

Original Article / 원저

金銀花와 黃芩이 配伍된 處方劑의 抗炎症 效果 研究

이용숙¹⁾ · 정 명²⁾ · 임규상²⁾ · 윤용갑¹⁾

¹⁾원광대학교 한의과대학, ²⁾원광대학교 한의학전문대학원

Study on the Anti-inflammatory Effects of the Remedy Prescribed with *Lonicera japonica* and *Scutellaria baicalensis* Radix in U937 cells.

Yong-Suk Lee¹⁾ · Myung Jung²⁾ · Kyu-Sang Lim²⁾ · Yong-Gab Yun¹⁾

¹⁾College of Korean Medicine, Wonkwang University

²⁾Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objective : This study investigated the inflammatory reaction is characterized by over production of inflammatory mediators due to an up-regulation of inflammatory pathways.

Methods : We investigated the anti-inflammatory effects of water extracts from *Lonicera japonica* and *Scutellaria baicalensis* in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated U937 cells. Each extract suppressed the production of inflammatory mediators (NO, IL-1 β , TNF- α , and PGE₂) and the expression of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2 in LPS- stimulated U937 cells in a dose-dependent manner.

Results : These suggest that the suppression effects were synergistically increased by their combination. Their combination extract also inhibited NF- κ B-DNA complex of NF- κ B binding activity and translocation of NF- κ B from cytosol to nucleus.

Conclusions : Our study suggest that the combination of water-extractable components of *L. japonica* and *S. baicalensis* may be useful for therapeutic drugs against inflammatory immune diseases, probably by suppressing the production of inflammatory mediators.

Key words : *Lonicera japonica*; *Scutellaria baicalensis*; Tumor necrosis factor-alpha(TNF- α); prostaglandin E₂(PGE₂); nitric oxide(NO)

I. 緒 論

金銀花(*Lonicera japonica* Caprifoliaceae)는忍冬科에 속하는忍冬덩굴의花冠으로 6, 7월에 흰색의 꽃이 나중에 노란꽃이 된다고 하여金銀花라 하였고, 초여름에 꽃 봉우리가 맺혀 아직 피지 않은 상태로 따 모아 그늘에 말려 그대로 쓰며,忍冬花, 銀花등의 異名을 갖고 있다¹⁻³. 金銀花는 清熱解毒, 涼血止痢, 散風熱등의 효능이 있으며, 解毒, 소염작용이 있어 化膿症 및 腫瘍의 치료제로 널리 사용되어 오고 있다⁴.

약리적으로 抗病原微生物作用, 抗毒, 抗炎解熱作用이 있어, 유행성 감기의 病毒, 이질균, 장티푸스균, 파라티푸스균, 대장균, 백일해균, 디프테리아균, 결핵균, 포도구균, 용혈성 연쇄구균, 폐렴 쌍구균등에 대한 비교적 강력한 염증 억제작용이 보고되고 있다^{5-11,13-18}. 또한 호흡기관 염증, 당뇨병, 류마티스 관절염 치료¹⁹⁻²¹ 및 혈액의 독성을 제거하거나 중화시키는 약물로 사용되어 오고 있다²². 최근에는 호중구(neutrophils)의 활성화 및 탐식작용(phagocytosis)의 증진, 사산화염소(CCl₄)에 의해 손상 받은 간 조직의 보호, NF-κB의 선택적 조절에 의한 항염증 기전 및 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 염증성 사이토카인의 억제 등이 보고되고 있다^{20,23-31}.

黃芩(*Scutellaria Radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 속썩은 풀(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 제거한 뿌리를 건조한 것으로서, 清熱燥濕, 瀉火解毒, 瀉實火, 除濕熱하고, 약리적으로 解熱作用, 抗炎 및 免疫억제, 항알레르기작용, 抗病原微生物, 항진균 작용, 항병독작용, 抗癌作用, 抗過敏作用등이 있으며, 腸管에 대한 억제작용을 나타내며, 광범위한 항균효과가 있어서 디프테리아균, 포도구균, 용혈성 연쇄구균, 폐렴쌍구균, 수막염쌍구균 및 티푸스균, 적리균,

백일해균에 대해 강한 억제작용이 있다고 알려져 있다^{1,2,12}.

한편 金銀花와 黃芩이 배오된 처방으로는 천금소독산, 동원탁리산, 선전화독탕, 삼황패독산 등이 있으며, 千金消毒散은 治療瘡 發背 一切無名惡瘡 腫毒初發, 東垣托裏散은 治胃脘癰內疽, 仙傳化毒湯은 治癰疽 發背 乳癰, 三黃敗毒散은 治天疱楊梅等瘡, 消風敗毒散 治天疱楊梅瘡初起 등이 있으며, 주로 염증성 질환에 활용되는 것을 알 수 있다³². 그러나 金銀花와 黃芩이 배오된 처방 약물의 항염증 효과에 대한 보고가 없는 실정이다.

