

## 대식세포에서 萊連丸 물추출물의 항염증작용에 관한 연구

윤여환<sup>#</sup>, 김성배<sup>#</sup>, 강옥화, 문수현, 서윤수, 양다운, 강다혜, 위경, 임재수, 김마룡, 곽남일, 공룡, 권동렬<sup>\*</sup>

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광 한약연구소, 원광대학교 한의학전문대학원 BK21 plus 사업팀

### The Study of Anti-inflammatory Effect of *Suryeon-hwan* Water Extract in RAW 264,7 Cells

Yeo-Hwan YOON<sup>#</sup>, Sung-Bae KIM<sup>#</sup>, Ok-Hwa KANG, Su-Hyun MUN, Yun-Soo SEO,  
Da-Wun YANG, Da-Hye KANG, Gyeong Wi, Jae-Soo LIM, Ma-Ryong KIM,  
Nam-Won KWAK, Ryong KONG, Dong-Yeul Kwon<sup>\*</sup>

Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, and BK21 Plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea.

### ABSTRACT

**Objectives** : *Suryeon-hwan* (SRH) exhibits potent anti-inflammatory activity with an unknown mechanism. However, there has been a lack of studies regarding the effects of SRH on the inflammatory activities and effector inflammatory disease mechanism about macrophage before is not known. So, the investigation focused on whether SRH inhibited nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) productions, as well as the expressions of inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-6 (IL-6), and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in LPS-stimulated RAW 264,7 cells.

**Methods** : Cells were treated with 200 ng/mL of LPS 30 min prior to the addition of SRH. Cell viability was measured by MTS assay. The production of nitric oxide (NO) was determined by reacting cultured medium with Griess reagent. The content of level of cytokines (PGE, IL-6) in media from LPS-stimulated Raw 264.7 cells was analyzed by ELISA kit. The expression of COX-2, iNOS and MAPKs was investigated by Western blot, RT-PCR.

**Results** : We found that SRH inhibited LPS-induced NO, PGE<sub>2</sub> and IL-6 productions as well as the expressions of iNOS and COX-2. Furthermore, SRH suppressed the LPS-induced phosphorylation of MAPK and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) activation.

**Conclusions** : These results suggest that SRH has inhibitory effects on LPS-induced PGE<sub>2</sub>, NO, and IL-6 production, as well as the expressions of iNOS and COX-2 in the murine macrophage. These inhibitory effects occur through blockades on the phosphorylation of MAPKs following activation.

**Key words** : *Suryeon-hwan* (SRH); anti-inflammatory activity; RAW 264,7 cells; mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

### 서론

萊連丸은 黃連과 吳茱萸 각각 2兩씩 같은 양으로 배합된 처방으로 左金丸에서 그 처방이 유래되는 것으로 보인다. 左金丸은 朱震亨의 《丹溪心法》에 처음 수록되는 처방으로 "黃

連 六兩 吳茱萸 一兩 上爲末 爲丸 治肝火<sup>1)</sup>"라고 하여 清肝瀉火 降逆止嘔의 효능이 있어 肝火犯胃證과 관련된 脇肋脹痛, 嘈噯吞酸, 嘔吐口苦, 脘痞噯氣 등의 증상을 치료하고, 현대에는 急慢性胃炎, 胃十二指腸潰瘍, 口腔潰瘍 등의 병증 등 脾胃疾病에 사용된다<sup>2)</sup>. 최근 연구에서는 histamine과 serotonin

\*Corresponding author : Dong-Yeul Kwon, Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy Wonkwang University  
· Tel : +82-63-850-6802 · FAX : +82-63-852-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr

#First author : Yeo-Hwan YOON, Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy Wonkwang University  
· Tel : +82-63-850-6802 · FAX : +82-63-852-6802 · E-mail : queen7443@nate.com

Sung-Bae KIM, BK21 Plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University  
· Tel : +82-63-850-6802 · FAX : +82-63-852-6802 · E-mail : suaa10@naver.com

· Received : 13 October 2014 · Revised : 4 November 2014 · Accepted : 4 November 2014

수용체에 대한 작용으로 장 수축작용을 나타내고 위액분비를 증가시키며<sup>3)</sup>, 혈관수축에 미치는 영향<sup>4)</sup>, 배합비율에 따라 간 보호 효과<sup>5)</sup> 등이 보고되고 있다. 그러나 茺藟丸의 대식세포를 매개로한 항염증 기전에 관한 연구 보고는 없었다.

