

급성염증성 발열 모델에서의 항염증성 약재 혼합 추출물(YG-1)의 효과

송인봉^{1*} · 나지영^{1*} · 송기쁨¹ · 김석호¹ · 이지현³ · 권영배² · 김대기³ · 김대성⁴ · 조형권⁴ · 권중기¹

¹전북대학교 수의과대학 실험동물의학교실, ²전북대학교 의학전문대학원 약리학교실
³전북대학교 의학전문대학원 면역학교실, ⁴한풍제약

Effects of Extract Mixture (Yg-1) of Anti-Inflammatory Herbs on LPS-Induced Acute Inflammation in Macrophages and Rats

In-Bong Song^{1*}, Ji-Young Na^{1*}, Kibbeum Song¹, Sokho Kim¹, Ji-Hyun Lee³, Young-Bae Kwon², Dae-Ki Kim³, Dae-Sung Kim⁴, Hyoung-Kwon Jo⁴, and Jungkee Kwon¹

¹Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,

²Department of Pharmacology, Institute for Medical Science, and ³Department of Immunology, Institute for Medical Science, Chonbuk National University

⁴Central Research and Development, Hanpoong Pharm & Foods

ABSTRACT Traditional herbs, such as *Lonicera japonica*, *Arctii Fructus*, and *Scutellariae Radix* have been used as traditional drug due to their anti-inflammatory and anti-oxidant activities. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of extract mixture (YG-1) in a model of lipopolysaccharide (LPS)-induced acute inflammation in both macrophage (RAW 264.7) cells and Sprague-Dawley rats. YG-1 did not show specific cellular toxicity in RAW 264.7 cells until a concentration of 100 µg/mL. YG-1 reduced various markers related to inflammation such as IL-1β, COX-2, and iNOS caused by LPS in RAW 264.7 cells. Consistent with these results, YG-1 exerted significant anti-inflammatory effects in an acute inflammation rat model. Acute fever and high concentration of IL-1β in serum induced by LPS were significantly reduced by YG-1. These results were similar to flubiprofen, a commercial anti-inflammatory and anti-febrile drug. Therefore, these results indicate that YG-1 has beneficial effects on LPS-induced acute inflammation and suggest that YG-1 can serve as an effective anti-inflammatory and anti-febrile drug.

Key words: extract mixture (YG-1), lipopolysaccharide (LPS), acute inflammation, fever

서 론

인후염은 흔히 목감기라고 부르는 상기도 감염증을 말하며 목 안쪽 편도선 주위의 인두와 후두가 바이러스나 세균 등에 감염되어 염증이 생긴 상태를 말한다. 인후염은 급성과 만성으로 나뉘며 급성 인후염은 감기 바이러스나 세균감염, 비염, 열성질환 등이 원인이 되어 발생한다. 초기에는 인두의 이물감과 건조감, 가벼운 기침 등의 증상이 나타나다가 심해지면 통증과 함께 음식을 삼키기 어려워지고 고열, 두통, 전신권태 등이 나타난다. 이러한 급성 인후염이 반복해서 재발하거나 흡연, 과도한 음주, 과로, 자극성 음식 섭취, 매연, 화학물질, 장시간의 에어컨 노출 등이 원인이 되어 만성화된다.

염증은 복잡한 병리생리학적 과정으로 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중 자극성 물질에 대한 생체 방어 기전의 발현이라고 할 수 있다. 염증 반응의 주요 증상은 발열, 발적, 동통, 부종 등이며 증상의 치료에는 주로 비스테로이드성 항염증제를 많이 사용하는데 위장 장애, 신장 독성과 같은 여러 가지 부작용을 수반한다(1).

혼합 추출물(YG-1) 처방은 전통적으로 청열(淸熱), 열독(熱毒), 한열(寒熱), 열갈(熱渴), 풍한(風寒) 등에 사용되었던 약재 중 항염증, 항산화 효과가 있다는 인동등, 우방자, 황금을 선택하여 효과적인 비율로 배합하여 만든 기능성 복합 처방이다. YG-1의 구성약재들 중 인동(忍冬)은 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(*Lonicera japonica*) 또는 기타 동속 근연식물의 줄기와 가지를 말하며, 인동등(忍冬藤)이라고도 하고 청열해독(淸熱解毒)의 효능이 있다. 우방자(牛蒡子)는 우엉(*Arctium lappa* Linne)의 잘 익은 열매로써 소산풍열(疏散風熱), 청열두목이인후(淸熱頭目利咽喉), 이인해독(利咽解毒), 거담지해(祛痰止咳), 이뇨, 소염 및 피부질환 등에 이용되고 있다. 황금(黃芩)은 꿀풀과에 속한 다년생 초본인 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의

Received 27 November 2014; Accepted 24 December 2014

Corresponding author: Jungkee Kwon, Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea
E-mail: jkwn@jbnu.ac.kr, Phone: +82-63-270-3884

*These authors contributed equally to this work.

뿌리로서 청열조습(淸熱燥濕), 사화해독(瀉火解毒) 등의 효능이 있다(2).

YG-1 구성 약제들의 선행연구로는 우방자 성분 중 프록탄의 진해 작용에 대한 보고가 있으며(3), tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 분비를 감소시킴으로써 항알레르기 염증에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(4). 인동 등 수용성 추출물이 TNF- α 생성을 억제함으로써 proteinase-activated receptor 2(PAR2)로 인한 부종을 억제하고 면역 cytokine 발현을 통하여 면역력을 증가시켜준다는 보고가 있다(5,6). 황금의 약리작용으로는 항균 효과(7), 항염증 작용(8,9), 항산화 효과(10), 알레르기 천식 작용(11) 등이 보고되었다.

따라서 본 논문은 위와 같은 항염증, 항산화 효과가 있는 성분들이 상승 작용을 할 수 있게 YG-1이란 복합물을 제조하였고 이 YG-1의 급성 염증성 발열 모델에서의 치료 효능을 세포 실험뿐만 아니라 생체 실험을 통해서 평가하여 탁월한 효능의 인후염 개선 및 치료제 개발의 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

혼합 추출물(YG-1)의 제조

본 실험에 사용된 인동(*Lonicera japonica*), 우방자(*Arctii Fructus*), 황금(*Scutellariae Radix*)은 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 인동과 우방자를 각각 3:1의 비율로 넣고 20배의 30% 알코올(주정)을 넣어 85~95°C로 3시간씩 2회 추출하여 여과한 후 60°C 이하에서 감압농축 및 건조하여 YG-A(수율 13.8%)를 제조했다. 황금에 20배의 30% 알코올(주정)을 넣어 85~95°C로 3시간씩 2회 추출하고 농축 및 건조하여 YG-B(수율 39.22%)를 제조했다. 건조된 YG-A와 YG-B를 2:3의 비율로 혼합하여 YG-1을 제조하였다(Table 1).