최근 천연물로부터 염증반응 억제 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 전개되고 있다²⁵⁻³¹. 따라서 본 연구에서는 각각 염증 억제작용에 효능이 있다고 알려진 금은화와 황금을 배합한 약물에 대한 염증효과를 보기 위하여 LPS로 자극하여 활성화된 인간 유래 U937 대식세포에서 분비되는 NO, PGE₂와 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등 염증 매개물질의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 처방 약물이 각각 처리된 약물보다 금은화와 황금을 배합한 약물의 염증 매개 물질을 뚜렷하게 억제시키는 항염증 효과가 있어 보고하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 시약

Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1beta (IL-1β), IL-6, 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 그리고 cyclooxygenase-2(COX-2) assay kit은 R&D System Inc.(Minneapolis, U.S.A.)사로부터 구입했다. Lipopolysacchride (LPS), anti-iNOS, anti-COX-1 및 anti-COX-2 antibody는 Santa cruz biotechnology Inc.(California, U.S.A.)로부터 구입했다. 기타 사용된 모든 시약은 분석 등급으로

Corresponding author : Yonggab Yun, PhD. Professor, College of Korean Medine, Wonkwang University, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 570-749, South Korea.
(Tel : 82-63-850-6834, E-mail : yunyg@wku.ac.kr)
• Recieved 2015/7/10 • Revised 2015/8/5 • Accepted 2015/8/12

Sigma-Aldrich와 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 약물의 추출 및 제조

실험에 사용한 약제는 전북 익산시 소재 한약 건재 상에서 구입하였으며, 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 증거 표본은 원광대학교 한의과대학 방제학 교실에 보관 중에 있다. 실험에 사용한 처방은 金銀花(*Lonicera japonica* Caprifoliaceae), 黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi), 金銀花와 黃芩이 같은 분량으로 배합된 약물을 사용하였다. 金銀花와 黃芩을 각각 100g씩 정량하여 대용약탕기(DWP-1800T)에 주입하고 각각 600ml씩 증류수를 첨가하여 100℃에서 2시간 30분 동안 煎湯하였다. 또한 金銀花 50g와 黃芩 50g을 증류수 600ml를 첨가하여 상기와 같이 추출하였다. 이와 같이 煎湯한 金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 등 각각 추출액 120ml를 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

2) U937 세포주의 배양

金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 추출물이 염증반응 매개물질의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 인간 유래 U937 대식세포를 사용하였다. 인간 유래 U937 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여, DMEM 배지로 $1 \times 10^6/ml$ 의 농도를 유지했고, 여기에 10%의 열에 비활성화 된 소 태아 혈청, 페니실린 G (100U/ml), 스트렙토마이신(100 $\mu g/ml$) 및 L-글루타민 (2mM)을 보충하여, 5% CO₂와 95%의 공기를 포함하는 가슴 조건하에서 37℃ 온도를 유지하여 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 각각의 추출물을 여러 가지 농도 (10-500 $\mu g/ml$)로 2시간 전 처리하고 1 $\mu g/ml$ 의 LPS로 자극하여 염증 매개물질의 생성능력을 측정하였다.

3) MTT 분석

U937 세포의 생존율은 여러 농도의 추출물 처리 또는 추출물과 LPS (1 $\mu g/ml$)을 동시에 처리하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 요약하면, 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서 1×10^6 cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 약물을 처리하였다. 4시간 동안 배양한 뒤 1mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT 용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가하여 용해했다. Formazan의 양은 570nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

4) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-Citrulline과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griss reagent: 0.5%의 설과닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μl 의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μl 씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37℃에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 Spectrophotometer (MD, U.S.A.)로 540nm에서 측정하였다. 아질산산염의 농도는 아질산염의 표준커브로 계산하였다.

5) 사이토카인, COX 및 PGE2 측정

LPS로 U937 세포($1 \times 10^6/ml$)를 자극하기 전에 金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 추출물을 여러 농도 (10-500 $\mu g/ml$)로 2시간동안 전처리 하였다. Pro-

inflammatory cytokine, COX-1, COX-2, PGE₂ 등 염증 매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS(1 μg/ml)로 자극한 후 이들 염증 매개물을 세포 상층액에서 측정하였다. TNF-α의 측정은 6시간, IL-1β와 IL-6의 측정은 12시간, COX-1과 COX-2의 활성 측정은 18시간, PGE₂도 18시간에 측정하였다. pro-inflammatory cytokine, COX-2 및 PGE₂ assay kit를 이용하여 ELISA법으로 정량하였다.

6) Western blot

각 추출물과 LPS가 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 μg을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution (20% methanol, 25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비특이적반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 TTBS로 4℃에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 TBS로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1:1,000), anti-COX-2 antibody (1:1,000)을 주입하여 3시간 동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG(1:2,000)을 주입하고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL 방법으로 발색시켰다.

