

Original Article / 원저

패혈증 쇼크에서 단삼 추출물의 억제 효과와 그 기전에 관한 연구

신상호^{1,2)} · 윤정민¹⁾ · 고우신²⁾ · 윤화정²⁾

¹⁾ 아마르한의원, ²⁾ 동의대학교 한의과대학 안이비인후과학교실

Protective Effects and Mechanisms of *Salvia Miltiorrhizae* Radix Extract on Endotoxin Shock

Sang-Ho Shin^{1,2)} · Jeong-Min Yun¹⁾ · Woo-Shin Ko²⁾ · Hwa-Jung Yoon²⁾

¹⁾ Amar Korean Medicine Clinic

²⁾ Dept. of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, Dong-eui University

Abstract

Objectives : This study was performed to investigate the protective effects and mechanisms of *Salvia miltiorrhizae* Radix extract (SME) on endotoxin shock.

Methods : We used two models; LPS-induced sepsis model for *in vivo* model, and murine peritoneal macrophages responses for *in vitro*. SME was administrated orally to mice. After 1 hr, LPS was injected intraperitoneally. Survival rate was checked each time per 12 hr for 5 days. Mice were sacrificed 3 hr after LPS injection, then blood samples and organs were harvested. Cytokines secretion was measured by ELISA. Organs tissues were observed with microscope. Murine peritoneal macrophages were cultured for 1 hr either in a medium alone or in a medium that contained SME, as indicated. Then, the cells were treated with LPS for 24 hr. mRNA levels of cytokines were measured by real-time RT-PCR. Cytokine levels in the supernatants were measured by ELISA. The amount of nitrite was measured by using the Griess method to evaluate NO production. The cell lysates were analysed by Western blotting using antibodies for iNOS and β -actin was used as an internal control to monitor equal protein loading.

Results : SME improved the survival rate of mice model. SME inhibited the secretion of inflammatory cytokines and organs damages on Endotoxin Shock model. SME suppressed cytokine expression, cytokine secretion, NO production, iNOS expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages.

© 2016 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : The results suggest that SME has protective effects on endotoxin shock through suppression of inflammatory cytokines, organ damages, NO production and so on.

Key words : *Salvia Miltiorrhiza*; Radix Extract(SME); Endotoxin Shock; macrophages; inflammation; TNF- α

I. 서 론

패혈성 쇼크는 항생제 요법과 집중 치료에도 불구하고, 60%의 높은 사망률을 보이며 전 세계적으로 30만 명 이상의 환자에게 영향을 미친다고 알려져 있다^{1,2)}. 지난 수년간, 패혈증의 병태 생리에 대한 이해가 더욱 깊어지고 패혈증에 대한 새로운 치료법들이 상당수 개발되고는 있으나 대부분 임상적 적용에는 실패하고 있는 실정이다^{3,4)}.

패혈증은 심각한 전신 감염과 전신 염증으로 조직의 손상 및 장기 부전을 유발하여 생명을 위협하게 되는데^{5,6)}, 이에 대해 인체는 면역계의 발달을 유도하며 첫 번째 방어선인 선천면역반응에 의해 감염원에 대항하게 되고, 이 과정은 lipopeptides, DNA, dsRNA, LPS 등에서 PAMPs이라 불리는 고 보존된 병원성 모티브를 인식함으로써 일어난다⁷⁾. 그람 음성 박테리아의 외벽 구성 물질의 하나인 LPS는 국소 염증, 항체 생산, 패혈성 쇼크 같은 심각한 감염증에 다양한 반응을 유발한다⁸⁾. 패혈증 연구를 위하여 생쥐에 LPS로 자극하면 염증성 매개 인자들인 TNF- α , IL-1, IFN- γ 그리고 산화질소(NO) 등이 분비되어 박테리아성 내독소 쇼크(endotoxin shock)를 유발한다⁹⁾.

한의학에서 패혈증과 패혈성 쇼크는 각종 응저, 창양 등의 熱毒이 血分으로 들어가 중증의 염증상태를 일으킨 것으로 보며, 走黃과 內陷이 이에 해당한다. 따라서 走黃, 內陷의 치료는 血熱에 대하여 清熱涼血하고 毒邪를 해독하는 것을 대법으로 하게 된다¹⁰⁾. 涼

血消癰의 효능으로 血熱과 염증질환에 다용되는 丹蔘(*Salvia Miltiorrhizae Radix*)은 꿀풀과에 속하는 多年生草本인 *Salvia miltiorrhiza* Bge.의 뿌리 및 뿌리 줄기를 건조한 것으로, 苦, 微寒, 無毒의 성질을 지니고 있다¹¹⁾. 그밖에도 活血祛瘀, 養血安神, 調經止痛 등의 효능이 있어 月經不調, 血滯經閉, 產後瘀滯腹痛, 癥瘕積聚, 瘡瘍腫痛 등의 병증을 치료하는 약제로 널리 사용되고 있다^{12,13)}. 丹蔘의 약리작용으로는 관상동맥 확장 작용이 있어서 혈류량을 현저히 증가시키고 지질대사를 활성화시켜 콜레스테롤을 강하시킨다. 또한 혈압강하, 간기능 활성화, 진정작용, 항염증작용, 항암작용, 항균작용이 있을 것으로 보고되고 있다¹⁴⁾. 최근에 丹蔘은 뇌혈관 및 심혈관 질환을 포함한 다양한 질환의 치료에 널리 응용되고 있다^{15,16)}. 또한, 丹蔘은 항동맥경화¹⁷⁾ 이외에도 항비만¹⁸⁾ 및 항종양¹⁹⁾ 효과에 대한 연구결과도 발표되고 있어 중요성이 한층 더 증가되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 생쥐에 LPS를 투여하여 패혈성 쇼크를 유발한 동물모델을 이용하여 丹蔘의 패혈성 쇼크에 대한 효과를 알아보고, 그 기전을 생쥐의 복강으로부터 대식세포를 분리하여 그 활성을 다양한 면역학적 분석 방법을 통해 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

6-8주 female C57BL/6 생쥐를 이용하였고, 실험동물의 관리와 모든 실험과정은 "the National

Corresponding author : Hwa-Jung Yoon, The society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, Dong eui University, San 45-1, Yangjeong-2dong, Busanjin-gu, Busan, 614-710, Korea

(Tel : +82-21-850-8658, E-mail : yhj1226@deu.ac.kr)

• Recieved 2016/7/11 • Revised 2016/8/9 • Accepted 2016/8/16

Institutes of Health (NIH) Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals" 지침에 따라 수행하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 丹蔘은 꿀풀과 (Labiatae)에 속한 다년생 초본인 丹蔘 *Salvia miltiorrhiza* Bge.의 뿌리와 뿌리줄기를 건조한 것으로 동의대학교 부속 한방병원을 통하여 구입 정제하여 사용하였다.

