg/mL에서는 강한 세포독성을 나타내어 본 실험에서는 HJT 100, 250 µg/mL농도로 실험하였다 (Fig. 1).

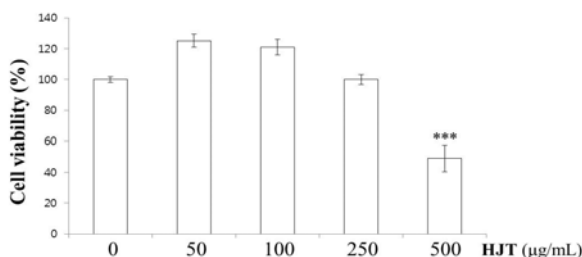


Fig. 1. Effect of HJT on cell viability in RAW 264.7 cells. Cell viability was evaluated with the MTS assay. Data represent the means ± S.E.M. of duplicate determinations from three separate experiments (**P<0.001).

2. NO 생성에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

NO는 활성산소 중 하나이며, 염증상태에서 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 따라서 NO 생성에 대한 황금작약탕 물 추출물 (HJT)의 효과를

알아보기 위해 Griess assay 방법을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO²⁻의 형태로 측정하였다. HJT을 처리하였을 때 각각 농도 의존적이고 유의적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

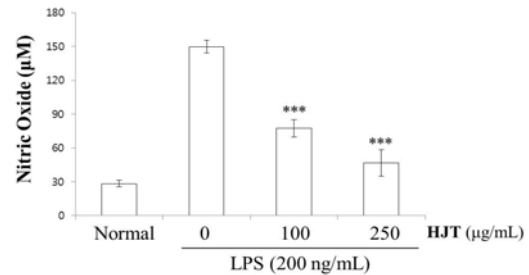


Fig. 2. Effect of HJT on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Statistical significance: ***P<0.001, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Values shown are the mean ± S.E.M. of duplicate determinations from three separate experiments.

3. iNOS protein과 iNOS mRNA 발현에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

NO는 iNOS에 의해 생성되어 염증상태에서 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 따라서 NO를 생성하게 하는 iNOS의 발현을 알아보기 위해 Western blot과 iNOS의 mRNA 발현을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 iNOS protein발현은 HJT을 처리하였을 때 억제되는 양상을 보였으며 LPS 처리에 의해 형성되는 iNOS mRNA 발현 역시 HJT을 처리하였을 때 현저한 억제 양상을 보였다 (Fig. 3).

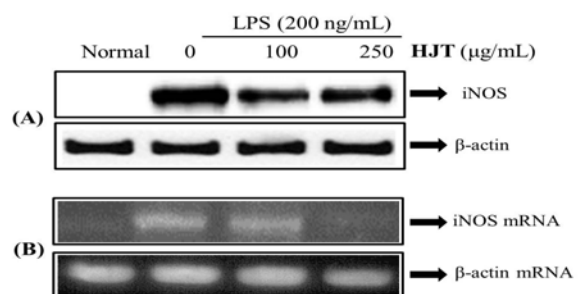


Fig. 3. Effect of HJT on LPS-induced iNOS protein and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells, (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Equal amounts of protein (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with iNOS and β-actin antibodies. Equal loading of protein was verified by β-actin. (B) iNOS mRNAs were assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The β-actin mRNA was assayed in parallel to confirm equivalency of the cDNA preparation.

4. PGE₂ 생성에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

PGE₂는 염증반응 시 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로 화학주성을 증가시킨다⁵⁾. 본 연구에서는 PGE₂를 대상으로 HJT의 약리학적 효능 평가를 실시하였다. HJT을 각각 250 µg/mL, 100 µg/mL의 농도로 30분 동안 전 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/mL)로 RAW 264.7 대식세포주를 자극한 후 세포 부유액을 원심 분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE₂ 생성량을 측정하였다. 그 결과, Normal에서는 PGE₂ 생성량이 매우 낮게 측정되었으나, LPS에 자극에 PGE₂ 농도가 현저히 증가 되었다. 반면, HJT을 처리하였을 때 농도 의존적으로 PGE₂ 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

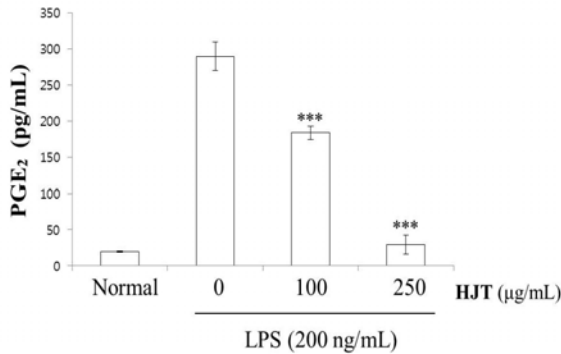


Fig. 4. Effect of HJT on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. ***P<0.001, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Values shown are the mean ± S.E.M. of duplicate determinations from three separate experiments.