7) NF-κ B 활성 측정

金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 추출물이 염증반응 매개물질의 생성에 미치는 기전을 알아보기 위하여, NF-κ B-DNA complex formation을 결정하기 위하여 EMSA법을 활용하였다. 요약하면, LPS로 처리된 U937 세포를 용해하여 세포핵 추출용액을 제조하여³²P로 표지된 말단 22-mer NF-κ B oligonucleotide(HIV long terminal repeated, 5-AGTTGAGGGACTTTCAGGC-3)를 이용하여 37℃에서 15분 동안 배양하고 형성된 DNA-protein complex는 6.6% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였다.

8) 통계 분석

결과는 평균값±표준편차로 표현했다. 통계 분석은 Student's t-test를 이용했다.

Ⅲ. 實驗 結果

1. 金銀花와 黃芩 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 추출물이 LPS가 처리된 또는 처리되지 않은 U937 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. LPS가 처리되지 않은 세포에서 여러 가지 농도의, 金銀花·黃芩, 또는 金銀花와 黃芩 추출물은 세포독성이 없었다(Fig. 1). 이러한 결과를 바탕으로 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS 처리군의 생존율은 약 82%로 감소하였으나, 金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 추출물을 10-500 μg/ml의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 높아졌다. 특히 100 μg/ml부터 농도가 높아질수록 세포 생존율이 높아졌다(Fig. 2).

2. 金銀花와 黃芩 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 추출물이 LPS 유도 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 U937 세포를 배양용기에 1×10⁶/ml의 밀도로 분주하고 5시간 후에 각각 약물을 10-500 μg/ml의 농도로 2시간 동안 전처리한 다음 LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 결과 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 20.5 μM의 아질산염을 생성시킨 반면, 金銀花·黃芩 또는 金銀花와 黃芩 추출물을 처리한 실험군에서는 농도에 의존적으로 아질산염의 생성이 억제되었다(Fig. 3). 더욱이 金銀花와 黃芩으로 구성된 약물의 경우 100 μ

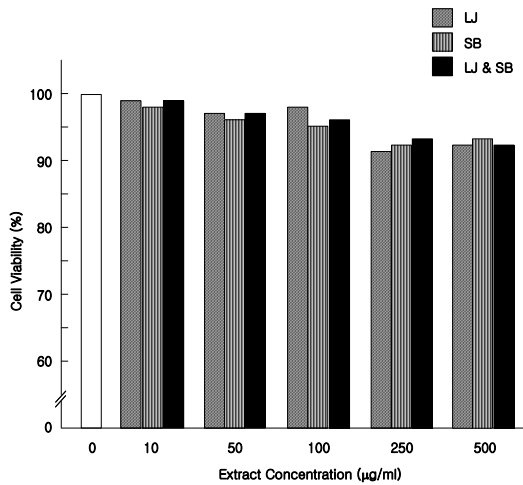


Fig. 1. Cell viability in *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB)-treated U937 cells, U937 cells(1×10^6 /well plate) were incubated for 24h in the presence or absence of each extract at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments.

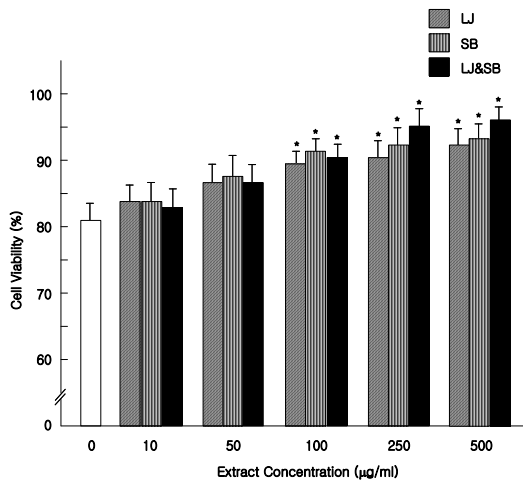


Fig. 2. Cell viability in *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) extract-treated U937 cells, Cells(1×10^6 /well plate) were pretreated

with or without each extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without $1 \mu\text{g/ml}$ LPS for 24h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. * $p < 0.05$ indicate significant LPS alone treated control group.

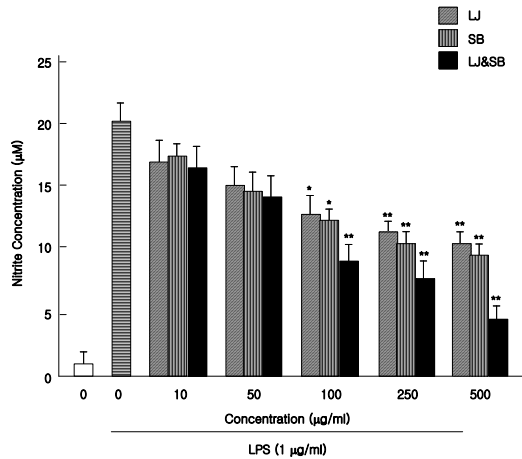


Fig. 3. Inhibitory effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on NO production by LPS-stimulated U937 cells. Cells(1×10^6 /ml) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without $1 \mu\text{g/ml}$ LPS for 24h. NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are means \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and $p < 0.01$ indicates significant LPS alone treated control group.

g/ml 농도부터 아질산염을 억제시키는데 상승효과가 있었다. 이와 같이 金銀花와 黃芩을 배伍한 처방 약물은 항염증약물로 사용할 수 있을 가능성을 제시해 주었다.