3) 시약

Thioglycollate (TG)는 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)로부터 그리고 lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* serotype 055:B5), protease inhibitor cocktail, bicinchoninic acid (BCA), diethyl pyrocarbonate (DEPC), isopropanol와 그 외 일반시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), penicillin과 streptomycin은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Mouse IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비량을 측정하기 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Inducible NO synthase (iNOS), β -actin에 대한 항체와 peroxidase-conjugated 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting kit는 Bio-Rad Biotech (Hercules, CA, USA) 제품을 사용하였고, Real-time RT-PCR을 위한 SV total RNA isolation system은 Promega Co. (Madison, WI, USA) 그리고 TRIzol, reverse transcriptase, dNTP mixture, DNA polymerase 등의 시약은 Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, USA) 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 약물의 준비

세척되고 세절된 상태로 구입된 丹蔘 100 g을 메탄올 1,000 ml에 침지하고 15분간 초음파로 진탕해준 다음, 상온에서 24시간 추출하였다. 24시간의 추출이 끝난 후, 원심분리하여 찌꺼기는 버리고 상층액을 모은 다음, 와트만지(Watman paper)를 이용하여 2회 반복 여과 하였다. 여과가 끝난 추출액은 감압농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음 동결 건조되었다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 2.6 g으로 수율은 2.6%였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관하였다.

2) Endotoxin shock의 동물모델

Endotoxin shock은 *E. coli* serotype O55:B5로부터 얻은 박테리아 내독소인 LPS를 C57BL/6 (37.5 mg/kg) 생쥐의 복강 내로 주입하여 유도하였다. 네 그룹으로 생쥐 (그룹 당 n=5)를 구분하여 식염수 (컨트롤) 또는 丹蔘 추출물 (*Salviae Miltiorrhizae Radix* Extract, SME) 1, 5, 10 mg/kg을 구강으로 주입하였다. 투여 1시간 후, LPS를 접종하고 12시간 간격으로 5일간 생존율(survival rate)을 관찰하였다.

3) 조직의 준비 및 염색

SME (1, 10 mg/kg)을 구강으로 주입하고 1시간 후 LPS를 복강내로 주사하였다. 3시간 경과 후 각 mouse로부터 간과 폐를 적출하였고, 사용전까지 -70°C에서 냉동보관하였다. 간과 폐조직은 4% neutral-buffered formaldehyde 용액으로 12시간 고정하고 paraffin으로 포매한 후 4-mm 두께로 slice를 만들었다. 각 표본은 hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

4) ELISA assay

염증성 cytokine의 측정을 위하여 SME를 1시간 전

투여하고 LPS를 접종 후 3시간 지나서 생쥐로부터 혈액을 채취하였다. 이 혈액으로부터 혈청을 분리하여 ELISA 방법에 의해서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비량을 측정하였다. 또한 다양한 농도의 SME를 1시간 처리한 후 LPS로 24시간 동안 자극한 후, 각 well로부터 상층액을 얻어 ELISA 방법에 의해 분리된 cytokine을 측정하였다. 간단히 설명하면, 각 cytokines에 대한 특이한 monoclonal antibody를 먼저 ELISA plate에 붙이고, 0.05% Tween 20이 들어있는 PBS (phosphate buffered saline)로 씻어준 다음 10% FBS를 포함한 PBS로 blocking 시켜준다. 각 well을 0.05% Tween 20이 들어있는 PBS로 다시 씻어준 다음 배양 상층액을 첨가하고 약 2시간 반응시킨다. 이후 biotinylated anti-mouse IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 첨가하고, avidin-peroxidase를 첨가한다. 그 다음 효소의 기질인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)를 첨가하여 450nm filter에서 흡광도를 측정한다. 재조합 (recombinant) IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 사용하여 standard curve를 그려서 분리된 cytokines을 정량하였다.

5) Peritoneal macrophage의 분리

실험에 사용하기 3-4일전 생쥐의 복강에 3 ml의 Brewer's thioglycollate (TG)를 주사한 후 생쥐의 복강을 10 ml의 HBSS (Hank's balanced salt solution)로 씻어낸 다음 세포를 모아서 10% FBS가 포함된 DMEM으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 배양시킨다. 복강 유래 대식세포만을 얻기 위하여 부유세포를 배양액 교환을 통하여 제거한 후 부착된 세포를 배지에서 배양하여 실험 목적에 맞게 사용하였다.

6) MTT assay

세포의 생존율은 살아있는 세포가 tetrazolium compound 3-(4,5 dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 보라색 formazan crystals으로 변환시키는 능력을 이용하는 비색법

(colorimetric technique)을 사용하여 분석하였다. Krebs-Henseleit buffer (115 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.3 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1 M CaCl₂, 1 M MgCl₂)에 녹인 MTT 용액 50 μ l를 각 wells에 첨가하고 30분 동안 37°C 배양기에 둔다. 그 후 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO) 200 μ l를 첨가하여 형성된 formazan crystals을 녹인다. 각 aliquots를 ELISA plate reader를 사용하여 540 nm 파장에서 분석하였으며, 결과의 수치는 3개의 독립적인 plate에서 수행한 값을 means \pm SD 값으로 나타내었다.