세포

실험에 사용된 세포는 마우스 대식세포 RAW 264.7이다. 세포는 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였으며 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지(HyClone, Logan, UT, USA)를 사용하였다. 배지는 2~3일마다 교환하였으며 세포가 80% 이상 자랐을 때 phosphate buffered saline solution(PBS)으로 세척한 후 cell scraper를 사용하여 계대배양 하였다.

Table 1. Mixing rate of YG-1

Code	Scientific name of source	Ratio	Mixing ratio
A	<i>Lonicera japonica</i>	3	2
	<i>Arctii Fructus</i>	1	
B	<i>Scutellariae Radix</i>	2.25	3

세포 독성 및 생존율 측정

세포 독성 및 세포 생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 2×10^4 cell/well의 세포 부유액을 96 well plate에 각각 분주한 후 37°C, CO₂ 배양기 안에서 24시간 동안 안정화시켜 준다. 안정화된 세포는 농도별로 YG-1(up to 200 μ g/mL)을 24시간 동안 단독 처리한 군과 YG-1(up to 200 μ g/mL)을 1시간 전 처리한 뒤 lipopolysaccharide (LPS)(10 ng/mL)를 넣고 24시간 동안 배양한다. 24시간 뒤에 20 μ L MTT solution을 처리하여 최대 3시간 37°C 배양기에서 배양한 후 배지와 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide 시약(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 200 μ L를 가하여 microplate reader(BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IL-1 β , TNF- α , PGE₂의 세포 배양액 내 분비량 측정

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 배양액 내 IL-1 β (interleukin-1 β), TNF- α , PGE₂(prostaglandin E₂)의 분비를 측정하기 위해 YG-1 추출물을 처리 후 ELISA를 실시하였다. 5×10^4 cell/mL의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후 YG-1(10, 100 μ g/mL)과 flurbiprofen(2 μ g/mL)을 1시간 전 처리한 뒤 LPS(10 ng/mL)를 처리하여 10% FBS가 함유된 DMEM 배지와 함께 24시간 배양하였다. 세포를 배양한 후 각 well에서 상층액을 회수하였다. 상층액 내 IL-1 β , TNF- α (Abcam, Cambridge, MA, USA), PGE₂(R&D Inc., Minneapolis, MN, USA) ELISA kit을 사용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(12).

Nitric oxide(NO)의 세포 배양액 내 분비량 측정

5×10^4 cell/mL의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, YG-1(10, 100 μ g/mL)과 flurbiprofen(2 μ g/mL)을 1시간 전 처리한 뒤 LPS(10 ng/mL)를 처리하여 10% FBS가 함유된 DMEM 배지와 함께 24시간 배양하였다. 24시간 후 상층액을 회수하여 50 μ L의 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 0.1% naphthylethylenediamine; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 혼합 후 상온에서 빛을 차단한 상태로 20분 동안 배양한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(12).

세포 내 COX-2, iNOS의 western blotting에 의한 평가

5×10^6 cell/mL의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후 YG-1(10, 100 μ g/mL)과 flurbiprofen(2 μ g/mL)을 1시간 전 처리한 뒤, LPS(10 ng/mL)를 처리하여 10% FBS가 함유된 DMEM 배지와 함께 24시간 배양하였다. 24시간 세포 내 단백질을 RIPA buffer 처리 후 4°C에서 15,000 rpm에서 15분 동안

원심분리 하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay reagent(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 단백질 sample은 acrylamide gel 12%에서 electrophoresis를 하였고, polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 전기영동 하였다. Membrane은 실온에서 blocking buffer(PBS-T에 5% skim milk)에 blocking을 한 뒤, COX-2, iNOS(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), β -actin antibody(Cell Signaling, Danvers, MA, USA)를 1:1,000으로 하여 4°C에서 24시간 incubation 하였다. Membrane은 PBS-T로 washing 후 실온에서 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody(Millipore, Temecula, CA, USA)와 1시간 동안 반응시켰다. Supersignal West Dura extended duration substrate(Thermo, Rockford, CA, USA)를 사용하여 Chemi Imager analyzer system(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)에서 발색, 감광시켰다(12).

발열 동물 모델 제작과 약물 투여

실험에 사용된 흰쥐는 SD-rat 7주령(220~250 g)(Daejeon Science, Daejeon, Korea)이고 모두 수컷을 사용하였다. 모든 실험대상의 흰쥐는 사료와 음수를 사육기간에 마음대로 섭취하도록 하였으며 사육장 내에서 제한 없이 운동하도록 하였다. 발열 모델은 LPS(2.5 mg/kg)를 복강 투여하여 유발시켰다(13). 실험동물은 군당 5마리씩 5그룹으로 구분하였고 YG-1은 saline에 용해시켜 존대가 부착된 1 mL 주사기를 이용하여 경구투여 하였다. 발열 유발 30분전 flurbiprofen(20 mg/kg)(14), YG-1(100, 400 mg/kg)을 존대로 경구투여 하였다. 본 실험은 전북대학교 동물실험윤리위원회(IACUC)의 동물실험 승인을 받아 진행하였다(Certification Number : 2013-1-0042).

체온 측정

흰쥐는 직장체온계(MT200, Microlife, Seoul, Korea)를 사용하여 직접 직장에 넣어 체온을 측정하였다. 실험 시작 전과 LPS 투여로 인후염 유도 후 1시간이 지났을 때 측정을 한다. 이후에는 한 시간 단위로 하여 총 12번의 체온 측정을 하였다.