3. 金銀花와 黃芩 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 높은 반응성을 가진 생체에서 생성되는 분자 로써, NOS에 의해 L-argine으로부터 생성된다. LPS 로 대식세포를 자극하면 iNOS가 과량 발현되면서 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 따라서 상기에서 실험한 약물에 의한 NO 생성 억제와 iNOS와의 관계를 알아보기 위해서 金銀花와 黃芩이 배오된 처방 약물과 그 구성약물이 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 NO 생성 억제와 같이 iNOS 단백질 발현이 약물의 농도에 의존적으로 억제되는 사실을 증명하였다(Fig. 4).

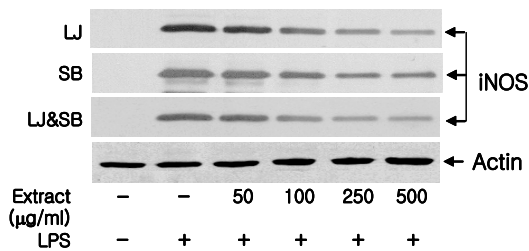


Fig. 4. Inhibitory effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on the expression of iNOS in U937 cells stimulated with LPS. Cells($1 \times 10^6/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without $1 \mu g/ml$ LPS for 24h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

4. 金銀花와 黃芩 추출물이 PGE₂ 생성에 미치는 영향

金銀花와 黃芩 배오에 의한 처방 약물과 그 구성약물이 LPS 유도 PGE₂ 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 U937 세포를 배양용기에 $1 \times 10^6/ml$ 의 밀도로 분주하고 5시간 후에 각각의 약물을 10-500 $\mu g/ml$ 의 농도로 2시간 동안 전처리한 다음

LPS를 $1 \mu g/ml$ 의 농도로 처리하여 18시간 배양하였다. 그 결과 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 $1.8 \pm 0.21 ng/ml$ 의 PGE₂를 생성시킨 반면, 金銀花와 黃芩 배오에 의한 처방 약물과 그 구성약물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 크게 억제되었다(Fig. 5). 더욱이 金銀花와 黃芩 배오에 의한 처방 약물의 경우 250 $\mu g/ml$ 농도부터 PGE₂을 억제시키는데 상승효과가 있었다.

5. 金銀花와 黃芩 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다. 그래서 본 연구에서도 PGE₂ 생성에 직접적으로 영향을 미치는 COX-2의 발현을 immunoblot 방법으로 조사하였다. 그 결과 PGE₂ 생성 억제와 같이 COX-2 단백질 발현이 약물의 농도에 의존적으로 억제되는 사실을 증명하였다(Fig. 6). 또한 金銀花와 黃芩 배오에 의한 처방 약물은 그 구성약물보다 NO는 물론 PGE₂ 생성 억제와 같이 COX-2 발현을 현저히 억제시키는 상승효과가 있었다. 이와 같이 결과는 金銀花와 黃芩이 배오된 처방 약물이 항염증제로서 활용될 가치가 있는 것으로 사료된다.

6. 金銀花와 黃芩 추출물이 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

염증 유발 원인 중에 하나가 대식세포 활성화에 의한 다양한 염증 매개인자 사이토카인의 발현과 생성에 기인하고 있다. 따라서 金銀花와 黃芩 추출물이 활성화된 대식세포에서 염증성 사이토카인의 생성 억제효과를 조사하기 위하여, U937 세포를 LPS와 실험 약제를 동시에 처리하고, TNF- α 의 경우 6시간, IL-1 β 와

IL-6는 12시간이 경과한 후 생성된 pro-inflammatory cytokine의 양을 kit를 이용하여 측정하였다.

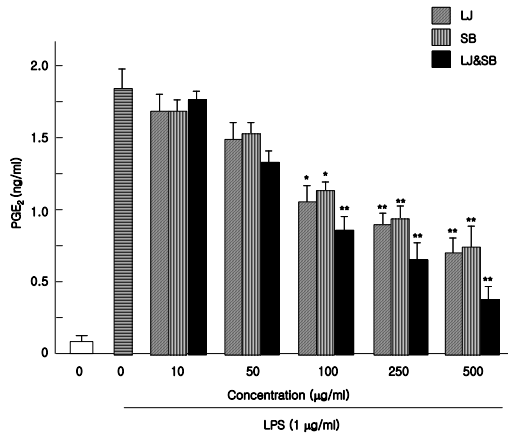


Fig. 5. Inhibitory effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on the production of PGE₂ in U937 cells stimulated with LPS. Cells($2 \times 10^6/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without $1 \mu g/ml$ LPS for 18h. PGE₂ production assay was carried out as described in Materials and methods. * $p < 0.05$ and $p < 0.01$ indicates significant LPS alone treated control group.