7) Real-time RT-PCR

Total RNA의 분리는 Promega사의 SV total RNA isolation system을 이용하였고, RNA 정량 후 oligo (dT)12-8 primer와 SuperScript First-Strand Synthesis System을 포함한 용량 20 μ l RT 용액 당 2 μ l의 RNA를 이용하여 reverse-transcribed cDNA를 합성하였다. RT-PCR은 StepOne plus system을 이용하여 Applied Biosystems사가 제공하는 설명서에 따라 실시하였다. 측정하고자 하는 유전자의 발현을 정확하게 분석하기 위하여 RT가 없는 비교군을 사용하였고 같은 실험을 세 번 반복하였다. 그 결과는 "housekeeping" 유전자인 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPR)로 교정하였으며 LPS 자극을 하지 않은 세포군과 비교하여 계산하였다. 사용한 multiplex real-time TaqMan PCR을 위한 forward와 reverse primers는 다음과 같다. 생쥐 IL-1 β (forward, 5'-TTG ACG GAC CCC AAA AGA-3'; reverse, 5'-GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3'), 생쥐 IL-6 (forward, 5'-TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA-3'; reverse, 5'-GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3'), 생쥐 TNF- α (forward, 5'-TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG; reverse, ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3').

8) NO의 정량

다양한 농도의 SME를 1시간 처리한 후 LPS로 24시간 동안 자극하였다. 생성된 NO의 농도를 측정하기 위하여, 세포 배양액으로부터 100 μ l의 분액을 같은 양의 Griess reagent (1% sulfanilamide / 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride / 2.5% H_3PO_4)와 혼합하여 10분간 실온에서 반응시켜 Griess 반응으로 nitrite 농도를 측정한다. Microplate ELISA reader를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하고, sodium nitrite를 이용하여 standard curve를 그려서 NO 농도를 정량하였다.

9) Western blotting

약물을 처리한 대식세포를 scraper를 사용하여 부드럽게 수거하고 PBS로 세척한 후, protease inhibitor cocktail를 포함한 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40)를 첨가하여 세포의 전체 단백질을 추출하였다. Bicinchoninic acid를 이용하여 정량하고, 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후, electroblotting apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 단백질을 nitrocellulose membrane에 이동시켰다. Membrane은 항체의 비특이적인 부착을 막기 위하여 5% skim milk에 1시간 동안 두었고, 그 후 필요한 일차 항체 및 horse radish peroxidase (HRP)가 부착되어 있는 2차 rabbit 항체를 반응시켰다. 부착된 면역복합체는 ECL kit를 사용하여 Fujifilm Las3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) 기기에서 단백질 발현을 분석하였다.

10) 통계처리

실험결과는 one way ANOVA test를 이용하여 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. LPS에 의해 유도되는 septic shock에서 SME의 억제 효과

SME의 *in vivo*에서의 독성을 조사하여 농도를 결정하였다. 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 mg/kg를 사용하였고, 10 mg/kg 이하에서는 생쥐에 유의미한 독성을 나타내지 않았다. LPS를 사용하여 박테리아성 내독소 쇼크(endotoxin shock)를 유발하였다. 1, 5, 10 mg/kg의 농도로 SME를 생쥐에 구강 투여하고 1시간 후 LPS를 복강 내로 주사하였다. SME를 투여한 생쥐에서는 농도 의존적으로 생존율이 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

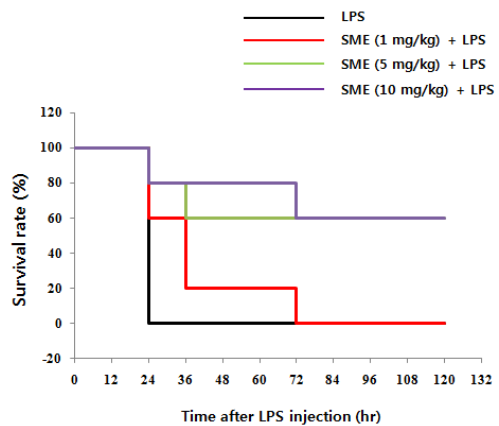


Fig. 1. Effect of SME in LPS-induced sepsis model. SME was administered orally to mice (n=5 per group) at 1, 5, or 10 mg/kg. After 1 hr, LPS was injected intraperitoneally at 37.5 mg/kg. It was checked each time per 12 hr for 5 days.

2. 혈액 내 염증성 사이토카인의 분비에서 SME의 효과

다양한 농도의 SME를 생쥐의 구강으로 주입하고 1시간 후 LPS를 복강으로 주사하였다. 3시간 경과 후 생쥐로부터 혈청을 분리하여 ELISA 방법으로 정량적 분석을 하였다. SME는 LPS에 의해 유도되는 혈액 내 염증성 사이토카인인 IL-6 와 TNF- α 의 분비를 농도

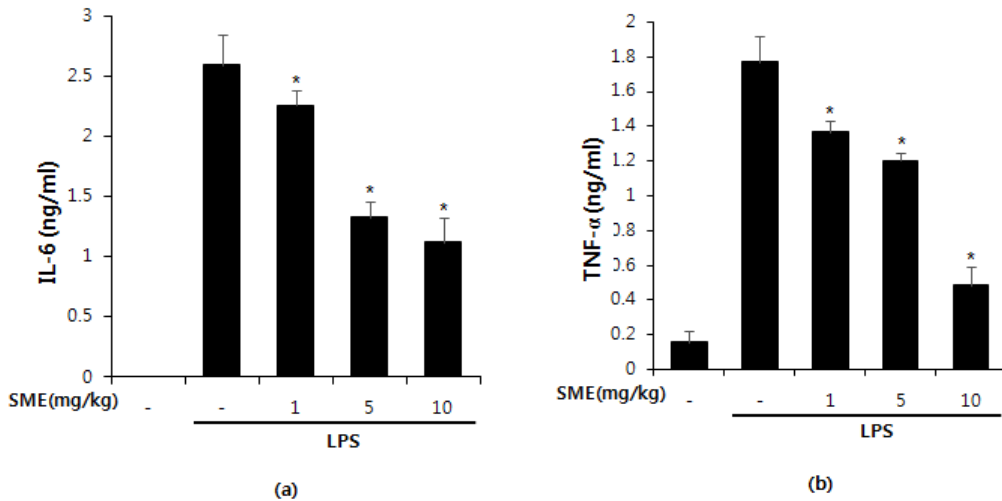


Fig. 2. Effect of SME on serum level of cytokines in LPS-induced septic shock (a), (b).