염증은 물리적인 외상, 유해화학물질, 미생물 또는 약품 등에 의해 야기되는 조직손상에 대한 정상적인 보호반응으로 침입하는 유기체를 불활성화 시키거나 파괴해서 이를 제거하고 조직을 정상적으로 유지시키는데 기여한다. 면역세포들은 조직 사이를 이동하거나 혈관을 통과하여 염증장소까지 이동하게 되는데, 항원이 있는 곳으로 면역세포를 유인하기 위해 혈관이 확장되어 조직이 붓어지게 되며 다양한 생리활성물질들이 분비되어 통증이 나타나게 된다. 염증반응이 일어나면 항원이 효과적으로 제거되는데 반응이 오히려 과도하게 나타나거나 지속적으로 나타나게 되면 주변조직이 손상되어 급성 또는 만성 염증질환이 발병하기도 한다<sup>6-7)</sup>.

LPS에 의해 활성화된 세포실험모델은 여러 물질의 항염증 효과를 평가하는데 널리 이용된다. LPS는 그람음성균 외막의 주요성분으로 급성쇼크를 유도하고, IL-6과 같은 염증매개물질의 생산을 자극한다. 이런 염증 반응은 항원의 제거에 유리하게 작용하지만 과도하면 염증매개체를 다량으로 생산하게 되어 조직손상이나 장기 부전을 유발한다<sup>6-8)</sup>. IL-6는 염증성 cytokine으로 여러 가지 세포에서 발현하며, 여러 인자들을 활성화시키고, T세포들도 활성화 시키는 등 생리학적으로 다양한 기능을 하며 병리학적으로도 중요하다<sup>9)</sup>.

COX는 AA(Arachidonic Acid)를 PGs(Prostaglandins)로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2가 있다. COX-1은 체내에서 혈소판 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용한다<sup>10)</sup>. COX-2는 cytokine과 같은 염증 자극에 의해 유도되는 유도성 효소로 PGs를 합성하여 염증반응을 매개하므로, 염증억제약물의 작용기전은 통상적으로 PGs의 합성을 억제하는 것으로 다시 말하면 COX-2의 생성 및 활성 저해를 목적으로 한다. NO (Nitric Oxide)는 가스 상태의 신호전달물질로 대식세포나 호중구 등의 면역과정에서 분비되며 NOS (NO Synthase)에 의해 생성되는데, iNOS는 NOS의 isoform으로 cytokine, LPS 등에 의해 유도되는 염증유발인자이다. 과도한 활성으로 심혈관계 장애나 관절염 등이 야기된다<sup>11)</sup>.

MAPKs는 세포의 자극을 세포막에서 세포내 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달경로로 성장호르몬, cytokine, stress 등의 수용체로부터 활성화된 신호를 세포내로 전달하여 세포의 증식, 분화, 사멸 등 다양한 기능을 담당한다. 크게 ERK(the Extracellular signal-activated kinase), JNK(the c-JUN N-terminal kinase), p38 MAPK로 분류할 수 있다. ERK는 성장호르몬의 신호전달에 관여하며 세포의 증식과 분화에 중추적인 역할을 담당하고, JNK와 p38 MAPK는 세포 외부의 스트레스성 자극에 의해 활성화되며 염증반응, 세포사멸 등을 매개한다<sup>12)</sup>.

이에 본 연구에서는 茺藟丸 물추출물의 항염증 활성을 조사하기 위해 LPS로 자극된 RAW 264.7세포에서 염증성 사이토카인 생성과 그것을 억제하는 기전을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

자극원으로 사용한 LPS (*E. coli* lipopolysaccharide), 세포 배양에 사용되는 RPMI-1640 배지는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, FBS) 및 항생제는 김코/RBL사 (Gibco/RBL)로부터 구입하였다. 조직배양 플레이트와 직경 100mm 페트리접시는 넉스사 (Nunc, Inc, USA)로부터 구입하여 사용하였다. PGE<sub>2</sub>, IL-12와 IL-6는 효소결합면역측정(ELISA) 키트를 R&D시스템스(MN, USA)로부터 구입하였으며, COX-2, iNOS, MAPKs (ERK, JNK, p38), 단일세포 항체 및 peroxidase-conjugated 된 secondary antibody 는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였다.

#### 2) 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
iNOS	forward	5'-CATGTTCTCTGGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACTAGGTTTCCGAGTA-3'
COX-2	forward	5'-CACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'
	reverse	5'-GATTAGTACTGTAGGTTAATG-3'
IL-6	forward	5'-CATGTTCTCTGGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACTAGGTTTCCGAGTA-3'
β-actin	forward	5-ATGAAGATCCTGACCGAGCGT-3'
	reverse	5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

### 2. 방법

#### 1) 시료의 조제방법

茺藟丸 추출물은 대한한약국에서 구입한 오수유, 황련을 3차 증류수 (100g/L)로 2시간 환류 추출하여 준비하였다. 그 추출물을 0.45 μm filter paper로 여과 후 rotary evaporatory (EYELA, JAPAN)로 감압 농축 후 동결 건조하였으며, 2.8g이 얻어져 4℃에서 보관하였다. 동결건조된 추출물은 실험하기 위하여 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 용해하였다(Table 2).