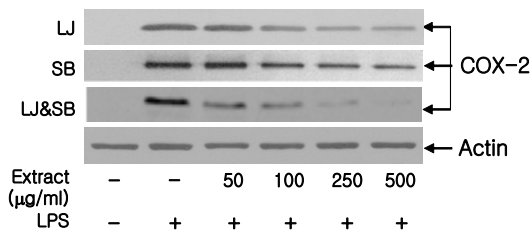


Fig. 6. Inhibitory effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on the expression of COX-2 in U937 cells stimulated with LPS. Cells($1 \times 10^6/ml$) were pretreated with or without each extract at

indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without $1 \mu g/ml$ LPS for 18h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

LPS로 활성화한 세포는 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6를 다량 생성하였고, 金銀花와 黃芩이 구성하는 약물을 각각 또는 배오하여 첨가하였을 때 이들 cytokine의 생성은 억제되었다. 즉, 金銀花와 黃芩이 구성하는 약물은 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성을 억제하였으며(Fig. 7), IL-1 β 의 경우도 TNF- α 와 같이 농도에 의존적으로 억제되었다(Fig. 8). 그리고 IL-6의 경우 역시 농도에 의존적으로 현저히 억제되었다(Fig. 9). 특히 金銀花 또는 黃芩을 각각 처리한 실험군보다 동시에 조합하여 제조한 金銀花 배오 처방 약물에서 pro-inflammatory cytokine의 생성억제가 크게 일어나 상승효과가 있었다. 이러한 결과는 방제학적으로 구성된 약물의 효과는 단독으로 처방된 약효를 한층 증진시켜줄을 시사해주고 있다. 따라서 金銀花와 黃芩이 배오된 처방 약물은 염증질환을 예방하거나 치료할 수 있음을 시사하고 있다.

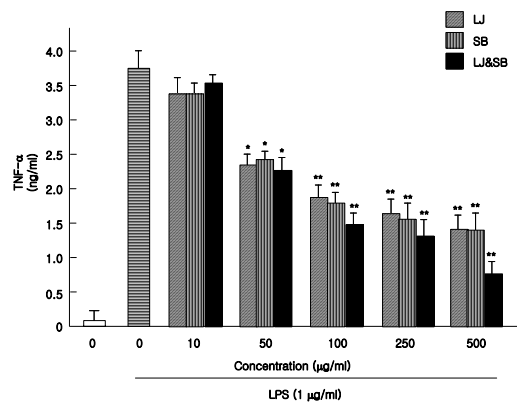


Fig. 7. Effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on the productions of TNF- α in U937 cells stimulated with LPS. Cells($1 \times 10^6/ml$) were

pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without $1\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 6h at indicated concentrations. The productions of $\text{TNF-}\alpha$ was determined as described in Materials and methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. * $p<0.05$ and $p<0.01$ indicates significant LPS alone treated control group.

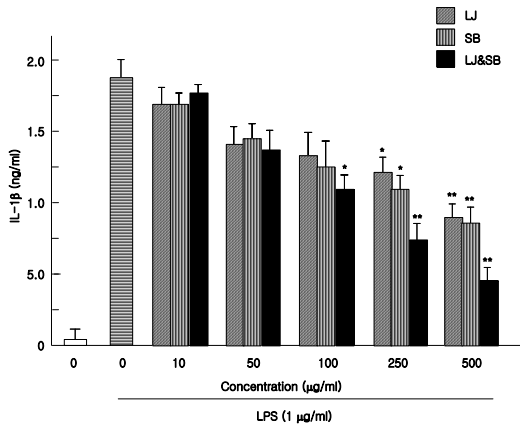


Fig. 8. Effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on the productions of $\text{IL-1}\beta$ in U937 cells stimulated with LPS. Cells($1\times 10^6/\text{ml}$) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2h and then incubated with or without $1\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 12h, at indicated concentrations. The productions of $\text{IL-1}\beta$ was determined as described in materials and methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. * $p<0.05$ and $p<0.01$ indicates significant LPS alone treated control group.

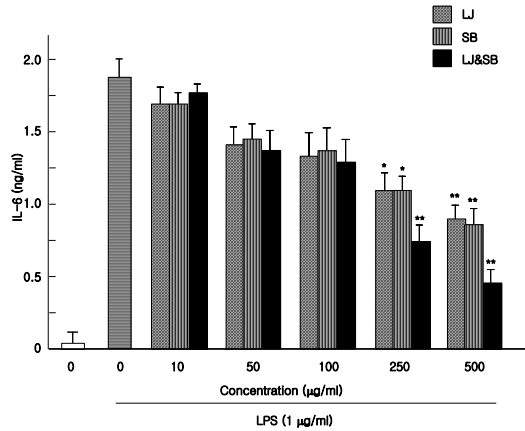


Fig. 9. Effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on the productions of IL-6 in U937 cells stimulated with LPS. Cells were incubated with or without $1\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 12h in the presence or absence of LJ&SB, LJ or SB on the productions of $\text{IL-1}\beta$ in U937 cells stimulated with LPS at indicated concentrations. The productions of IL-6 was determined as described in materials and methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. * $p<0.05$ and $p<0.01$ indicates significant LPS alone treated control group.