Mice were sacrificed 3 hr after LPS injection, then blood samples were harvested. Cytokines secretion was measured by ELISA assay. The values are the means \pm S.E. of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs LPS treatment alone.

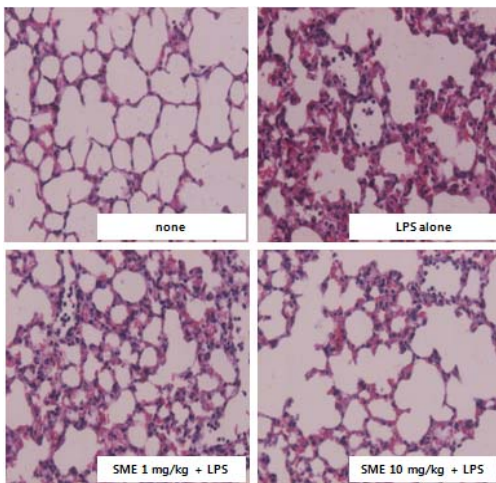


Fig. 3. Effect of SME on lung damage in LPS-induced septic shock.

SME was administrated orally to mice 1, 10 mg/kg, 1 hr before LPS. Then, LPS was injected intraperitoneally at 37.5 mg/kg. Mice were sacrificed 3 hr after LPS injection, and the lung was harvested. The tissues were fixed, embedded, and stained with H&E. Representative images were obtained at $\times 200$ magnification.

의존적으로 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 2). 그러나 IL-1 β 는 상대적으로 적은 양이 분비되어 유의성 면에서 큰 변화를 보이지 않았다.

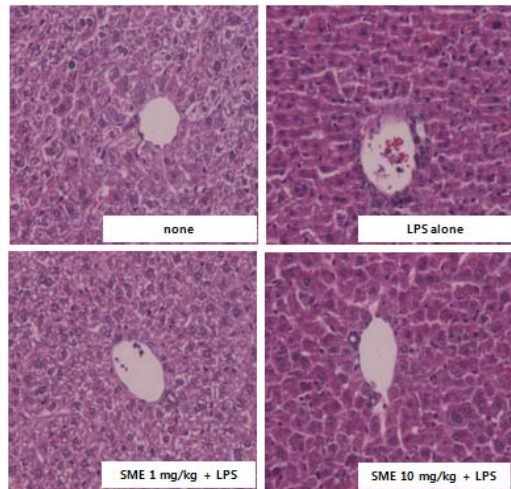


Fig. 4. Effect of SME on liver damage in LPS-induced septic shock.

SME was administrated orally to mice at 1, 10 mg/kg, 1 hr before LPS. Then, LPS was injected intraperitoneally at 37.5 mg/kg. Mice were sacrificed 3 hr after LPS injection, and the liver was harvested. The tissues were fixed, embedded, and stained with H&E. Representative images were obtained at $\times 400$ magnification.

3. Septic shock에 의해 유도되는 간과 폐의 손상에서 SME의 효과

SME를 주입하고 LPS로 septic shock을 유도한 생

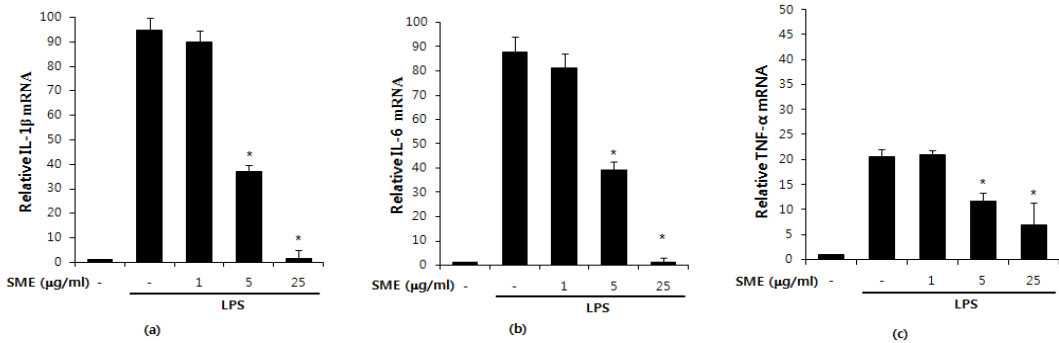


Fig. 5. Effects of SME on expression of inflammatory cytokines in LPS-induced peritoneal macrophages (a, b, c).

Murine peritoneal macrophages were cultured for 1 hr either in a medium alone or in a medium that contained SME, as indicated. Then, the cells were treated with LPS for 24 hr. mRNA levels of cytokines were measured by real-time RT-PCR. Values are the means \pm SE of three experiments. * $p < 0.05$ vs LPS treatment alone.

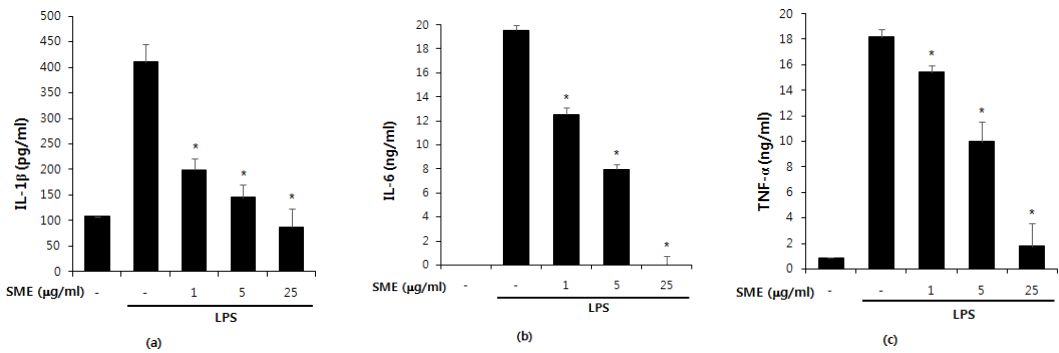


Fig. 6. Effects of SME on secretion of inflammatory cytokines in LPS-induced peritoneal macrophages (a, b, c).