5. COX-2 protein과 COX-2 mRNA 발현에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

황금작약탕의 COX-2 protein과 COX-2 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 Western blot과 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 COX-2 protein발현은 농도 의존적으로 억제되는 양상을 보였으며 COX-2 mRNA 발현은 HJT을 처리하였을 때 현저하게 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 5).

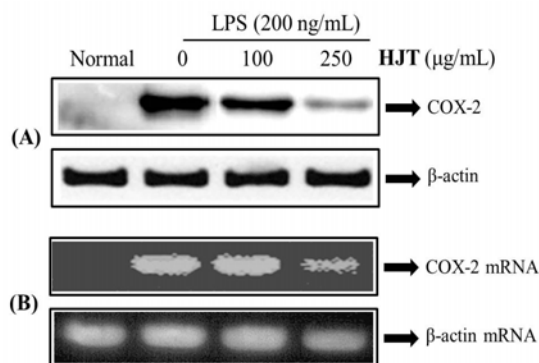


Fig. 5. Effect of HJT on LPS-induced COX-2 protein and COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Equal amounts of protein (20 µg) were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with COX-2 antibodies. Equal loading of protein was verified by β-actin. (B) COX-2 mRNA were assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The β-actin mRNA was assayed in parallel to confirm equivalency of the cDNA preparation.

6. Cytokine 생성에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

IL-6, IL-12, TNF-α, MCP-1와 같은 염증성 cytokine은 서로 간에 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 염증반응이 유발된 대식세포가 주요 생성세포이다³⁰⁾. 대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 염증성 cytokine인 IL-6, IL-12, TNF-α, MCP-1의 생성을 ELISA를 이용하여 실험하였다. 그 결과, LPS 자극원을 처리하였을 때 모든 cytokine 생성이 현저히 증가하였고, HJT을 처리하였을 때 IL-6 생성 억제 효과가 강하게 나타났고 TNF-α 생성 억제 효과가 미약하게 나타났다 (Fig. 6).

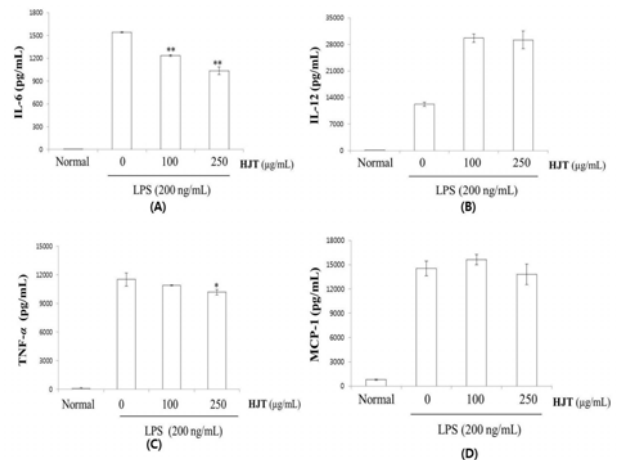


Fig. 6. Effect of HJT on LPS-induced cytokine production in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Production of cytokine was measured by ELISA. Cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Data are mean ± S.E.M. values of duplicate determinations from three separate experiments (**P < 0.01, *P < 0.05).

7. IL-6 mRNA 발현에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 IL-6 mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통해 알아 본 결과, HJT을 처리하였을 때 IL-6 mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제되었다 (Fig. 7).

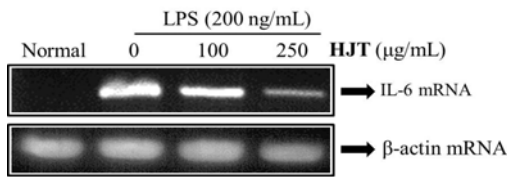


Fig. 7. Effect of HJT on LPS-induced IL-6 mRNA expression in RAW 264.7 cells. The IL-6 mRNA expression was assessed by RT-PCR. Cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The β -actin mRNA was assayed in parallel to confirm equivalency of the cDNA preparation.