Table 2. The composite of *Suryeon-hwan*

Herb name	Pharmacognostic name	Weight (g)
黃連	Coptidis Rhizoma	15
吳茺萸	Evodiae Fructus	15

#### 2) 세포 배양

본 실험에 사용된 세포인 murine macrophage cell line, RAW 264.7는 한국 세포주 은행으로부터 구입하여 사용하였다 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology American Tissue Culture Collection). 대식세포주는 항생

제 및 항균제로서 100 U/ml의 페니실린 G과 100 U/ml의 streptomycin을 첨가하고 10% 열처리 우태아 혈청(heat inactivated FBS)을 첨가한 완전한 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>의 습한 대기, 37°C의 온도조건으로 배양하였다. 이 때 사용한 FBS는 사용하기 전 55°C에서 1시간 heat-inactivation 시켜 사용하였다.

### 3) 시료의 처리

100mm culture dish에 부착된 세포들을 cell scraper를 이용하여 세포를 이탈시킨 후, hemocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. 이 후 실험방법에 따라 적정 농도로 희석한 후 well-plate에 접종하여 배양하였다. 茱連丸 물 추출물은 각각 PBS에 용해시킨 후 접종한지 24시간 후에 RAW 264.7 세포만을 배양한 정조균인 대조군, lipopolysaccharide (LPS, Sigma Chemical)로 자극한 대조군, LPS 와 시료를 농도별로 동시에 처리한 군으로 분류하였다.

### 4) NO 생성량 측정

PBS로 희석한 SRH를 여러 농도(100, 250 µM)로 처리하고 여기에 LPS (200 ng/ml)를 각각 주입한 다음 상기 대식세포주 RAW264.7을 24시간 배양하였다. 대식세포주의 상층액을 수집하여 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 ELISA 리더기를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 세포가 없는 배양액은 아질산이 0-30 µM로 나타나, 이 값을 표준으로 하여 여러 실험군의 아질산 값의 흡광도를 측정하였다.

### 5) MTS 분석

RAW 264.7 세포 ( $5 \times 10^4$  cells/well)를 96-well culture plate에 100 µl의 RPMI 1640배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 茱連丸 추출물 (50, 100, 250 과 500 µg/mL)을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTS 용액을 50 µL 씩 넣은 후 2시간 동안 배양하면서 환원 반응을 유도하여 발색정도를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성(cell toxicity)은 세포만 배양한 무 처리군의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포 생존도를 계산하였다.

### 6) ELISA

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여  $5 \times 10^5$  cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 茱連丸을 각각 100, 250 µg/mL 농도로 1시간 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/ml)로 RAW 264.7 대식세포주를 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 IL-6생성량을 ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

### 7) PGE<sub>2</sub>

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여  $5 \times 10^5$  cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 茱連丸을 각각 100, 250 µg/mL 농도로 1시간 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/ml)로 RAW 264.7 대식세포주를 자극한 후 세포부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE<sub>2</sub> 생성양을 EIA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

### 8) RNA 분리 및 RT-PCR

茱連丸에 의한 COX-2와 iNOS 발현과의 상관성을 알아보기 위하여 RT-PCR로 mRNA 발현을 조사하였다. RNA 및 RT-PCR RNA 세포의 준비는 6-well culture plate에  $3 \times 10^5$  세포로 분주한 다음, 하루 밤 동안 안정화 시켰다. 이 세포에 茱連丸 물 추출물 (100과 250 µg/mL)을 처리한 후, LPS로 자극하고 24시간 후에 세포를 모아 PBS로 세척하여 이지 블루 (easy blue, 인트론사) 1 ml를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200 µl를 넣고 다시 교반하여 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 한 다음, 상등액 400µl에 이소프로판올을 가하여 다시 원심분리하여 RNA 펠렛을 얻었다. 여기서 얻어진 RNA에 MuLV 역전사효소(reverse transcriptase), 1mM dNTP 0.5µg을 넣어 cDNA를 만들었다. 여기에 COX-2, iNOS 와 β-actin 프라이머를 넣고 유전자 증폭기(thermal cycler)를 이용하여 증폭시켰다. 만들어진 RNA를 2% 아가로스 겔에 전기 영동시켜 UV 검출기로 확인하였다.