Murine peritoneal macrophages were cultured for 1 hr either in a medium alone or in a medium that contained SME, as indicated. Then, the cells were treated with LPS for 24 hr. Cytokine levels in the supernatants were measured by ELISA. Values are the means \pm SE of three experiments. * $p < 0.05$ vs LPS treatment alone.

취로부터 간과 폐를 적출하였다. 간과 폐의 조직학적 관찰에 의하면 LPS에 의한 손상의 지표로 사용되는 조직의 형태변화, 괴사, neutrophil 침윤, 출혈 등이 SME를 투여한 생쥐의 간과 폐에서는 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, 4).

4. 복강 대식세포에서 SME가 세포 생존율에 미치는 영향

생쥐의 복강으로부터 대식세포를 분리하여 그 세포의 활성화 과정에서 SME의 효과를 조사하였다. 우선, 실험에 사용할 SME의 농도 결정을 위해 MTT 분석

법을 이용하여 세포의 viability를 조사하였다. 실험 결과 1, 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 안정적인 세포 생존율을 유지하였다

5. 복강 대식세포의 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA 발현에서 SME의 효과

복강으로부터 분리한 대식세포에 LPS를 자극하여 RT-PCR를 시행하였다. SME로 처리된 대식세포에서 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA 발현은 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 5).

6. 복강 대식세포의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 분비에서 SME의 효과

복강으로부터 분리한 대식세포에 LPS를 자극하여 염증관련 사이토카인 분비를 ELISA assay로 측정하였다. SME는 염증관련 사이토카인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 분비를 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 6).

7. 복강 대식세포의 NO 생성에서 SME의 효과

LPS에 의해 분비되는 NO의 대사산물인 nitrite의 양을 측정하여 NO 생성의 지표로 표현하였다. SME는 복강 대식세포에서 LPS에 의한 NO 합성을 현저히 저해하는 결과를 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

8. 복강 대식세포의 iNOS 발현에서 SME의 효과

NO 생성의 주요 메커니즘은 iNOS의 발현의 유무인데 이것을 확인하기 위하여 LPS로 유도된 복강 대식세포에서 iNOS의 단백질 발현량을 Western blotting으로 확인하였다. SME는 복강대식세포에서의 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하였다(Fig. 8).

IV. 고 찰

개체는 외부인자로 인한 손상에 대한 주의 깊은 방어 없이는 생존이 불가능하다. 이 중요한 방어체계 중의 하나인 선천 면역체계는 지속적으로 개체의 외부 침입자의 존재를 검색한다²⁰. 그중 염증은 미생물 감염이나 세포 손상으로 인해 유발되는 반응이며, 염증이 발생하면 손상된 조직으로 혈액공급이 증가하고, 혈관 투과성이 향상되며, 면역세포들이 이동한다^{21,22}. 혈액으로부터 감염부위에 보충되는 단핵구는 대식세포로 분화하고 호중구와 함께 포식작용으로 미생물을 포식소체 내에서 과산화라디칼과 산화질소(NO)라는 반응성 산소종(ROS)과 단백질 분해 효소인 elastase,

cathepsin G 등을 이용하여 미생물을 파괴시킨다^{23,24}. 그러나 이들 세포성 선천면역 반응은 숙주조직에 심각한 손상 없이 감염 내 미생물을 제거하지만 그 활성이 조절되지 못하고 강하게 지속되면 정상 숙주 조직의 손상을 초래한다^{25,26}.

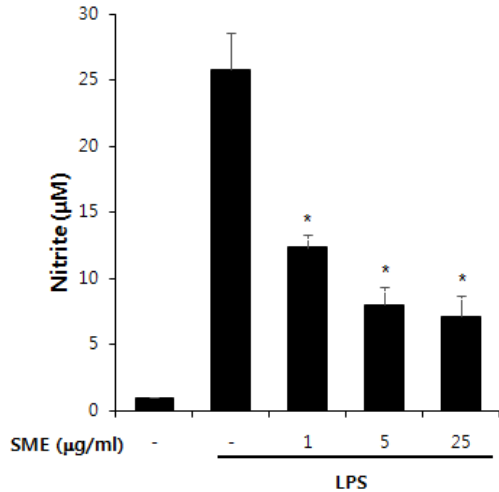


Fig. 7. Effect of SME on NO production in LPS-induced peritoneal macrophages.

TG-elicited macrophages were cultured for 1 hr either in a medium alone or in a medium that contained SME, as indicated. Then, the cells were treated with LPS. The amount of nitrite was measured after 24 hr of incubation by using the Griess method. Values are the means \pm SE of three experiments. * $p < 0.05$ vs LPS treatment alone.

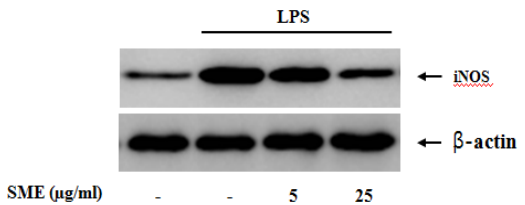


Fig. 8. Effect of SME on iNOS expression in LPS-induced peritoneal macrophages.

Macrophages were cultured for 1 hr either in a medium alone or in a medium that contained SME. Then, After stimulation with LPS for 24 hr, the cell lysates were analysed by Western blotting using antibodies for iNOS and β -actin was used as an internal control to monitor equal protein loading.