8. TNF- α mRNA 발현에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 TNF- α mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통해 알아 본 결과, HJT을 처리하였을 때 TNF- α mRNA 발현이 거의 억제되지 않았다 (Fig. 8).

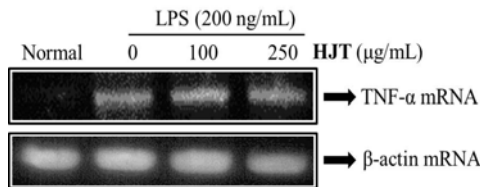


Fig. 8. Effect of HJT on LPS-induced TNF- α mRNA expression in RAW 264.7 cells. The TNF- α mRNA expression was assessed by RT-PCR. Cells were pretreated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. The β -actin mRNA was assayed in parallel to confirm equivalency of the cDNA preparation.

9. MAPKs의 인산화에 대한 황금작약탕 물 추출물의 억제 효과

MAPKs는 세포의 성장과 분화 및 사이토카인과 스트레스 제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 황금작약탕의 억제 메커니즘이 MAPKs 경유하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 대식세포에 HJT을 처리한 경우 JNK1/2 와 ERK1/2 인산화를 억제하는 것을 확인하였다 (Fig. 9).

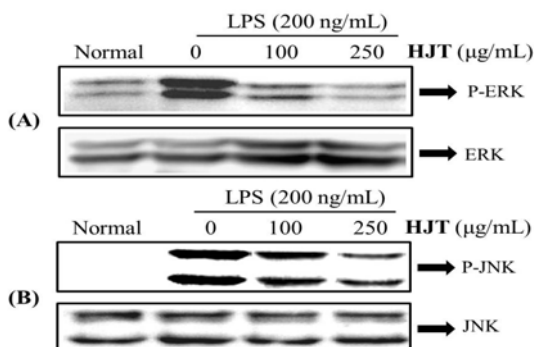


Fig. 9. Effect of HJT on the phosphorylation (P-) of MAPKs in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of HJT for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 30 minutes. Whole-cell lysates were analyzed by western blot analysis. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained.

고찰

염증이 발생하면 임상적으로 전신 증상과 국소 증상이 나타난다. 전신 증상으로는 발열, 피로, 식욕감퇴 및 쇠약 등의 증세가 나타나며 국소적 증상은 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실의 증후가 나타난다. 이같은 국소적 증세는 혈류 및 혈관 크기의 반응, 혈관 투과성의 변화, 백혈구 침윤의 3가지로 요약할 수 있다. 염증을 일으키는 원인은 1차적인 조직손상을 일으키는 직접적인 원인과 조직 손상에 의하여 일어나는 2차적인 반응의 생체내 원인 등 2가지로 구분하고 있다. 1차적인 직접적인 조직 손상의 원인은 무수히 많으며, 생물적 원인, 물리적 원인, 화학적 원인으로 크게 나눌 수 있지만 원인의 종류나 손상 조직의 종류와는 상관없이 손상 후에 일어나는 염증 반응은 거의 유사하다. 따라서 조직이 손상을 받는 원인과 손상 후에 일어나는 변화의 원인은 서로 다르며 손상 후에 일어나는 변화는 손상에 의하여 유리된 일종의 공통성 물질로 생각되며, 이것이 염증반응의 생체 내 변화 원일일 것이라고 생각된다. 이러한 화학물질을 염증반응의 매개물질이라고 한다¹⁾.

먼저 황금작약탕의 구성 약재들을 살펴보면 황금은 미(味)는 고(苦)하고 성(性)은 한(寒)하며 폐(肺), 담(膽), 위(胃), 대장경(大腸經)에 작용하며 청열소습(淸熱燥濕), 사화해독(瀉火解毒), 지혈(止血), 안태(安胎)의 효능이 있다¹¹⁾.

황금의 약리 효과에 대해선 항균, 항염, 진통, 항산화 효과 등이 보고되었고¹²⁻¹⁴⁾ 이외에도 자궁암, 간암 등 항암제와 간보호제 및 류마티스성 관절염 치료에도 효과가 있다 보고되었다¹⁵⁻¹⁷⁾. 백작약의 미(味)는 고(苦), 산(酸)하고 성(性)은 미한(微寒)하며 폐(肺), 비경(脾經)에 작용하며 양혈염음(養血斂陰), 평화간양(平和肝陽), 유간지통(柔肝止痛)의 효능이 있다¹⁸⁾. 백작약의 약리 효과로서는 항산화효과, 진통, 진경효과, 항진균효과 등이 보고 되어있다¹⁹⁻²¹⁾. 감초의 미(味)는 감(甘)하고 성(性)은 평(平)하며 심(心), 폐(肺), 비(脾), 위경(胃經)에 작용하며 보비익기(補脾益氣), 윤폐지해(潤肺止咳), 완급지통(緩急止痛), 청열해독(淸熱解毒)의 효능이 있다²²⁾. 감초의 약리 효과에 대해서는 소염작용, 진통작용, 항균작용 등이 알려져 있다. 감초에 내재하는 glycyrrhizin은 혈중 bilirubin 치의 상승을 억제하고 strychnine, atropine 및 chloralhydrate의 독성 감소와 histamine에 대한 해독 작용이 보고 되었다²³⁾.