7. 金銀花와 黃芩 추출물이 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 활성화에 미치는 영향

상기와 같이 金銀花와 黃芩이 배오된 처방 약물과 구성약물이 염증성 매개물인 NO , PGE_2 , COX-2 뿐만 아니라 *pro-inflammatory cytokine*을 억제시키는 효과에 대한 기전을 알아보기 위해서, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 의 활성을 조사하였다. 즉, 염증성 매개물질을 효과적으로 억제시키는 각 추출물 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 선택하여 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 의 활성을 조사한 결과 Fig. 10과 같이 金銀花와 黃芩의 경우 비슷하게 그 발현이 억제되었지만, 金銀花와 黃芩이 배오된 처방 약물은 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 의 활성이 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 金銀花와 黃芩이 배

오된 처방 약물의 염증억제 기전이 NF-κB의 활성을 억제시킴으로서 이루어짐을 알 수 있었다. 따라서 방 제학적으로 구성된 약물의 효과는 단독으로 처방된 약효를 한층 증진시켜줌을 시사해주고 있고, 金銀花와 黃芩이 배오된 처방 약물은 염증질환을 예방하거나 치료할 수 있음을 시사하고 있다.

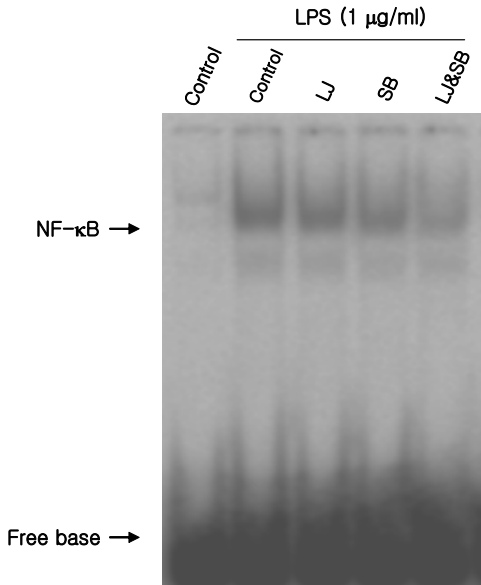


Fig. 10. Effects of *Lonicera japonica*(LJ), *Scutellaria baicalensis*(SB) or *Lonicera japonica plus Scutellaria baicalensis*(LJ&SB) water extracts on LPS-induced NF-κB-DNA complex formation in U937 cells. Cells were preincubated for 2h with or without LJ, SB or LJ&SB water extracts (each concentration: 250μg/ml) at indicated concentrations and then stimulated for 15min with LPS(1μg/ml). Nuclear extracts were prepared and protein(4g) was incubated with P-labeled NF-κB consensus oligonucleotide for 20min. NF-κB-DNA complex formation was assayed by EMSA

IV. 考 察

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부물질에 노출되면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응에 원인이 되는 많은 인자를 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속 시킨다²⁶⁻³⁴. 이러한 인자 중 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써, NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 LPS와 IFN-γ로 자극될 때 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 많은 양의 NO는 염증반응 매개물질의 역할을 하게 된다³⁵⁻⁴⁶. 또한 활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine과 COX-2와 같은 염증 매개물질을 과량 생산하게 된다. 이와 같이 염증 매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다^{22,36-39}. 따라서 NO, PGE₂, COX-2 및 pro-inflammatory cytokines와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 중요한 도움이 될 것이다^{31,32,35-40}.

염증 유발은 면역반응의 일종으로 중심적인 역할을 하는 세포가 대식세포와 CD4⁺ T세포를 들 수 있다. 세균을 비롯한 외부 이물질이 체내로 침입하면, 조직 또는 혈액에 존재하는 단핵구/대식세포가 인식하여 탐식작용을 한다. 이때 대식세포는 자신이 탐식한 세포를 소화하여 침입된 물체의 존재를 알리는 항원에 대한 정보를 제공하는 역할을 한다^{32,35-37}. 이러한 과정에 CD4⁺ T세포는 대식세포와 상호작용함으로써 IFN-γ, TNF-α 및 IL-6 등과 같은 Th1 사이토카인을 생성하고, 이들 사이토카인은 대식세포를 자극하여 더욱 활성화시킨다. 이와 같이 활성화된 대식세포는 염증성매개물질을 생성하여 염증반응을 촉진하는

데, 면역제어가 되지 않을 경우 급성 또는 만성 염증을 야기하는 단계로 발전하게 된다. 이러한 염증반응에 관여하는 대표적인 염증 매개물질이 NO, PGE₂, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 등이다^{23,38}.