선천면역 반응 동안 생산되는 염증성 사이토카인 중 가장 중요한 세가지인 IL-1, IL-6, TNF- α 등은 시상하부에 작용하여 체온의 증가를 일으켜 열이 나게 하고²⁷⁾ 간세포에 작용하여 C-반응단백질(CRP), SAP, fibrinogen 등의 분비를 자극하여 감염에 대한 방어와 조직손상에 따른 조직복구를 자극하게 한다²⁸⁾. 특히 TNF- α 는 thrombomodulin의 생성을 억제시켜 호중구에 의한 혈관 막힘을 일으키고 심근수축과 혈관 평활근의 수축을 방해하여 빠른 혈압강하에 따른 쇼크를 초래하기도 한다²⁹⁾. 이외에도 IFN- γ 와 IL-12도 관여하는 것으로 알려져 있고, 이들 염증성 사이토카인이 정상적인 면역반응의 범주를 벗어나 엄청난 양으로 분비되는 사이토카인 폭풍이라는 현상은 중증 감염에 따른 급성 면역반응으로 초래되는 전신적 병적결과를 초래하기도 한다^{30,31)}.

중증의 세균성 패혈증의 한 예는 그람음성균의 LPS와 그람양성균의 리포테이코산에 의해 초래되는 패혈성 쇼크(endotoxin shock, 내독소 쇼크)라는 중후군이며, 혈관 장애로 인한 순환허탈, 과중성혈관내 응고증, 대사장애 등으로 특징 지어진다^{9,32,33)}. 실험동물에서 LPS나 리포테이코산을 주입하면 패혈성 쇼크를 유도할 수 있고 TNF- α 자체로 주입함으로써 같은 증상을 재현할 수 있다. 하지만 TNF- α 합성의 길항제는 실험동물에서 사망률을 감소시키지만 TNF- α 항체를 이용한 임상적 시도는 패혈증 환자의 상태를 호전시키지 못한다^{34,35)}. 이는 아마도 TNF- α 외에도 다른 사이토카인이나 염증매개 물질 등이 유사한 그리고 복합적인 반응을 일으키기 때문이라고 여겨진다. 임상에서 패혈성 쇼크의 증상은 보통 의식 상태의 변화, 혈압저하, 빈맥, 빈호흡, 핏노를 시작으로 피부 온도 변화 및 신장, 폐, 간, 심장 등의 장기부전으로 이어지게 되는데³⁶⁾, 한방피부외과학 영역에서 패혈증 및 패혈성 쇼크와 유사한 증상들은 走黃과 內陷이라는 질환에서 찾아볼 수 있다¹⁰⁾. 走黃은 疔瘡의 火毒과 熱毒이 營血로 들어가 장부를 공격한 것이고, 內陷은 疽毒 혹은 疔 이외의 기타 창양에서 毒氣가 안으로 들

어가 營血에 머물러 장부에 전해진 것으로서³⁷⁾, 走黃은 疔瘡의 熱毒이 침범하는 장부에 따라서 煩燥不安, 神昏譫語, 瘰癧抽風, 腹脹噎腐, 咳嗽喘急, 尿少, 發斑 등의 다양한 전신증상을 동반하게 되고³⁸⁾ 正邪의 상태에 따라 邪盛熱極한 火陷, 邪盛正虛한 乾陷, 正虛邪衰하고 陰陽兩竭한 虛陷으로 구분되는 內陷도 煩燥不安, 神昏譫語, 氣息粗促, 形神萎頓, 自汗肢冷 등의 다양한 증상을 나타낸다^{39,40)}.

走黃과 內陷은 疔毒, 疽毒 및 기타 창양의 熱毒, 火毒이 入營血하여 장부에 영향을 주는 것이므로 清熱解毒과 더불어 血分의 熱毒, 火毒을 치료해야 한다. 走黃의 치료는 涼血清熱解毒을 위주로 하면서 증상에 따라 養血安神을 병행하게 되며^{10,41)}, 內陷의 치료는 단계에 따라 涼血清熱, 解毒養陰, 補養氣血, 清心安神, 溫補脾腎 등의 치법을 사용하게 된다⁴²⁾. 따라서 血分의 熱毒과 火毒, 즉 血熱을 다스리는 것이 패혈증, 패혈성 쇼크에 해당하는 走黃, 內陷의 중요한 치료법이 됨을 알 수 있다.

이에 涼血清熱, 養血安神, 活血祛瘀 등의 효능이 있고 癥瘕積聚, 瘡瘍腫痛, 肝脾腫大 등에 사용되는 丹蔘이 血熱에 의한 패혈성 쇼크 및 염증에 대하여 효과가 있을 것이라 사료되어 본 연구를 진행하게 되었다¹¹⁾. 丹蔘은 血분에 작용하여 苦味로 強行血하고 약간 차가운 성질로 능히 血熱을 제거할 수 있으므로 活血祛瘀의 효과가 있어 대개 血熱과 瘀血이 있는 모든 증에 응용할 수 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

본 연구에서는 생쥐에 LPS를 투여하여 패혈성 쇼크를 유발한 동물모델을 이용하여 丹蔘의 패혈성 쇼크에 대한 효과를 알아보고, 그 기전을 생쥐의 복강으로부터 대식세포를 분리하여 그 활성을 다양한 면역학적 분석 방법을 통해 조사하였다. 우선 SME의 *in vivo*에서의 독성을 조사하여 농도를 결정하였다. 10 mg/kg 이하에서는 생쥐에 유의미한 독성을 나타내지 않음을 확인하였고 1, 5, 10 mg/kg의 농도로 SME를 생쥐에 구강 투여한지 1시간 후 LPS를 복강 내로 주사하여 12시간 단위로 5일간 경과를 관찰했다. LPS

단독으로 septic shock이 유도된 생쥐는 모두 24시간 만에 생존율 0%를 나타냈고, SME를 투여한 생쥐에서 농도 의존적으로 생존율이 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