황금작약탕(黃芩芍藥湯)은 동의보감에 수록된 처방으로 급성 장염 등으로 인한 농혈의 하리에 사용되는 처방이다⁸⁾. 장염에도 효과가 있으므로 항염증의 효능이 있을거라 생각했지만 이 처방에 대한 연구보고가 미흡하였고 세포 수준에서 항염증과 관련된 메커니즘 연구는 존재하지 않았다. 따라서 본 연구에서는 황금작약탕 물 추출물이 NO와 COX-2의 저해 및 cytokine의 억제기전과 관련이 있을 것으로 예상됨에 따라, 염증 반응의 주체가 되는 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO의 생성억제 효과, 그리고 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제효과, 여러 Cytokine 및 PGE₂ 생성 억제효과 등을 알아보았다. 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 황금작약탕을 처리하여 확인해 본 결과 NO, PGE₂, IL-6의 생성과 iNOS, COX-2의 발현을 강하게 억제하였다.

MAPK는 serine/threonine kinase로서 세포 증식, 분화, 사망 및 종양 생성등의 다양한 생물학적 과정에서, 세포 외부의 자극에 대한 신호를 세포 내로 전달하는데, LPS에 의하여 활성화 되는 MAPK로는 extracellular regulated protein kinase (ERK), c-Jun NH2-protein kinase (JNK), stress-activated protein kinase (SAPK), serine, threonine protein kinase인 p38 등이 있고 각 MAPK는 각기 다른 세포의 자극에 의해 활성화되고, 또한 각기 다른 기질 특이성을 보이며, 상이한 경로를 통해서 활성화된다^{26,27}. 따라서 황금작약탕 추출물이 NO와 cytokine의 생성을 어떤 경로를 통해 억제되는지 알아보기 위해 Western blot 방법으로 MAPK구성요소인 ERK, JNK의 인산화를 알아보았다. 그 결과 RAW 264.7세포에 LPS를 투여하였을 때 황금작약탕 물추출물이 ERK, JNK의 인산화를 억제하는 것으로 보아 황금작약탕 물추출물이 ERK, JNK 경로에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

요약하면, 황금작약탕 물추출물은 MAPKs 중 ERK와 JNK의 인산화를 억제함으로써 염증성 cytokine인 IL-6의 분비와 IL-6의 mRNA로의 전사를 억제하며 NO, PGE₂의 생성과 iNOS, COX-2의 발현을 억제하였다.

결론

설치류의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 황금작약탕 물 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황금작약탕은 LPS로 유도된 대식세포에서 NO와 PGE₂ 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
2. 황금작약탕은 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 protein 과 mRNA발현을 억제하였다.
3. 황금작약탕은 LPS로 유도된 Cytokine IL-6발현을 억제하였다.
4. 황금작약탕 처리 시 LPS로 유도된 MAPKs 인산화의 활성을 저해 하는지 알아보기 위해 western blot을 수행한 결과 MAPKs (JNK1/2, ERK1/2) 인산화가 억제되었다.

이와 같은 결과로 보아 황금작약탕은 대식세포에 작용하여 MAPKs의 인산화 활성의 저해를 통해 NO, PGE₂, IL-6의 생성과 iNOS, COX-2 발현을 억제함으로써 항염증에 효과가 있음을 알 수 있다.

감사의 글

This study was supported by the Grant of the Traditional Korean Medicine R&D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (No. B120069).