### 9) Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척 한 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. 20-30µg의 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 TBST(0.1% Tween20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. MAPKs의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 JNK, ERK anti-mouse (1 : 1000) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 TBST 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1 : 2000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1-3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

10) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과를 각 항목에 따라 평균치±표준편차 (SEM)를 구하여 그 유의성은 Student's *t*-test(SPSS, ver.19) 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% (*p* < 0.05)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. 茱連丸의 세포생존율에 대한 영향

RAW 264,7세포에서 茱連丸의 세포독성을 MTS assay 방법으로 조사하였다. 그 결과, 茱連丸(50, 100, 250 과 500µg/mL)의 농도로 처리 하였을 때 RAW 264,7 50-250µg/mL의 농도에서 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다(Fig. 1). 따라서 이후 실험은 茱連丸 물추출물(SRH)의 세포독성이 없는 농도범위에서 수행하였다.

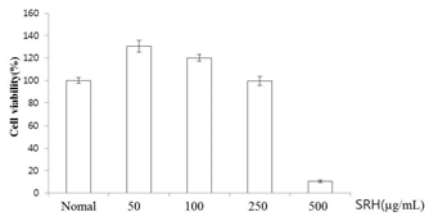


Fig. 1. Effect of SRH on cell viability in RAW 264.7 cells. The cell viability assessed using an MTS assay following incubation with different doses (50, 100, 250 and 500 µg/mL) of SRH for 24 hours.

2. Nitric oxide(NO) 생성에 대한 茱連丸의 억제 효과

NO는 활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 NO 생성에 대한 茱連丸의 효과를 알아보기 위해 Griess assay 방법을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sup>2-</sup>의 형태로 측정하였다. 茱連丸 물추출물(SRH)은 100 µg/mL, 250 µg/mL의 처리농도에서 각각 농도 의존적이고 유의적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

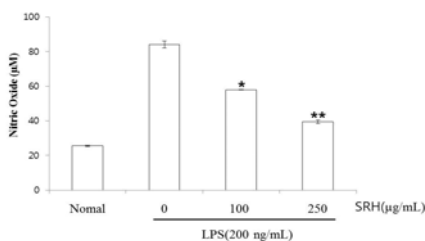


Fig. 2. Effect of SRH on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells, RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Statistical significance: \**P*<0.05, \*\**P*<0.005.

3. iNOS protein과 iNOS mRNA 발현에 대한 茱連丸의 억제 효과

NO는 iNOS에 의해 생성되어 염증상태에서 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 NO를 생성하게 하는 iNOS의 protein과 mRNA 발현을 알아 보기위해 Western blot과 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 형성되는 iNOS의 protein과 mRNA 발현 모두 100, 250 µg/mL에서 현저한 억제 양상을 보였다(Fig. 3A, 3B).

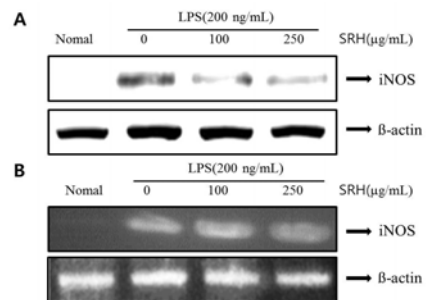


Fig. 3. Effect of SRH on LPS-induced iNOS protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. (B) iNOS mRNAs were assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours.

4. PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 茱連丸의 억제 효과

대식세포 매개 PGE<sub>2</sub>는 COX-1과 COX-2로부터 생성되는데, 소량의 경우 생체대사에 필수적이지만 유도성 COX-2의 과발현에 의한 과량의 PGE<sub>2</sub>는 강력한 염증 매개물질로 작용하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 PGE<sub>2</sub>를 대상으로 茱連丸의 약리학적인 효능 평가를 실시하였다. 茱連丸을 각각 100 µg/mL, 250 µg/mL의 농도로 30분 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/ml)로 RAW 264.7 대식세포주를 자극한 후 세포부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. 그 결과, control에서는 PGE<sub>2</sub> 생성량이 매우 낮게 측정되었으며, LPS에 의해 현저히 증가 되었다. 茱連丸은 100 µg/mL, 250 µg/mL의 처리농도에서 각각 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub> 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

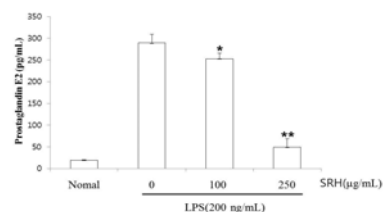


Fig. 4. Effect of SRH on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. \**P*<0.05, \*\**P*<0.005

### 5. COX-2 protein과 COX-2 mRNA 발현에 대한 茺蓮丸의 억제 효과

茺蓮丸의 COX-2 protein과 COX-2 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 Western blot과 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 COX-2 mRNA 발현은 100 µg/mL, 250 µg/mL 농도에서 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 5A, B).