SME가 어떤 기전을 통해서 생쥐의 생존율을 높여주는지 분석하기 위해 SME를 투여한 septic shock 생쥐모델의 혈액 내 염증성 사이토카인 분비량과 간과 폐조직의 상태를 관찰하였다. LPS 접종 1시간 전에 생쥐에게 SME를 투여하고, LPS 접종 3시간 경과 후에 혈액과 장기 조직을 채취하였다. SME가 LPS에 의해 유도되는 혈액 내 IL-6 및 TNF- α 의 분비를 농도 의존적으로 감소시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 그리고 LPS에 의해 유도되는 sepsis는 많은 장기의 손상을 일으킬 수 있으나 조직학적 관찰을 해본 결과, LPS에 의한 손상의 지표가 되는 조직의 형태변화, 괴사, neutrophil 침윤, 출혈 등이 丹蔘을 투여한 생쥐의 간과 폐에서는 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, 4). SME의 투여가 septic shock 생쥐 모델의 혈액 내 염증성 사이토카인의 분비를 감소시키고 간과 폐의 손상을 현저히 억제함으로써 생존율을 증가시킴을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 丹蔘 주사액 처치가 sepsis 쥐 모델에서 TNF- α 감소 및 폐 보호 효과가 있고⁴³⁾ septic shock 토끼 모델에서 현저한 TNF- α 억제 및 간, 폐, 심장 조직의 병리적 손상 완화 효과가 있는 것으로 보고했던⁴⁴⁾ 기존의 연구 등도 관련성이 높은 것으로 생각된다.

LPS에 의해 유도되는 sepsis는 다양한 염증성 사이토카인과 반응성 산화종(ROS)을 분비하는 대식세포의 활성화에 기인하므로 생쥐의 복강으로부터 분리한 대식세포의 염증성 사이토카인 합성 및 분비에서 SME의 효과를 조사하였다. SME의 농도를 1, 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ 로 달리하여 대식세포를 처리한 후에 LPS로 자극하였다. IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현은 SME의 농도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났고 IL-1 β , IL-6, TNF- α 모두 SME의 농도가 증가함에 따라 분비가 감소되는 것으로 나타났(Fig. 5,

6).

NO는 Reactive nitrogen species (RNS)라고 불리며 활성산소종 하나이며, 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁵⁾. SME가 LPS에 의해 유도되는 NO, iNOS 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SME의 농도를 1, 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ 로 달리하여 대식세포를 처리한 후에 LPS로 자극하였다. LPS에 의해 분비되는 NO의 대사산물인 nitrite 농도를 측정하여 NO 생성의 지표로 표현하였으며 SME가 NO 생성을 현저히 억제하는 결과를 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 그리고 SME는 복강 대식세포에서의 iNOS 발현을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

생쥐 복강 대식세포를 대상으로 한 상기 실험을 통해 SME가 염증성 사이토카인의 합성 및 분비를 감소시키고, NO 및 iNOS의 생성을 억제하는 기전을 통해서 septic shock 생쥐 모델에 유효한 효과를 나타낼 수 있었다. 이러한 실험 결과는 U-937 세포를 대상으로 丹蔘 추출물이 PMA 또는 LPS에 의해 활성화되는 TNF- α 와 COX-2 mRNA 발현을 유의성 있게 감소시키고^{46,47)} LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 丹蔘 추출물이 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, NO 생성 감소 및 iNOS, COX-2의 발현을 저해하는 것으로 나타난^{48,49)} 선행 연구들과 같이 SME가 양호한 염증 억제 효과를 가지고 있음을 시사한다.

이상의 연구 결과들로 보아 血熱에 효과적인 SME가 염증성 사이토카인 발현 및 NO 생성을 조절하는 기전을 통해 패혈성 쇼크에 대해 억제 기능을 보이는 것으로 생각되며, 이에 SME가 血熱에 의해 발생할 수 있는 패혈증 및 다양한 염증성 질환에 의한 제반 증상 치료에 효과적일 것으로 기대되는 바이다. 향후 丹蔘의 다양한 약리 성분들에 대한 개별적인 효과 연구 및 추출물 자체 혹은 약침용 제제 등으로의 임상적 활용을 위한 추가적인 연구 수행이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

丹蔘은 LPS에 의해 유도되는 생쥐의 패혈성 쇼크에 대해 억제 기능을 보이는 것으로 사료된다.

1. 丹蔘은 LPS에 의해 유도되는 endotoxin shock 생쥐모델에서 생존율을 증가시켰다.
2. 丹蔘은 endotoxin shock 생쥐모델의 혈액 내 염증성 사이토카인의 분비를 감소시켰다.
3. 丹蔘은 endotoxin shock에 의해 유도되는 간과 폐의 손상을 현저히 억제시키는 효과를 나타내었다.
4. 丹蔘은 생쥐로부터 분리한 복강 대식세포에서 염증성 사이토카인의 합성 및 분비를 감소시켰다.
5. 丹蔘은 생쥐로부터 분리한 복강 대식세포에서 iNOS의 발현 및 NO의 생성을 현저히 감소시켰다.

References

1. Balk RA, Severe sepsis and septic shock, Definitions, epidemiology, and clinical manifestations, *Crit Care Clin*, 2000;16(2): 179-92.
2. Bateson M, Patton A, Sepsis: contemporary issues and implications for nursing. *Br J Nurs*, 2015;24(17):864-6.
3. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, et al, Sepsis : a roadmap for future research, *Lancet Infect Dis*, 2015;15:581-614.
4. Wenzel RP, Edmond MB, Septic shock—evaluating another failed treatment, *N Engl J Med*, 2012;366:2122-4.
5. Czura CJ, “Merinoff symposium 2010: sepsis” —speaking with one voice, *Mol Med*, 2011;17:2-3.
6. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ,

Sepsis definitions: time for change, *Lancet*, 2013;381:774-5.