참고문헌

1. Kim YH. Pathology. Korean Society of Pathologists : Gomunsa, 1991 : 71-92.
2. Kim YK, Ha HK, LEE JH, Kim JS. COX-2 Inhibition and Anti-inflammatory Effects of Traditional Herbal Medicine. 2002 : 66.
3. Kim CJ, Seo BS. Pothological physiology (I). 5th ed, Sin-Il sangsa, 2006 : 148-59.
4. Lee DS, Kim KS, Li B, ChoibHG, Keo S, Jun KY, Park JH, Kim YC. Anti-inflammatory Effect of the Cirsium japonicum var. ussuriense 70% Ethanollic Extract in RAW264.7 Cells by Heme oxygenase-1 Expression. Korean J Pharmacogn. 2012 ; 43(1) : 39-45
5. Thomas Jk, Richard A, Goldsby ,Barbara A, Osborne. Kuby immunology. 6th ed, epublic. 2008 : 341-64.
6. Joo JH. Dangeuuijip. Seoul university publishing department. 2000 : 579.
7. Jang GB. Gyeongakjeonseo. Hanmi Medicine. 2009 : 2873.
8. Heo J. Donguibogam. 2nd ed, Yeokang publication. 2001 : 547.
9. Oh CK. Effects of Hwangkeumjagyag-tang Water Extract on the Plasm Cortisol Concentration and on the Analgesic Effect. J Korean Orient Med Ext Sci. 1990 ; 3(1) : 41-57.
10. Lee S. The study of Abdominal pain, diarrhea, and pain relief results of Hwanggeumjakyak-tang. Daegu Haany University. 1988.
11. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DY, Bu YM. Hanyakbonchohak. 2nd ed. Younglimsa. 2006 : 209-11.
12. Jo SH, Kim YL. Antimicrobial Characteristics of Scutellariae Radix Extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010 ; 30(5) : 964-8.
13. Lee JK, Song YK, Lim HH. Analgesic and Anti-Inflammatory Effect of Scutellaria Baicalensis. J Korean Oriental Med. 2007 ; 28(4) : 124-35.
14. Oh WW, Cho SI. Anti-Oxidative Effects of Scutellariae Radix. Kor J Herbology. 2005 ; 20(3) : 67-74.
15. Ciesielska E, Gwardys A, Metodiewa D. Anticancer, antiradical and antioxidative actions of novel Antoksyd S and its major components, baicalin and baicalein. Anticancer Res. 2002 ; 22(5) : 2885-91.
16. Ye F, Xui L, Yi J, Zhang W, Zhang DY. Anticancer activity of Scutellaria baicalensis and its potential mechanism. J Altern Complement Med. 2002 ; 8(5) : 567-72.
17. Nan JX, Park EJ, Kim YC, Ko G, Sohn DH. Scutellaira baicalensis inhibits liver fibrosis induced by bile duct ligation or carbon tetrachloride in

- rats, *J Pharm Pharmacol*, 2002 ; 54(4) : 555-63.
18. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DY, Bu YM. *Hanyakbonchohak*, 2nd ed. Younglimsa, 2006 : 860-5.
 19. Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NK and Baek NI. Isolation and Structure Determination of Antioxidants from the Root of *Paeonia lactiflora*. *J Korean Soc Appl Bio Chem*, 1999 ; 42(2) : 170-5.
 20. Hong ND, Kim CW, Shin, HD. A Study on the Analgesic and Anti-convulsional Effect of *Paeoniae Radix*. *Korean J Pharmacogn*, 1979 ; 10(3) : 119-24.
 21. Choi IH, Kim YH, Lee DN, Kim HJ. Antifungal Effects of Cinamon Ramulus, Pulsatillae Radix, Dictamni Radicis Cortex, *Paeoniae Radix*, Arecae Semen, Artemisiae Capillaries Herba against *Candida albicans*. *Korean J Orient Physiol Pathol*, 2005 ; 19(3) : 690-5.
 22. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DY, Bu YM. *Hanyakbonchohak* 2nd ed : Younglimsa, 2006 : 787-92.
 23. Kim BW. Anti-inflammatory Effect of *Jakyakgamcho-tang*. *J Korean Oriental Inten Med*, 2010 ; 31(2) : 365-71.
 24. Kim CJ, Seo BS. *Pothological physiology (I)*, 5th ed. Sin-Il sangsa, 2006 : 238-9.
 25. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*, 2003 ; 37 : 355-61.
 26. Kim JH Jung HY, Roh MS, Ahn YM, Kang UG, Kim YS, Cho SC. Developmental Changes in the Activation of Signal Transduction Pathway via JNK in Rat Hippocampus after Kainic Acid-Induced Seizure. *J Korean Neuropsychiatr Assoc*, 2001 ; 40(5) : 971-80.
 27. Song H. Regulation of Cell Migration by MAPK Signaling Pathways. Dept of Pharmacy Duksung Women's Universty, 2006 : 34-5