IL-1 β , TNF- α , PGE2의 혈청 내 분비량 측정

실험종료 각각 6시간(peak time)과 12시간(last time)에 조레틸(zoletil)로 마취한 후 심장채혈로 혈액을 채취하고 centrifuge(3,000 rpm, 5 min, 4°C)를 하여 혈청을 분리하고 -20°C에 보관하였다. 분리한 혈청은 6시간(peak time)과 12시간(last time)으로 나누어 inflammatory cytokine을 분석하였다. 혈액 내 IL-1 β , TNF- α (AbCam), PGE₂(R&D Inc.)의 양은 ELISA kit을 사용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(12).

뇌조직 내 COX-2, iNOS의 western blotting에 의한 평가

LPS 투여 후 6시간과 12시간째에 실험 종료 후 모든 흰쥐를 부검하여 뇌조직을 군별로 채취하였다. 추출한 뇌조직은 송과체 부분을 RIPA buffer 처리 후 4°C에서 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay reagent(Bio-Rad Laboratories)를 사용하였다. 단백질 sample은 acrylamide gel 12%에서 electrophoresis를 하였고, polyvinylidene difluoride membrane electro-transfer 하였다. Membrane은 실온에서 blocking buffer(PBS-T에 5% skim milk)에 blocking을 한 뒤, COX-2, iNOS(Santa Cruz Biotechnology), β -actin antibody(Cell Signaling)를 1:1,000으로 하여 4°C에서 24시간 incubation 하였다. Membrane은 PBS-T로 washing 후 실온에서 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody(Millipore)와 1시간 동안 반응시켰다. Supersignal West Dura extended duration substrate(Thermo)를 사용하여 Chemi Imager analyzer system(Alpha Innotech)에서 발색, 감광시켰다.

통계학적 검정

모든 실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 대조군(control)과 LPS 단독 처리군(vehicle) 그리고 각 실험군 간의 차이를 검정하기 위해 Student's t-test와 ANOVA를 통해 실시하였다. 실험의 분석 시 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 설정하여 검정하였다.

결 과

YG-1의 세포 독성 효과

YG-1이 마우스 대식세포 RAW 264.7에 미치는 영향을 측정하기 위하여 세포 독성 실험을 수행하였다. YG-1(up to 200 μ g/mL)을 농도별로 24시간 함께 배양하였을 때 100 μ g/mL까지는 대조군과 비교하여 세포의 증식이 억제되지 않았다. 그러나 200 μ g/mL 농도에서는 세포의 증식이 다소 감소되는 것이 확인되었다. 따라서 YG-1의 독성이 나타나지 않는 범위인 100 μ g/mL를 최고 농도로 설정한 후 이후 실험을 진행하였다(Fig. 1A). 또한 YG-1(1, 10, 100, 200 μ g/mL)을 농도별로 1시간 전처리 후 LPS(10 ng/mL)를 처리하여 24시간 배양한 뒤 세포 생존률을 측정된 결과, LPS 단독처리군(vehicle)과 비교하여 10, 100 μ g/mL 농도에서 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다. 이 결과에서 LPS 처리에 의해 감소한 세포 생존률이 YG-1 전 처리에 의해 증가하였다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

YG-1의 IL-1 β , TNF- α , PGE2의 생성 억제 효과

YG-1이 마우스 대식세포에서 분비하는 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 에 대하여 억제 효과가 있는지 알아보기 위하여 ELISA kit을 이용해 세포 배양액 내의

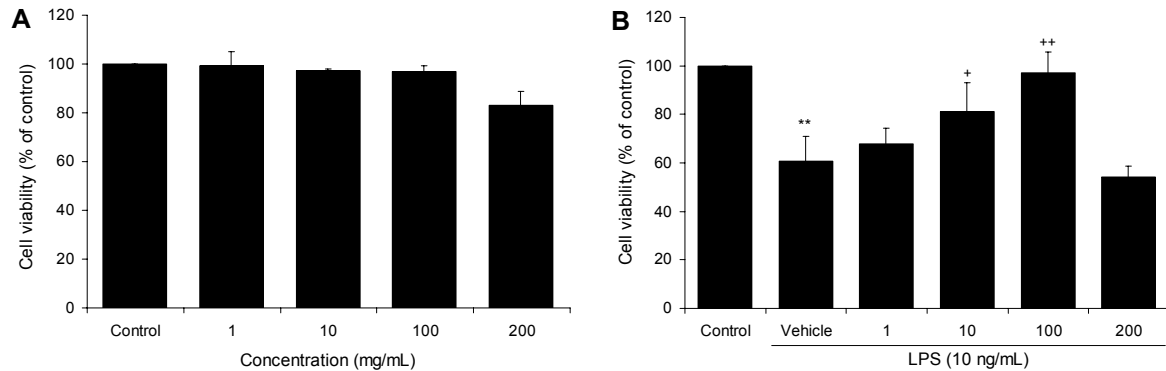


Fig. 1. Effect of YG-1 on LPS-induced cell death in RAW 264.7 cells. (A) MTT assay to determine YG-1 (up to 200 $\mu\text{g/mL}$) toxicity in RAW 264.7 cells. (B) Cell viability of RAW 264.7 cells after treatment with LPS (10 ng/mL) and YG-1 (up to 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Data are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. ** P <0.01 vs. control, * P <0.05, ** P <0.01 vs LPS (vehicle).

IL-1 β 와 TNF- α 의 분비량을 측정하였다. IL-1 β 는 LPS 자극에 따라 유의성 있게 증가하였고, YG-1 처리농도에 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 또한 양성대조약물인 flurbiprofen과 비교하여 YG-1에서도 비슷한 억제 효과를 보여주었다(Fig. 2A). TNF- α 의 분비량은 LPS 자극에 따라 유의하게 증가하였으나, YG-1의 농도와 관계없이 감소되지 않았다(Fig. 2B). 또한 세포 배양액에서의 PGE₂ 함량을 측정된 결과 LPS 단독처리군(vehicle)에서는 유의성 있게 증

가하였으며 YG-1 처리농도 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 유의성 있게 억제되었다. 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 양성대조약물 flurbiprofen과 유사한 수준까지 감소시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Fig. 2C).

YG-1의 NO 및 iNOS의 생성 억제 효과

YG-1 추출물이 염증반응 및 조직손상에 관여하는 요인으로 작용하는 NO와 iNOS에 대한 억제 효과를 조사하였다.