7. Janeway CA Jr, Medzhitov R, Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol*, 2002; 20:197-216.
8. Li P, Sun M, Wohland T, Ho B, Ding JL, The molecular mechanism of interaction between sushi peptide and *Pseudomonas* endotoxin, *Cell Mol Immunol*, 2006;3(1):21-8.
9. Beutler B, Rietschel ET, Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nat Rev Immunol*, 2003;3:169-76.
10. Textbook Compilation Committee of National University of Traditional Korean Dermatology & Surgery, *Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery*. Busan:Sunwoo, 2007:139-62, 185-91.
11. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools, *Herbology*. Seoul: Younglimsa, 2000:419-20.
12. Shin MK, *Clinical Traditional Herbology*. Seoul:Younglimsa, 2010:534-5.
13. Kim HC, *Herbal Pharmacology*. Seoul: Jipmundang, 2001:332-4.
14. Ahn DK, *Korean Herbal illustrations*. Seoul:Kyohaksa, 1998:558.
15. Fish JM, Welchons DR, Kim YS, Lee SH, Ho WK, Antzelevitch C, Dimethyl lithospermate B, an extract of Danshen, suppresses arrhythmogenesis associated with the Brugada syndrome, *Circulation*, 2006;113(11):1393-400.
16. Zhou L, Zuo Z, Chow MS, Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use, *J Clin Pharmacol*, 2005;45(12):1345-59.
17. Wing-Shing Cheung D, Koon CM, Ng CF,

- Leung PC, Fung KP, Kar-Sing Poon S, et al. The roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) and *Pueraria lobata* (Gegen) inhibit atherogenic events: a study of the combination effects of the 2-herb formula. *J Ethnopharmacol*. 2014;143(3):859-66.
18. Jang TS, Zhang H, Kim G, Kim DW, Min BS, Kang W, et al. Bioassay-guided isolation of fatty acid synthase inhibitory diterpenoids from the roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Arch Pharm Res*. 2012;35(3):481-6.
 19. Chen X1, Guo J, Bao J, Lu J, Wang Y. The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): a systematic review. *Med Res Rev*. 2014;34(4):768-94.
 20. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002;420(6917):853-9.
 21. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Current Opinion in Critical Care*. 2006;12: 595-601.
 22. Mariathasan S, Monack D. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7:31-40.
 23. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008; 112(4):935-45.
 24. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:825-52.
 25. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*. 2007;219:88-102.
 26. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26: 421-52.
 27. Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T. Cytokines and fever. *Front Biosci*. 2004; 9:1433-49.
 28. Gabay C, Genin B, Mentha G, Iynedjian PB, Roux-Lombard P, Guerne PA. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) does not inhibit the production of C-reactive protein or serum amyloid A protein by human primary hepatocytes. Differential regulation in normal and tumour cells. *Clin Exp Immunol*. 1995;100(2):306-13.
 29. Kume M, Hayashi T, Yuasa H, Tanaka H, Nishioka J, Ido M, et al. Bacterial lipopolysaccharide decreases thrombomodulin expression in the sinusoidal endothelial cells of rats - a possible mechanism of intrasinusoidal microthrombus formation and liver dysfunction. *J Hepatol*. 2003;38(1):9-17.
 30. Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, et al. Cytokine profile in severe Gram-positive and Gram-negative abdominal sepsis. *Sci Rep*. 2015;5:11355.
 31. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Eng J Med*. 2003;348(2):138-50.
 32. Stearns-Kurosawa DJ, Lupu F, Taylor FB Jr, Kinasevitz G, Kurosawa S. Sepsis and pathophysiology of anthrax in a nonhuman primate model. *Am J Pathol*. 2006;169 (2):433-44.
 33. Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemeermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive

- bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock*, 2003;20(5):402-14.
34. Greenelch KM, Haudenschild CC, Keegan AD, Shi Y. The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. *Brain Behav Immun*, 2004;18(5):476-84.
35. Grandel U, Grimminger F. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Crit Rev Immunol*, 2003;23(4):267-99.
36. Kang BC. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. Seoul:Hanwoori, 2002:1226-7.
37. Li RQ. *Traditional Chinese Medicine Surgery*. Beijing:China Press of Traditional Chinese Medicine, 2005:95-9.
38. Shang DJ. *A New Edition of Traditional Chinese Medicine Surgery*. Shandong:Jinam Publication, 1995:81-2.
39. Wang P, Zhang YS, Li RQ. *An complete of Traditional Chinese Medicine Surgical treatment*. Hebei:Hebei Scientific and Techincal Publication, 1997:95-100.
40. Wang P. *Traditional Chinese Medicine Surgery*. Beijing:China Press of Classics, 1994:108-12.
41. Chae BY. *Korean Medicine Surgery*. Seoul:Komoonsa, 1993:52-4.
42. Rho SS. *Full-Color Dermatology*. Seoul:IBC Design, 2006:314-8.
43. Xia YL, Liu X. The effect of *Salviae miltiorrhiza* on TNF- α in rats with acute lung injury induced by sepsis and its protective role to lung. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2004;20(6):14-6.
44. Xu ZR, Zhang JL, Zheng CM, Cao Q, Wang Y, Zuo XR. Protective effect of *Salvia Miltiorrhiza* injection on rabbits with endotoxic shock. *Chin J Emerg Med*, 2004;13(10):679-84.
45. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med*, 1991;91(3C):31S-8S.
46. Kim HE, Min SY, Kim JH. In Vitro Study of Anti-inflammatory and Analgesic Effects of *Salvia Miltiorrhiza* (SM) Extracts Using Luciferase Reporter Gene Assay. *J Korean Oriental Med*, 2008;29(3):88-99.
47. Lee HC, Yeom MJ, Kim GH, Han DO, Zhao MA, Shim IS, et al. In vitro Study of Anti-inflammatory Effects of *Salvia Miltiorrhiza* Extracts Using Luciferase Reporter Gene Assay. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*, 2004;18(3):740-6.
48. Yun HJ, Heo SK, Yun HJ, Park WH, Park SD. Anti-inflammatory effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix*. *Korean J Herbology*, 2007;22(4):65-73.
49. Lee SE, Cho SI. Anti-inflammatory effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* extract on RAW264.7 cell via anti-oxidative activities. *Korean J Herbology*, 2015;30(4):89-94.