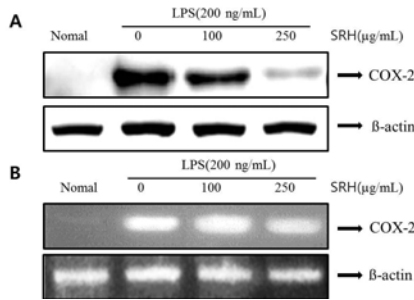


Fig. 5. Effect of SRH on LPS-induced COX-2 (A) protein and (B) mRNA expression in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. (B) COX-2 mRNAs were assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours.

### 6. Pro-inflammatory cytokine IL-6에 대한 茺蓮丸의 억제 효과

대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 염증성 사이토카인 IL-6의 생성과 발현을 ELISA와 RT-PCR을 이용하여 실험하였다. 그 결과, LPS 자극원을 처리하였을 때 IL-6의 생성이 현저히 증가하였고, 茺蓮丸을 처리하였을 때 IL-6의 생성 억제 효과가 나타났다(Fig. 6).

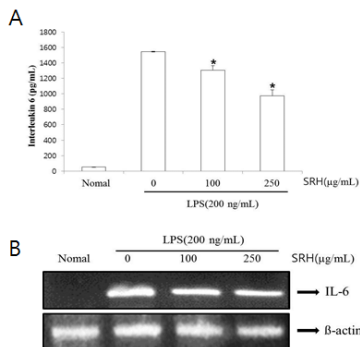


Fig. 6. Effect of SRH on LPS-induced IL-6 production and mRNA expression. (A) Production of IL-6 was measured by ELISA. (B) IL-6 mRNA was assessed by RT-PCR. Cells were pretreated with the indicated concentrations of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 24 hours.

### 7. MAPKs의 인산화에 대한 茺蓮丸의 억제 효과

MAPKs는 세포의 성장과 분화 및 사이토카인과 스트레스 제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 茺蓮丸의 억제 메커니즘이 MAPKs를 경유하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를

Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 LPS에 의해 활성화 된 RAW 264.7 대식세포에 茺蓮丸을 100, 250 µg/mL을 처리한 경우 JNK 1/2 와 ERK1/2 인산화를 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 7A, B). 그러나 p38의 인산화에는 영향이 없는 것을 확인할 수 있었다.

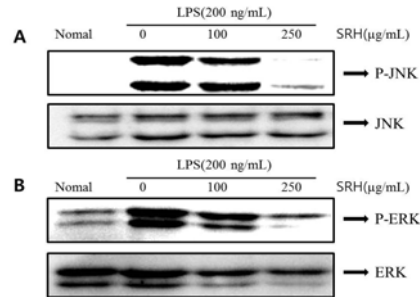


Fig. 7. Effect of SRH on the phosphorylation (P-) of MAPKs in LPS-stimulated RAW 264.7 cells: RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of SRH for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/ml) for 30 minutes.

## 고찰

茺蓮丸은 左金丸에서 그 처방이 유래되는 것으로 보이며, 茺蓮丸이란 이름은 左金丸의 異名으로 불리기도 하였으나, 醫學正傳(1515)에서 半夏, 白茯苓, 吳茺萸, 陳皮, 蒼朮 각 2兩, 黃連 2.5兩의 구성이 보이고, 東醫寶鑑(1613), 方藥合編(1884)에 黃連, 吳茺萸 각 2兩의 구성이 나타나는 것으로 보아 左金丸의 배합이율을 조정하여 赤白痢疾을 주증상으로 하여 치료하는 다른 목적의 방제로 나왔다고 볼 수 있다. 黃連과 吳茺萸의 藥對는 一寒一熱과 辛開苦降의 상반되는 성질을 이용하여 黃連의 苦寒한 性味는 肝經의 橫逆之火를 瀉하고 和胃降逆하며, 吳茺萸의 辛熱한 性味는 疏肝解鬱 降逆止嘔하는 한편 黃連의 寒凉한 性을 制하므로, 清肝瀉火 降逆和胃 開鬱散結의 효능을 갖게 되어 肝鬱化火橫逆犯胃로 인한 脇肋脹痛 嘔吐吞酸을 치료할 수 있다. 이외에도 黃連의 清腸止痢와 吳茺萸의 溫中行氣를 배합하여 清熱燥濕止痛의 효능을 갖게 되어 大便血과 痔瘡腫痛 등을 치료할 수 있다<sup>13)</sup>.