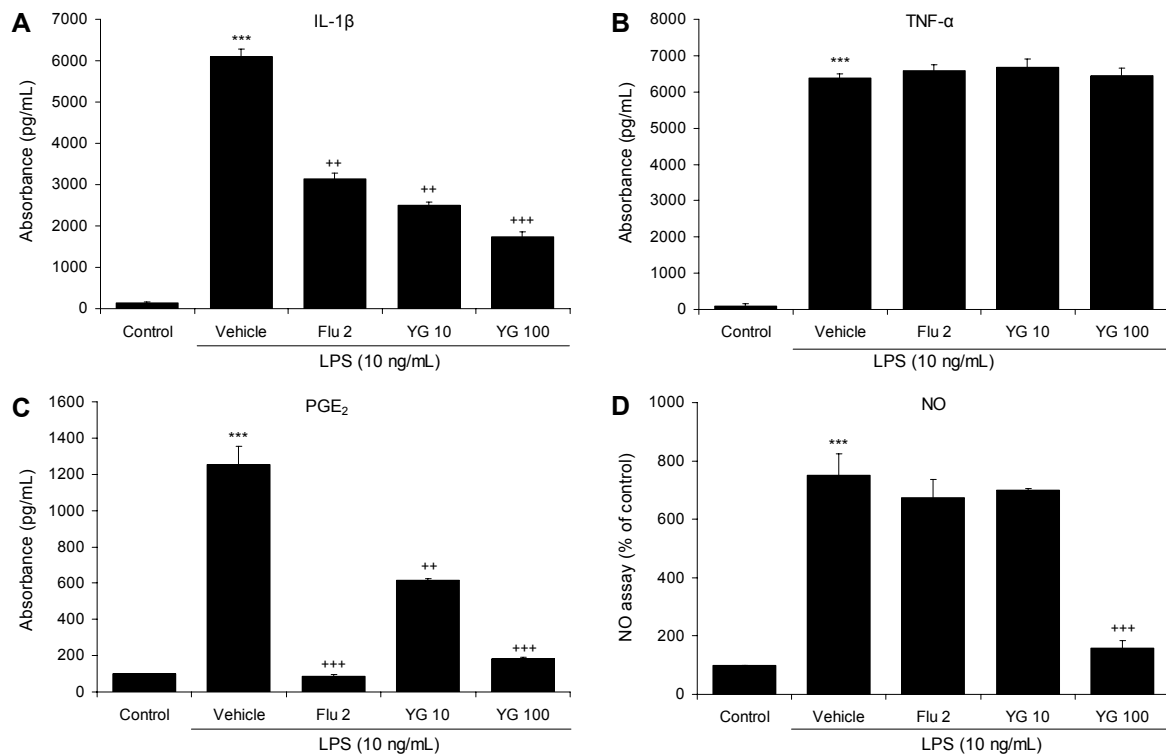


Fig. 2. Effect of YG-1 (10, 100 $\mu\text{g/mL}$) on inflammatory makers (IL-1 β , TNF- α , PGE₂, and NO) in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (10 ng/mL) for 24 h in the absence or presence of YG-1 (10, 100 $\mu\text{g/mL}$) and flurbiprofen (2 $\mu\text{g/mL}$). Data were expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. *** P <0.001 vs. control, ** P <0.01, *** P <0.001 vs. LPS (vehicle).

세포 배양액에서의 NO 농도는 LPS 단독처리군(vehicle)에서 유의성 있게 증가하였으며, YG-1 처리 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 특히 YG-1의 처리농도 100 µg/mL에서 79%의 억제 효과를 보여 대조군(control)과 비슷한 수준까지 감소시키는 것으로 확인하였다(Fig. 2D). 또한 iNOS의 발현은 LPS 단독처리군(vehicle)에서 현저히 증가하였으나, YG-1을 처리 후 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하는 것이 확인되었다. 특히 100 µg/mL에서는 양성대조약물 flurbiprofen과 비교하여 유사한 효과가 있는 것으로 확인하였다(Fig. 3A).

YG-1이 LPS에 의해 유도된 COX-2의 발현 억제 효과

마우스 대식세포 RAW 264.7에서 COX-2의 발현에 대한 YG-1 추출물의 억제 효과를 알아보기 위하여 COX-2의 발현을 측정하였다. COX-2의 발현은 LPS 단독처리군(vehicle)에서 현저히 증가하였으나, YG-1을 처리 후 유의성 있게 감소하는 것이 보였다. 특히 COX 저해제인 양성대조약물 flurbiprofen과 비교하여 뛰어난 발현 억제 효과를 보여주었다(Fig. 3B).

LPS에 의한 염증성 발열 모델에서 YG-1의 효과

LPS(2.5 mg/kg)를 투여 후 1시간 간격으로 12시간 동안 체온을 측정된 결과는 가장 체온이 많이 올라간 6시간(peak time)과 12시간(last time)으로 나누어 기록하였다(Fig. 4A). 대조군(control)과 비교해서 초기에 LPS 단독처리군(vehicle)과 YG-1(100 mg/kg)군은 점차적으로 온도가 증가하는 것이 보였으나, YG-1(100 mg/kg)군은 6시간 후에

체온 상승이 억제되는 것이 보였다. Flurbiprofen(20 mg/kg), YG-1(400 mg/kg)은 체온 상승에 크게 변동이 없는 것으로 보아 YG-1(400 mg/kg)군에서 LPS 투여에 따른 발열을 유의성 있게 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 양성대조약물인 flurbiprofen군과 비교하여 YG-1(100, 400 mg/kg)은 LPS 투여 6시간(peak time)부터 해열작용이 비슷하게 일어나는 것을 확인하였다(Table 2, Fig. 4B).

LPS에 의해 유도된 IL-1 β , TNF- α , PGE₂의 혈청 내 YG-1의 발현 억제 효과

실험 시작 후 체온이 가장 많이 올라간 6시간과 실험 종료 시간인 12시간의 혈청 내 염증성 사이토카인(IL-1 β , TNF- α , PGE₂)의 측정 결과 6시간과 12시간 모두 LPS 단독처리군(vehicle)에서 증가하는 것을 확인하였다. Flurbiprofen(20 mg/kg)과 YG-1(100, 400 mg/kg) 투여군에서 IL-1 β 와 PGE₂는 유의성 있게 발현이 억제되는 것을 보인 반면, TNF- α 는 LPS 처리군에서는 유의성 있게 증가하였으나 YG-1과 flurbiprofen 투여군에서 발현을 억제하지 못했다(Fig. 5). 본 실험의 결과 YG-1이 LPS에 의해 증가되는 염증성 사이토카인의 발현을 억제함으로써 발열이 억제되는 것으로 사료된다.