NO는 높은 반응성을 가진 생체에서 생성되는 분자로써, NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 LPS와 IFN- γ 로 자극될 때 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 된다^{15,22,30,31}. 이렇게 생성된 많은 양의 NO는 염증반응 매개물질의 역할을 하게 된다^{32,33,37}. 또한 활성화된 대식세포는 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine과 COX-2와 같은 염증 매개물질을 과량 생산하게 된다. 이와 같이 염증 매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 이들 염증 반응을 억제시키는 물질의 발굴은 인체의 염증성 질환을 치료하는데 많은 도움을 준다^{27,30,39}.

金銀花는 NF- κ B의 선택적 조절에 의한 항염증 기전 및 LPS로 자극된 U937세포에서 염증성 사이토카인의 억제 등이 보고되어 항염증 작용이 있는 것으로 알려졌고¹²⁻¹⁴, 黃芩은 baicalin, baicalein 및 wogonin 등 약 40여 종의 flavone 및 관련 화합물이 강력한 항염증작용 및 항알러지작용이 있는 것으로 알려져 있다^{18-21,39}. 그러나 金銀花와 黃芩을 배합한 처방 약물에 대한 염증반응 억제에 대한 약리작용은 전혀 알려져 있지 않다.

본 연구는 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있는 약물을 발굴하기 위해서 金銀花와 黃芩을 배합한 처방 약물과 그 구성 약물이 염증매개물질로 알려진 NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 생성과 iNOS 및 COX-2 발현을 LPS로 자극한 인간 유래 대식세포주인 U937 세포를 대상으로 조사하였다. 그 결과 金銀花와 黃芩의 항염증작용은 전 연구자들이 보고한 연구 결과와 비슷하였다. 더욱이 金銀花와 黃芩이 배

합된 처방 약물은 이를 구성하는 약물의 효과 보다 좋은 상승작용이 있었다(Fig. 1-9). 특히 본 연구는 NO와 PGE₂의 억제 기전을 알아보기 위해서, 이들 염증 매개물질의 생성에 직접적으로 관여하는 유전자의 발현을 조사한 결과, iNOS와 COX-2의 발현을 억제시킴으로써 이루어진다는 사실을 규명했다(Fig. 4, 6). 또한 金銀花와 黃芩이 배합된 처방 약물이 pro-inflammatory cytokine의 생성을 억제하는 기전을 규명하기 위해서 NF- κ B의 활성을 조사하였다. 그 결과 金銀花와 黃芩이 배합된 처방 약물의 pro-inflammatory cytokine의 효과적인 억제는 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 이루어짐을 밝혔다(Fig. 10).

상기와 같은 실험결과를 종합해보면, 金銀花와 黃芩은 단방으로 여러 가지 인체의 염증성 질환을 치료할 수 있을 뿐만 아니라 한의학적인 관점으로, 이들 약물을 배합한 처방 약물이 이들을 구성하는 각각의 약물보다 염증반응 억제에 상승된 실험 결과를 나타내고 있어, 方劑學的 君臣佐使 理論에 입각한 處方構成이 매우 중요함을 입증하여 주고 있으며, 천연물을 이용한 새로운 치료제 개발에 方劑學的 處方構成 理論 도입이 필요함을 시사하고 있다. 앞으로 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 실험에 方劑學的 개념을 이용한 處方構成 理論인 君臣佐使論을 활용한다면 보다 효과적이고 부작용이 없으면서, 실용성이 높은 천연물을 이용한 치료제 개발에 대한 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 結 論

염증반응은 IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ 및 NO 등과 같은 염증 매개물질이 상승된 염증반응 경로에 의해 과량으로 생산된 면역반응에 기인한다. 본 연구는 LPS로 자극된 U937 세포를 대상으로 金銀花와 黃芩으로 배합된 가용성 약물과 그 구성약물을 전 처리하여 염증 매개물질의 생성 억제와 그 기전을 조사

하였다. 각 추출물은 NO, IL-1 β , TNF- α , 및 PGE₂와 같은 염증 매개물들의 생성과 iNOS와 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 효과를 나타냈다. 이들 억제 효과는 金銀花와 黃芩으로 배합된 가용성 약물에서 상승되었다. 또한 金銀花와 黃芩으로 배합된 가용성 약물은 NF- κ B-DNA complex 결합 및 세포질에서 핵으로의 전이를 억제시킴으로써 NF- κ B의 활성을 억제시켰다. 이러한 결과는 金銀花와 黃芩으로 배합된 가용성 약물이 염증반응 매개물질의 생성을 억제함으로써 염증성 면역질환을 치료하는데 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행됨