조성약재인 黃連, 吳茺萸에 대한 연구는 비교적 많이 되어 있다. 黃連의 약리효능에 대해서 항산화<sup>14)</sup>, 고지혈증 강하<sup>15)</sup>, 항균<sup>16-17)</sup> 등이 보고되었고, 黃連추출물이 *Helicobacter pylori*의 성장을 억제하고<sup>18)</sup>, LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제하며<sup>19)</sup>, 주요성분인 berberine이 항염증 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 吳茺萸의 약리효능으로 항암<sup>21)</sup>, 항염증<sup>22)</sup>, 과민성 설사에 대한 효과<sup>23)</sup> 등이 보고되었고, 吳茺萸 추출물이 신경세포 보호 효과<sup>24)</sup>, 고혈압 조절 활성<sup>25)</sup>이 있는 것으로 알려져 있고, 주요성분이 evodiamine의 항염증 효과<sup>26-27)</sup>가 잘 알려져 있다. 이를 통해 黃連, 吳茺萸로 이루어진 左金丸은 주요성분인 berberine과 evodiamine을 봤을 때 항염증 효과가 탁월할 수 있음을 예상할 수 있었고, 유의성 있는 효과가 있음이 보고되었다<sup>28)</sup>. 이에 본 논문에서는 左金丸과 비율이 다른 茺蓮丸에서 항염증 효과가 어떻게 나타나는지 알아 보고자 한다.

본 연구는 여러 한약 처방 중 새로운 항염증 약물을 검색

하는 과정에서 芫連丸이 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과를 나타냄을 발견하였다. 芫連丸은 *in vitro*에서 항염증 효과와 그 기전은 보고된 바가 없었다. 따라서 본 연구에서 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 LPS로 유도된 염증반응에서 芫連丸이 어떤 작용 기전을 통해 항염증 효과를 나타내는지 연구하였다.

그람 음성 세균 세포외막의 성분인 LPS는 대식세포에서 면역기능을 조절하는 여러 분자, 즉 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 pro-inflammatory 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와 준다<sup>29,30</sup>. 그러나 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10의 지나친 분비는 조직 손상, 폐혈증이나 염증성 장 질환과 같은 자가 면역 질환을 야기한다<sup>31-35</sup>.

대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 한다. 또한, 초기 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로서 동물체 내 모든 조직에 존재하며 외부 이물질을 탐지하고 포식하여 죽은 세포를 제거하는 포식작용과 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)을 비롯하여 eicosanoids, ROS, NO, PGE<sub>2</sub>, superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 등의 다양한 염증 매개물질들을 분비하는 면역세포이다<sup>36-39</sup>. 최근, LPS에 의한 대식세포의 활성화는 toll-like receptor (TLR) 4의 발현을 조절한다는 알려져 있다. LPS와 TLR4가 결합하여 활성화 되면 세포질 조절 단백질인 MyD88이 모이게 되고 여러 신호전달기전을 통하여 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)가 세포질내로 이동하여 활성화 된다고 보고되고 있다<sup>40</sup>. 이러한 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화는 염증매개물질들인 NO, prostaglandins(PGs) 그리고 pro-inflammatory cytokines 등을 조절한다<sup>41</sup>. 이러한 사실에 기초하여 芫連丸이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 저해함을 확인하였다. 또한 Western blot으로 분석한 결과 芫連丸에 의한 iNOS의 발현 억제는 NO 형성 억제와 유사한 경향을 나타냄으로써 NO 형성 억제는 iNOS의 발현 저해를 경유한 것임을 알 수 있었다. 芫連丸이 LPS에 의해 유도된 iNOS 단백질 및 mRNA 발현을 저해하는 것으로 보아 芫連丸이 LPS에 의해 유도된 iNOS의 전사와 번역 모두를 저해한다고 추정된다. 다수의 항염증 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성을 억제하며 이는 COX-2의 생성 및 효소 활성저해에 의한 것이다. 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다고 보고 芫連丸이 LPS에 의해 형성되는 PGE<sub>2</sub>를 유의성 있게 감소시키며 이는 COX-2 단백질과 mRNA의 발현저해에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 염증매개물질인 IL-6는 *in vivo* 및 *in vitro* 모두에서 염증반응을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이러한 cytokine들은 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 LPS등의 염증 자극 물질에 의해 생성이 유도된다고 보고되었다<sup>42,43</sup>. 따라서 본 연구에서 LPS에 의해 유도된 IL-6발현에 대한 芫連丸의 억제 효과를 실험하였다. 그 결과, IL-6 발현을 ELISA로 분석하고, 이러한 COX-2, iNOS 그리고 pro-inflammatory cytokines의 발현에 대해 조사하였다.

또한, 현재까지 비교적 잘 알려진 염증반응의 분자신호 전달기전은 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소들로 extracellularregulated protein kinase (ERK), c-Jun NH2

-protein kinase (JNK)/stress-activated protein kinase (SAPK), serine/threonine protein kinase인 p38 MAPK 등을 들 수 있다. 이들 MAPKs는 모두 다양한 세포의 자극에 반응해 upstream MAPK kinase (MEK)에 의해 tyrosine과 threonine에서 인산화가 일어남으로써 활성화된다. 위의 MAPKs의 활성화는 그 후에 다른 kinase나 전사 인자를 인산화, 활성화 시키고, 결국 표적 유전자의 발현을 변화시킨다.