YG-1의 뇌조직 내 iNOS, COX-2 발현 억제 효과

YG-1(100, 400 mg/kg)과 LPS(2.5 mg/kg)를 투여한 후 6시간(peak time)과 12시간(last time)으로 나누어 안락사를 시킨 후 송과체에서의 iNOS와 COX-2의 발현을 분석하였다. LPS 단독처리군(vehicle)에서는 iNOS와 COX-2의

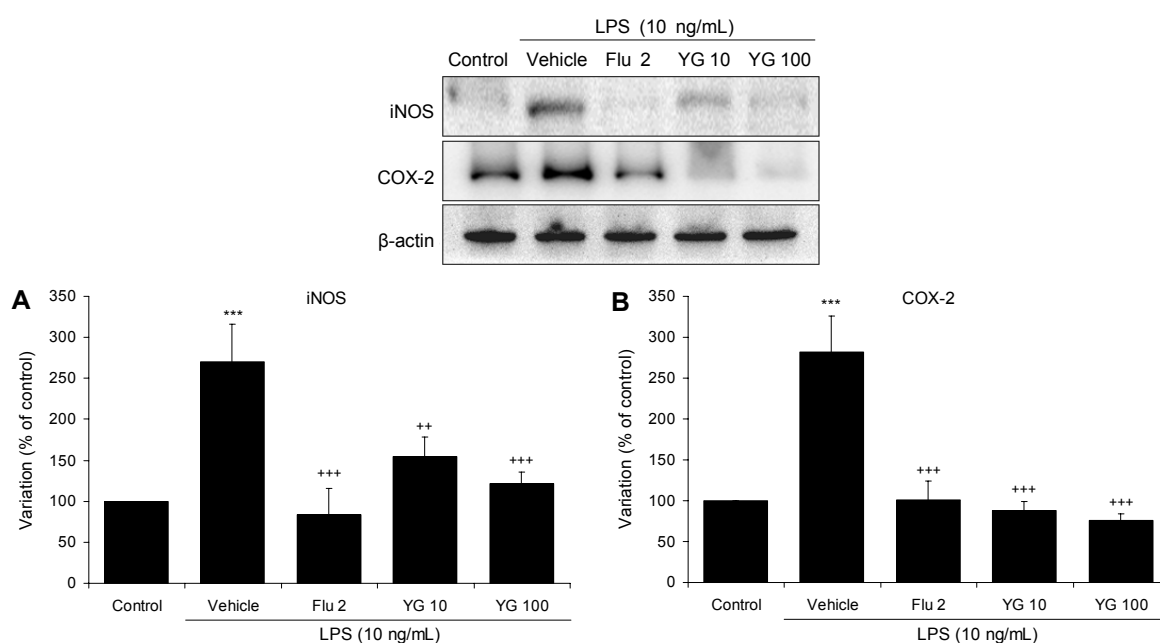


Fig. 3. Effect of YG-1 on production of COX-2 and iNOS proteins in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (10 ng/mL) for 24 h in the absence or presence of YG-1 (10, 100 µg/mL) and flurbiprofen (2 µg/mL). Data are expressed as mean±SEM of three independent experiments. *** P <0.001 vs. control, ** P <0.01, *** P <0.001 vs. LPS (vehicle).

Table 2. Change of rectal temperature in rats treated with YG-1

Time (h)	Control	LPS (2.5 mg/kg)			
		Vehicle	Flurbiprofen (20 mg/kg)	YG-1 (100 mg/kg)	YG-1 (400 mg/kg)
0	37.25±0.4 ¹⁾	37.15±0.4	37.20±0.1	37.25±0.4	37.20±0.2
1	37.25±0.4	37.44±0.5	36.72±0.2	36.92±0.4	36.84±0.6
2	37.05±0.6	36.64±0.4	36.94±0.4	37.12±0.6	36.76±0.4
3	37.30±0.1	37.40±0.5	36.58±0.2	37.00±0.4	36.44±0.4
4	37.25±0.6	37.12±0.7	36.68±0.3	37.96±0.5	36.24±0.3
5	37.20±0.4	37.78±0.4	36.88±0.3	38.08±0.4	36.34±0.3
6	36.85±0.6	38.48±0.5 ^{**}	37.36±0.2 ⁺	37.84±0.4 [#]	37.18±0.3 [#]
7	37.15±0.2	38.40±0.2	37.30±0.7	37.75±0.3	37.65±0.6
8	37.25±0.4	38.35±0.4	37.50±0.1	36.90±0.2	37.60±0.1
9	36.95±0.4	38.20±0.1	36.95±0.3	36.55±0.07	37.40±0.4
10	37.00±0.2	38.05±0.3	36.40±0.4	36.30±0.2	36.45±0.1
11	36.75±0.3	37.95±0.7	36.60±0.2	36.70±0.4	36.40±0.1
12	36.75±0.2	38.15±0.3 ^{**}	36.65±0.2 ⁺⁺	36.75±0.3 ^{##}	36.50±0.1 ^{##}

¹⁾Data were expressed as mean±SEM of three independent experiments.

^{**}*P*<0.001 vs. control, ⁺*P*<0.05, ⁺⁺*P*<0.01, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01 vs. LPS (vehicle).