References

1. Shin MG, Clinical heralogy. Seoul:Youngrimsa, 1991:308-21.
2. Kang BS, Clinical with herbal medicine. Seoul:Youngrimsa, 1994:287-90.
3. Kim CM, Shin MG, Ahn DG, Lee GS, After translation TCM Dictionary. Seoul:Jeongdam, 1997:582-7.
4. State Pharmaceutical Administration, Chinese herbal medicine. Shanghai:Science and Technology Publisher, 1998:1791-817.
5. Tae BS, Korean Dictionary of clinical medicine. Seoul:Euseongdang, 1994:51-3,63-5.
6. Kim HS, Effects of flos lonicerae water extract on anti-rheumatoid arthritis. School of Korean Medicine, Wonkwang University, 2003.
7. Jeong BS, Shin MG, (Crude drug) illustrates Xiang drug dictionary. Seoul:Youngrimsa, 1990:864-5.
8. Kim EJ, Jin HK, Kim K, Lee HY, Lee SY, Lee KR, et al, Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation. *Biochem Pharmacol*, 2001;61:903-10.
9. Choi SM, Kim MJ, Choi YH, Ahn HJ, Yun YP, Screening of the Antibacterial Activity of Natural Products against *Propionibacterium acnes*. *Archives of Pharmacal Research*, 1998;42:89-94.
10. Shin YS, Experimental study on the Yubaekpi anti-inflammatory and tissue regeneration. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2001;14:129-35.
11. Baek GH, Antitumor Effects of the Ethyl Acetate Soluble Fraction of *Lonicerae flos* on Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells. College of Dentistry, Wonkwang University, 1997.
12. Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, et al. Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. *Clinica Chimica Acta*, 2003;330:165-71.
13. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT, Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF- κ B activation through reducing I- κ B degradation in rat liver. *Int J Mol Cell Med*, 2001;7:79-83.
14. Ohta S, Sato N, Tu SH, Shinoda M, Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental

- liver injuries *Yakugaku Zasshi*, 1993;113: 870-80.
15. Jang SI, Kim YJ, Lee JC, Kook YB, Yun YG. Aqueous extract from *Lonicera japonica flower* Inhibits LPS-induced Inflammatory Mediators in RAW 264,7 Macrophages. In press, 2005.
 16. Hu S, Cai W, Ye J, Qian Z, Sun Z. Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils. *Zentralbl Veterinarmed A*, 1992; 39:593-9.
 17. Tang W, Eisenbrand G. Chinese Drugs of plant origin. Springer-Verg. 1992:919-29.
 18. Abe K, Inoue O, Yumioka E. Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1990;38(1):209-11.
 19. Li BQ, Fu T, Gong WH, Dunlop N, Kung H, Yan Y, Kang J, et al. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*, 2000; 49(3):295-306.
 20. Krakauer T, Li BQ, Young HA. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS Lett*, 2001;500(1-2):52-5.
 21. Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ, Yang LL. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol*, 2001;61(11):1417-27.
 22. Ahmad N, Chen LC, Gordon MA, Laskin JD, Laskin DL. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002;71:1005-11.
 23. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal Medecine*, 1997;336:1066-71.
 24. Coker PK, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *European Respiratory Journal*, 1998;11:1218-21.
 25. De Nardin E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Annals of Periodontology*, 2001;6:3040.
 26. Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *Journal of Infectious Diseases*, 1999;179:294-304.
 27. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology*, 1996;14:397-440.
 28. Isomaki P, Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals of Medicine*, 1997;29:499-507.
 29. Kotake Y, Sang H, Miyajima T, Wallis GL. Inhibition of NF-kappaB, iNOS mRNA, COX2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Biochimica Etbiophysica Acta*, 1998;1448:77-84.
 30. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *Nitric Oxide*, 1997;1:107-20.
 31. Birkenkamp KU, Tuyt LM, Lummen C, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E. The p38 MAP kinase inhibitor SB203580 enhances nuclear factor-kappa B transcriptional activity by a non-specific effect upon the ERK pathway. *Br J Pharmacol*, 2001;131:99-107.

32. Bian ZM, Elnor SG, Yoshida A, Elnor VM. Human RPE-monocyte co-culture induces chemokine gene expression through activation of MAPK and NIK cascade. *Exp Eye Res.* 2003;76:573-83.
33. Lee HW, Ahn DH, Crawley SC, Li JD, Gum JR, Basbaum CB, et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate up-regulates the transcription of MUC2 intestinal mucin via Ras ERK and NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2002;277:32624-31.
34. Majumdar S, Aggarwal BB. Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *J Immunol.* 2001;167:2911-20.
35. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:211-18.
36. Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Piraino G, Valenti A, Nicocia G, et al. Mitogen-activated protein kinases and NF-kB are involved in TNF- α responses to group B streptococci. *J Immunol.* 2002;169:1401-9.
37. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kB leads to multifocal defects in immune responses. *Cell.* 1995;80:321-30.
38. Verma Q, Li IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev. Immunol.* 2002; 2:725-34.
39. Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Jekal SJ, Pae HO, Choi BM, et al. Hepatoprotective effect of baicalin, a major flavone from *Scutellaria radix*, on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2003;25(4):585-94.