따라서 본 연구에서도 芫連丸이 NO, COX-2와 IL-6 같은 염증매개체들을 어떠한 신호전달을 통해 억제하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를 억제하는지 알아보았다. 그 결과 芫連丸이 MAPKs의 인산화에서는 JNK 1/2 와 ERK 1/2 인산화는 억제하는 반면 p38 MAPK의 인산화에는 아무런 영향을 주지 못했다. 이는 LPS로 유도한 대식세포의 염증반응은 JNK 1/2 와 ERK 1/2의 신호전달 경로를 경유하는 반면 p38의 경로와는 다르다는 것을 보여준다.

본 실험 결과를 요약하면, 芫連丸은 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2와 IL-6 유전자의 발현, PGE<sub>2</sub> 생성을 효과적으로 저해한다. 그러므로 이러한 결과들은 한의학에서 芫連丸의 항염증 기전을 밝힘으로써 그 과학적 근거를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

설치류의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 芫連丸의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 芫連丸은 LPS로 유도된 대식세포에서 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
2. 芫連丸은 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 protein 생성과 mRNA발현을 억제하였다.
3. 芫連丸은 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 IL-6생성과 발현을 현저하게 억제하였다.
4. 芫連丸 처리 시 LPS로 유도된 MAPKs 인산화의 활성을 저해 하는지 알아보기 위해 western blot을 수행한 결과 MAPKs (JNK 1/2, ERK1/2 but not p38), 인산화가 억제되었다.

이와 같은 결과로 보아 芫連丸은 대식세포에 작용하여 MAPKs의 인산화 활성의 저해를 통해 NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 생성과 iNOS, COX-2 발현을 억제함으로써 항염증에 효과가 있음을 알 수 있다.

## 감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of

Education (NRF-2013R1A1A2064673)

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (2008-0062484)

## References

- Joo JH, danguesimbubbyeo, daesung. 1993 : 369.
- Seo BI, Lee JH, Kwon DY, Bu YM, Hanyakbonchohak. 2nd ed, Seoul : Younglimsa, 2006 : 214-6, 451-3
- Choi DH, Moon G, Moon SJ. Effects of Joakeumwhan Extract on Motility of Intestine and Gastric Secretion, *J Wonkwang Orient Med*, 1993 ; 3(1) : 133-47.
- Kim YH, Seong NS, Lee YJ, The Effects of jwa kum-whan and Soo Ryeon-Whan on the Hyperlipidemia in Rats, *Kor J Herbology*, 2005 ; 20(2) : 91-102.
- Son CW, Lee HJ, Liou JL, Shin HM, Role of K<sup>+</sup> Channels in the Vasodilation of Jagumhuan, *Korean J Orient Physiol Pathol*, 2005 ; 19(3) : 743-8.
- Tizard IR. Immunology, An introduction inflammation, 2nd ed, New York : Saunders College Publishing, 1996 : 423-41.
- Willoughby DA, Heberden Oration : Human arthritis applied to animal models, Toward a better therapy, *Ann Rhuem Dis*, 1975 ; 34(6) : 471-8.
- Watson WH, Zhao Y, Chawala RK, S-adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), *Biochem J*, 1999 ; 342(Pt 1) : 21-5.
- Strieter RM, Koch AE, Antony VB, Fick Jr RB, Standiford TJ, Kunkel SL, The immunopathology of chemotic cytokine : the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, *J Lab Clin Med*, 1994 ; 123(2) : 183-97.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P, Pharmacological and biochemical demonstration of the role of COX-2 in inflammation and pain, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994 ; 91(25) : 12013-7.
- Kim SJ, Jeong HJ, Moon PD, Lee KM, Lee HB, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK, Yang DC, Hong SH, Kim HM, Anti-inflammatory activity of gumiganghwaltang through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation in peritoneal macrophages, *Biol Pharm Bull*, 2005 ; 28(2) : 233-7.
- Caivano M, Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages, *FEBS Lett*, 1999 ; 429(3) : 249-53.
- Kim YH, Lee YJ, literature investigation of joakeumwhan, Kyungwon University Korean Medicine lab collection of dissertations 2003 : 71-80.
- Yokozawa T, Ishida A, Kashiwada Y, Cho EJ, Kim HY, Ikeshiro Y, Coptidis Rhizoma : protective effects against peroxynitrite-induced oxidative damage and elucidation of its active components, *J Pharm Pharmacol*, 2004 ; 56(4) : 547-56.
- Yokozawa T, Ishida A, Cho EJ, Nakagawa T, The effects of Coptidis Rhizoma extract on a hypercholesterolemic animal model, *Phytomedicine*, 2003 ; 10(1) : 17-22.
- Hu JP, Takahashi N, Yamada T, Coptidis Rhizoma inhibits growth and proteases of oral bacteria, *Oral Dis*, 2000 ; 6(5) : 297-302.
- Higaki S, Hasegawa Y, Morohashi M, Sakamoto K, Yamagishi T, The influence of coptidis rhizoma to lipase activity of Propionibacterium acnes, *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi*, 1990 ; 100(8) : 883-6.
- Bae EA, Han MJ, Kim NJ, Kim DH, Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines, *Biol Pharm Bull*, 1998 ; 21(9) : 990-2.
- Jung HW, Park YK, Effects of subfractions of Coptidis Rhizoma extract on the nitric oxide production in LPS-stimulated BV2 microglial cells, *Kor J Herbology*, 2007 ; 22(2) : 73-8.
- Kuo CL, Chi CW, Liu TY, The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Lett*, 2004 ; 20; 203(2) : 127-37.
- Zhang Y, Zhang QH, Wu LJ, Tashiro S, Ondera S, Ikejima T, Atypical apoptosis in L929 cells induced by evodiamine isolated from *Evodia rutaecarpa*, *J Asian Nat Prod Res*, 2004 ; 6(1) : 19-27.
- Matsuda H, Yoshikawa M, Iinuma M, Kubo M, Antinociceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*, *Plant Med*, 1998 ; 64(4) : 339-42.
- Matsuda H, Wu JX, Tanaka T, Iinuma M, Kubo M, Antinociceptive activities of 70% methanol extract of *evodiae fructus* (fruit of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*) and its alkaloidal components, *Biol Pharm Bull*, 1997 ; 20(3) : 243-8.
- Kim ST, Ahn SH, Kim JD, Kim YK, Protective Effect of  $\langle$ EOH Extract of *Evodia officinalis* on Cyanide-induced Neurotoxicity in Cultured Neuroblastoma Cells, *Kor J Pharmacogn*, 2003 ; 34 : 282-7.
- Kang SI, Kim HC, Rhee HM, Yang JS, Jung SY, Studies of *Evodiae Fructus* on the blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *J Korea Med Sci*, 1998 ; 19(2) : 50-8.
- Noh EJ, Ahn KS, Shin EM, Jung SH, Kim YS, Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression by dehydroevodiamine through suppression of NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 macrophages, *Life Sci*, 2006 ; 79(7) : 695-701.