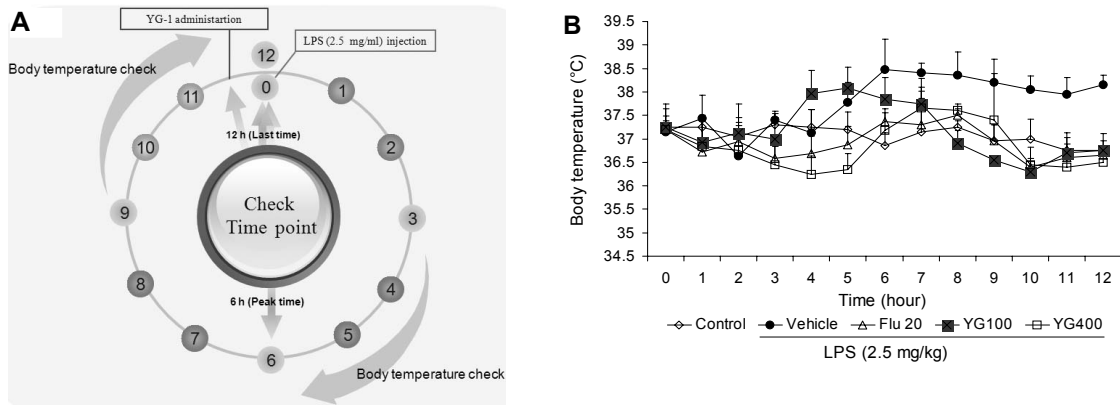


Fig. 4. Changes of body temperature. Data were expressed as mean±SEM of three independent experiments.

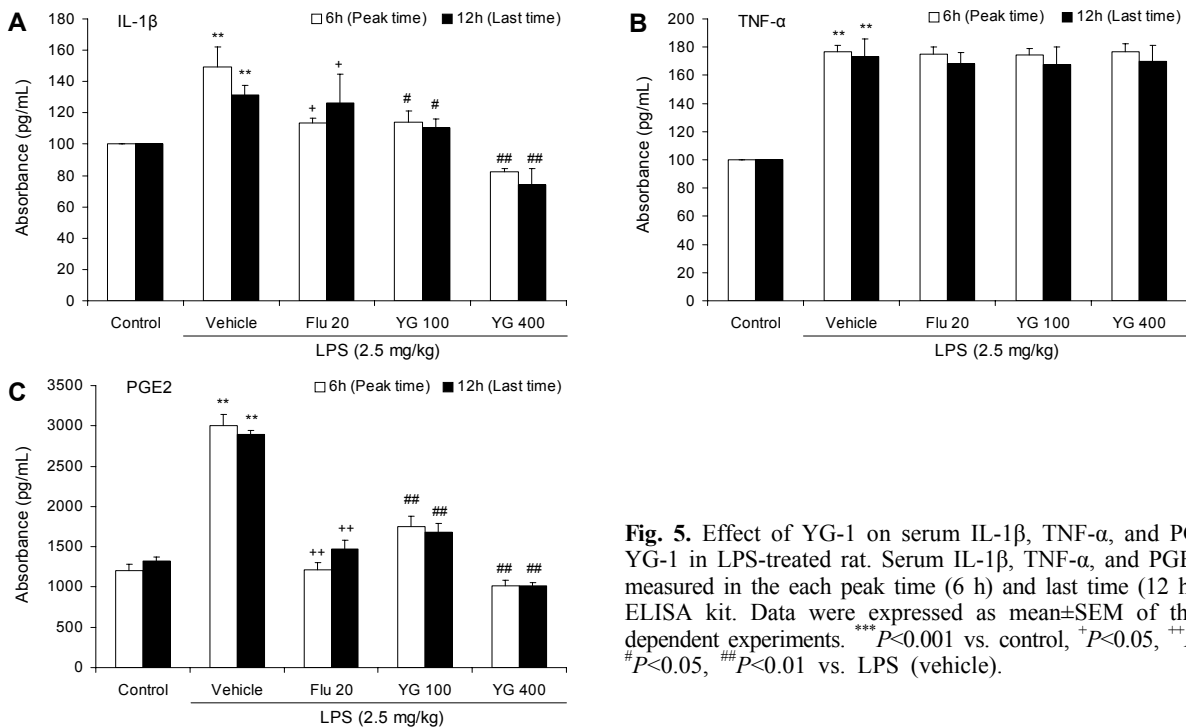


Fig. 5. Effect of YG-1 on serum IL-1 β , TNF- α , and PGE₂ by YG-1 in LPS-treated rat. Serum IL-1 β , TNF- α , and PGE₂ were measured in the each peak time (6 h) and last time (12 h) using ELISA kit. Data were expressed as mean±SEM of three independent experiments. ^{***}*P*<0.001 vs. control, ⁺*P*<0.05, ⁺⁺*P*<0.01, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01 vs. LPS (vehicle).

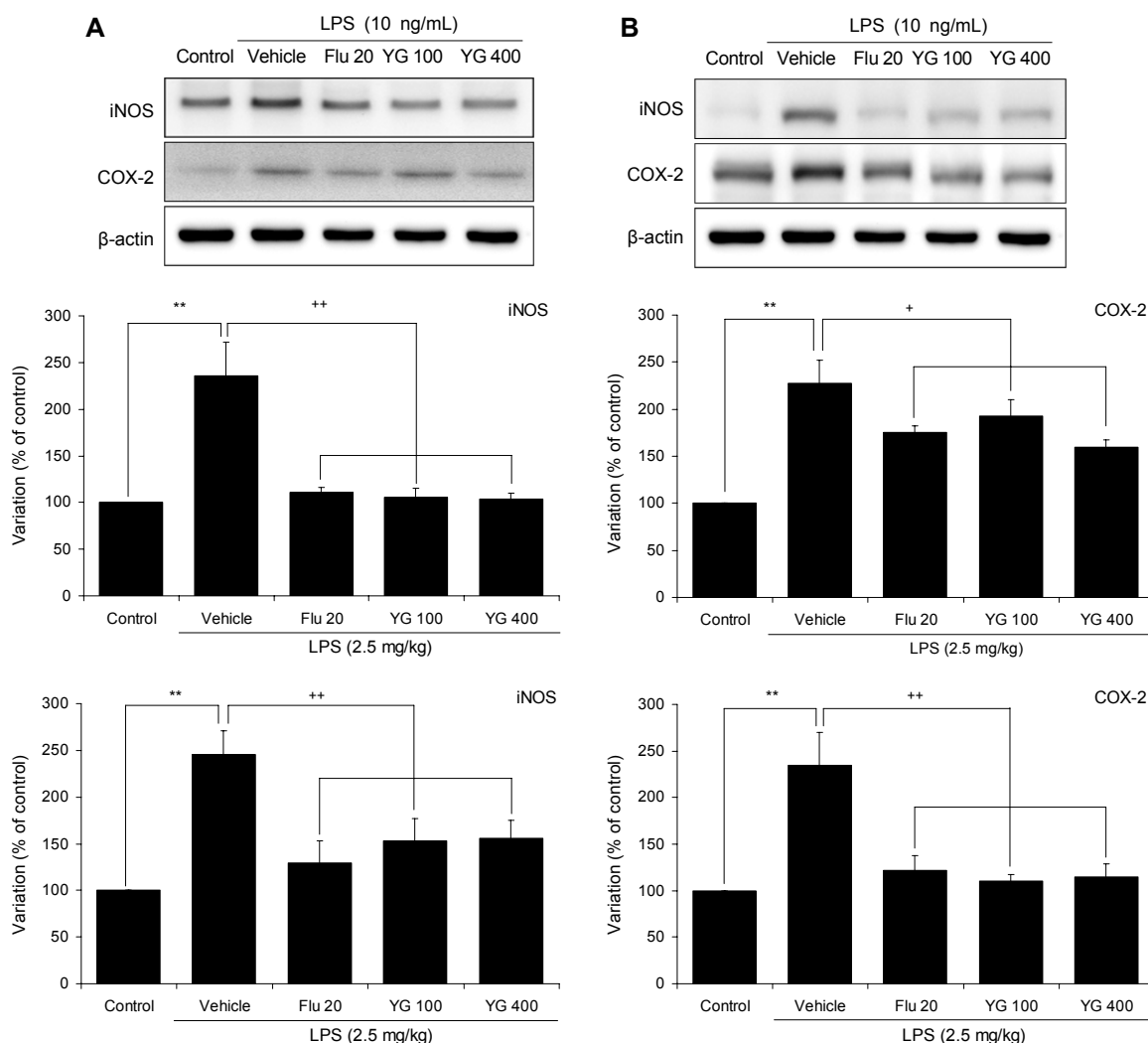


Fig. 6. Effect of YG-1 on production of iNOS and COX-2 proteins in LPS-treated rat pineal glands. iNOS and COX-2 protein expression were measured in the each (A) peak time (6 h) and (B) last time (12 h) using immunoblot analysis. Data were expressed as mean±SEM of three independent experiments. ** $P < 0.001$ vs. control, ++ $P < 0.01$ vs. LPS (vehicle).

발현이 peak time과 last time에서 유의하게 증가한 반면 YG-1 투여군에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 peak time과 last time 모두에서 유의성 있게 발현이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 6).

고찰

YG-1에서 많은 부분을 차지하는 인동등(*Lonicera japonica*)은 해열, 해독, 발한 작용이 있고(6), 우방자(*Arctium lappa*)는 풍열(風熱)을 내려주고 설패투진(宣肺透疹)하며, 소종(消腫), 해독시키는 효과가 있어서 풍열해수(風熱咳嗽), 인후염(咽喉炎), 풍진(風疹) 등에 사용된다(4). 또한 황금(*Scutellaria baicalensis*)은 항염증, 해열, 이뇨, 혈압 강하 작용 등이 있으며, 현재 만성기관지염, 전염성간염, 고혈압 등에 사용되고 있다(7). 실제 임상에서 발열 및 인후염 환자에게 여러 한약 성분들이 치료에 이용되고 있으나 YG-1

에 포함된 복합 처방을 가지고 인후염 모델로 사용되는 면역세포와 동물실험에서의 평가는 미비하다. 그에 따라 본 연구에서는 LPS 처리에 의해 염증을 유도한 RAW 264.7 대식세포 모델과 염증성 고열을 유발시킨 흰쥐에서 YG-1의 염증 완화 효과 및 해열 효과를 증명했다.

본 실험에 사용된 LPS는 주로 세포 및 동물 실험에서 염증 및 고열 유발 모델에 쓰이는 약물이다(15). 대식세포는 전(pro) 염증성 사이토카인 IL-1 β , TNF- α 와 같은 염증성 인자들의 과잉생산을 포함한 면역반응의 중심적인 역할을 한다(16). iNOS는 대식세포를 통해서 많은 양의 NO를 생산하는 주 효소이며, NO의 생산 증가는 류마티스성 관절염과 궤양성 대장염을 포함한 다양한 염증성 질병의 원인이 되고 있다(17).

COX-2는 보통 정상조직에서는 발현 정도가 매우 낮으나 염증성 인자와 같은 스트레스에 노출된 대식세포에서 발현되는 효소로 염증반응에 주요한 역할을 담당하고 있는 것으

로 알려져 있다(18). 또한 COX-2에 의한 PGE₂ 생성은 염증 반응을 매개하는 것으로 여겨진다고 보고된 바 있다(19-21). 본 연구에서 YG-1은 COX-2 발현을 저해하여 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제하여 만성 염증성 질환의 예방 및 치료에 적용 가능성을 제시하였다(Fig. 2, 4). 이러한 결과는 COX-2 특이적 억제제가 LPS 유도성 염증반응을 억제한다는 것을 뒷받침한다(21).

본 연구에서는 LPS 처리군 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현이 대식세포 및 흰쥐의 혈청에서 모두 유의성 있게 증가한 반면 YG-1을 처리한 대식세포에서는 특이하게 IL-1 β 의 발현만이 유의성 있게 감소하는 것을 보여 주었다(Fig. 2A). YG-1은 TNF- α 의 발현을 억제시키지 못했다(Fig. 2B). 따라서 YG-1의 염증 억제 기능은 TNF- α 가 아닌 IL-1 β 의 경로를 따르는 것으로 해석된다. 염증성 사이토카인 IL-1 β 의 발현 억제는 결국 iNOS와 NO 발현의 억제를 유도했고 COX-2와 PGE₂의 발현도 억제하는 것으로 사료된다(19). 대식세포에서의 이러한 경향은 흰쥐를 대상으로 한 발열실험 결과와 일치하고 있는 것을 알 수 있다(Fig. 2).