27. Takada Y, Kobayashi Y, Aggarwal BB. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF- $\kappa$ B activation by inhibiting I $\kappa$ B- $\alpha$  kinase activation, thereby suppressing NF- $\kappa$ B regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J Biol Chem*. 2005 ; 280(17) : 17203-12.
28. Sung MJ. Anti-inflammatory effect of Joakeumhwan. wonkwang university. 2008.
29. Bhattacharyya A, Pathas S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J*. 2002 ; 368(Pt 1) : 121-9.
30. Binetruy B, Smeal T, Kariu M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature*. 1991 ; 351(6322) : 122-7.
31. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med*. 1996 ; 184(4) : 1397-411.
32. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell*. 1993 ; 73(3) : 457-67.
33. Lu XL, Zhang SL, Wang ZS. Analysis of andrographolide compounds. I. Ion pair high performance liquid chromatographic analysis of andrographolide derivatives. *Yao Xue Xue Bao*. 1981 ; 16(3) : 182-9.
34. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Tumor necrosis factor alpha mRNA remains unstable and hypoadenylated upon stimulation of macrophages by lipopolysaccharides. *Immunity*. 1999 ; 10 : 387-98.
35. La Sala A, Gadina M, Kelsall BL. G(i)-protein-independent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J Immunol*. 2005 ; 175(5) : 2994-9.
36. Bosca L, Zeini M, Traves PG, Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*. 2005 ; 208(2) : 249-58.
37. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992 ; 6(12) : 3051-64.
38. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002 ; 53 : 35-57.
39. Wei W, Li XY, Zhang HQ, Wu SG. Antiinflammatory and immuno pharmacology. 1sted. Beijing : Renmin weisheng chubanshe. 2004 : 10-7.
40. Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A, Van Dyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharidestimulated signal transduction. *Infect Immun*. 2004 ; 72(4) : 2312-20.
41. Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, Marjanovic N, Dave M, Park J, Bingham CO 3rd, Al-Mussawir H, Abramson SB. Resolution of inflammation: prostaglandin E<sub>2</sub> dissociates nuclear trafficking of individual NF kappa B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol*. 2005 ; 175(1) : 6924-30.
42. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996 ; 14 : 397-440.
43. Yoon SB, Han HS, Lee YJ. Effect of Scutellariae Radix Extract on the Proinflammatory Mediators in Raw 264,7 Cells Induced by LPS. *Kor J Herbology*. 2011 ; 26(2) : 75-81.