LPS 투여는 발열 매개인자인 IL-1 β 와 TNF- α 및 PGE₂ 등의 분비를 유도함으로써 염증반응을 개시한다. 본 연구에서도 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 및 PGE₂ 모두 유의성 있게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 염증 반응이 일어날 때 가장 먼저 보이는 증상인 발열을 측정해 본 결과 LPS 단독 투여한 군에서는 체온이 6시간 이후로 계속 높은 상태를 보였다. 하지만 YG-1을 투여한 군에서는 체온이 정상군과 비교하여 크게 벗어나지 않았다. 또한 대조군으로 해열제인 flurbiprofen을 투여한 군과 비교하여 YG-1은 뛰어난 해열 효과를 가진 것으로 보였다(Fig. 3). 흰쥐의 혈청에서 LPS 투여에 의해 증가된 염증성 사이토카인 IL-1 β 와 TNF- α 및 PGE₂의 분비 억제를 측정해 본 결과 대식세포에서의 결과와 동일하게 IL-1 β 와 PGE₂의 분비 감소는 보여주었으나 TNF- α 의 분비 감소는 보여주지 못했다(Fig. 5). 발열과 관계가 깊은 송과선에서의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 체온의 변화에 따라 peak time(6 h)과 last time(12 h)에서 확인한 결과 YG-1에 의한 유의성 있는 억제를 확인할 수 있었다(Fig. 6). LPS 발열에 대한 YG-1의 해열 효과는 대식세포에서 확인한 것과 동일한 기전에 의해 매개될 수 있다. 하나는 YG-1이 IL-1 β 와 PGE₂의 발현 억제와 함께 iNOS를 억제시킴으로써 내인성 해열 시스템이 활성화될 수 있다는 것이며(22), 또 하나는 YG-1이 LPS에 의해 뇌혈관 및 뇌 전체에서 증가된 COX-2를 억제함으로써 발열물질인 PGE₂의 생산이 감소되었다고 볼 수 있다.

요약하면 YG-1은 LPS 유도성 발열을 농도 의존적으로 억제시키는 해열작용을 가지고 있으며, YG-1의 해열 효과는 뇌에서 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2를 억제시키는 것과 관련이 매우 깊다고 판단되었다.

요 약

YG-1의 항염증 및 해열 치료 약물로서의 가능성을 검증하기 위하여 대식세포와 동물모델에서 염증성 사이토카인 활성화 및 해열 관련 인자들을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다. YG-1은 염증성 사이토카인 인자인 IL-1 β 의 발현을 효과적으로 억제하였으며, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시킴으로써 염증인자인 NO 및 PGE₂ 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 YG-1은 LPS 유도성 발열 모델에서 염증을 완화시키고 해열의 효과를 보여 주었다. 이상의 실험 결과로부터 본 실험에 사용된 YG-1은 염증에 의해 유발되는 인후염과 같은 질환을 예방 및 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(312057-3)에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Liu E, Lewis K, Al-Saffar H, Krall CM, Singh A, Kulchitsky VA, Corrigan JJ, Simons CT, Petersen SR, Musteata FM, Bakshi CS, Romanovsky AA, Sellati TJ, Steiner AA. 2012. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and *Escherichia coli*-induced systemic inflammation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: 1372-1383.
- Kim DH. 2006. *Chinese medicine pharmacology*. 2th ed. Shinil Books, Seoul, Korea. p 198, 202, 239.
- Kardosová A, Ebringerová A, Alföldi J, Nosál'ová G, Franová S, Hribalová V. 2003. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. *Herkules*. *Int J Biol Macromol* 33: 135-140.
- Nam JY, Kim DG, Lee JY. 2006. Effects of *Woobangja* on anti-allergic inflammation. *J Korean Oriental Pediatrics* 20: 241-255.
- Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, Lim JP, Kim DK, Kim YH, Bae KH, Lee YM. 2003. Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. *Clin Chim Acta* 330: 165-171.
- Lee YC, Kwon TH, Ok IS, Seo CW, Kim YJ, Roh SS, Seo YB. 2005. The experimental studies on the immunomodulatory effects of *Lonicerae Caulis et Folium*: the effects of *Lonicerae Caulis et Folium* on cytokines production in mice splenocytes. *Kor J Herbology* 20: 141-149.
- Cho SH, Kim YR. 2001. Antimicrobial characteristics of *Scutellariae Radix* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 964-968.
- Zhang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S, Yi J, Zhang W, Wei H, Sung M, Wang W, Li X. 2003. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res* 63: 4037-4043.
- Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F. 2007. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants:

- elevation of prostaglandin D₂ levels. *Arthritis Res Ther* 9: R64.
10. Cho SI, Oh WW. 2005. Anti-oxidative effects of *Scutellariae Radix*. *Kor J Herbology* 20: 67-74.
 11. Na DG, Park YC. 2005. Effect of *Scutellariae Radix* extract on serum cytokines in OVA-induced asthmatic mice. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 19: 973-976.
 12. Kim S, Na JY, Song KB, Choi DS, Kim JH, Kwon YB, Kwon J. 2012. Protective effect of ginsenoside Rb1 on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in rat articular chondrocytes. *J Ginseng Res* 36: 161-168.
 13. Park SM, Lee HJ, Shin HC, Kim HJ, Lim S. 2001. A study on acupuncture of spring-point: effect on body temperature and central immune system. *J Korean Oriental Med* 22: 109-119.
 14. Anuar F, Whiteman M, Siau JL, Kwong SE, Bhatia M, Moore PK. 2006. Nitric oxide-releasing flurbiprofen reduces formation of proinflammatory hydrogen sulfide in lipopolysaccharide-treated rat. *Br J Pharmacol* 147: 966-974.
 15. Jia LL, Li R, Ma J, Fan Y, Li HB. 2013. Effects of Bai-Hu decoction on fever induced by lipopolysaccharide. *Kaohsiung J Med Sci* 29: 128-132.
 16. Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
 17. Liu YH, Lin SY, Lee CC, Hou WC. 2008. Antioxidant and nitric oxide production inhibitory activities of galacturonyl hydroxamic acid. *Food Chem* 109: 159-166.
 18. Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ. 1996. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 56: 4424-4429.
 19. Nam NH. 2006. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 6: 945-951.
 20. Murakami A, Ohigashi H. 2007. Targeting NOX, iNOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer* 121: 2357-2363.
 21. Brian JE Jr, Moore SA, Faraci FM. 1998. Expression and vascular effects of cyclooxygenase-2 in brain. *Stroke* 29: 2600-2606.
 22. Scammell TE, Elmquist JK, Saper CB. 1996. Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol* 271: 333-338.