

# LPS로 유발한 RAW264.7 세포 염증반응에 대한 加減通順散의 억제 효과

이수환 · 김순중

세명대학교부속한방병원 한방재활의학과

## Anti-inflammatory Effects of Gagamtongsoon-San Extract on Lipopolysaccharide(LPS)-Induced Inflammation in RAW264.7 Cells

Soo-Hwan Lee, K.M.D., Soon-Joong Kim, K.M.D.

Department of Rehabilitation Medicine of Korean medicine, Semyung University Korean Medicine Hospital

RECEIVED Mar 19, 2018

REVISED Apr 1, 2018

ACCEPTED Apr 2, 2018

CORRESPONDING TO

Soon-Joong Kim, Semyung University  
Korean Medicine Hospital, 66,  
Semyungro, Jecheon, Korea

TEL (043) 649-1920

FAX (043) 645-1382

E-mail kimsj@semyung.ac.kr

Copyright © 2018 The Society of  
Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** This study was designed to investigate whether the Gagamtongsoon-San (GT) has an inhibitory effect and its mechanisms are associated with the iNOS and COX-2.

**Methods** Cytotoxic activity of GT extract on RAW264.7 cells was evaluated by using 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution. Inflammatory condition was induced by LPS. NO production was measured using Griess reagent system. The expressions of iNOS and COX-2 mRNA and protein were determined by real-time PCR. The concentrations of PGE2 were measured by an enzyme immunoassay (EIA).

**Results** The GT does not impair the cell viability in tested concentration 500 µg/ml or below. GT significantly reduced the NO production in a dose-dependent manner. GT 500 µg/ml also suppressed LPS-induced mRNA expressions of iNOS and COX-2. GT 500 µg/ml reduced the PGE2 secretion in LPS induced RAW264.7 cells.

**Conclusions** These outcomes show that GT extract has an anti-inflammatory activities. And also this conclusion can be the data that supports the GT's anti-inflammatory effect objectively. (**J Korean Med Rehabil 2018;28(2):37-45**)

**Key words** Gagamtongsoon-San(GT), Anti-inflammatory, RAW264.7, LPS

## 서론»»»»

염증은 조직에 손상을 일으켜 인체에 통증을 유발하게 된다. 한의학에서의 통증은, 『黃帝內經·素問』<sup>1)</sup>의 19病機에서 ‘諸痛瘡瘍, 皆屬於火’라고 하여 모든 통증, 창증, 가려움은 대부분 火에 속한다고 보았다. 營衛不和로 인해 氣血疏通이 저하되고 經氣의 흐름이 원활하지 않게 되면, 痰飲·瘀血 등의 비정상적인 산물이 생성되는 환경이 만들어진다. 이와 같은 인체 내부의 환경이 火로서 작용해 염증이 되고 통증을 유발하는 것이다<sup>1)</sup>.

염증은 다양한 염증 매개 인자들이 대식세포에 인식되

는 것으로부터 시작된다. 대식세포는 면역세포 중 하나이며, 모든 조직에 존재하고 체내 유입된 염증의 원인을 인식해 염증매개물질을 생성해 다른 면역세포들의 활성화를 유도시켜 염증원인을 제거 복구하는 역할을 한다<sup>2)</sup>. 염증매개물질인 lipopolysaccharide (LPS) 처리 시 대식세포는 tumor necrosis factor receptor를 유도시키고, tumor necrosis factor (TNF)는 염증성 cytokine 및 염증성 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase -2 (COX-2)를 발현시킨다<sup>3-5)</sup>.

iNOS에 의해 생성된 산화질소 (nitric oxide, NO)의 상호조절은 산화적 손상을 일으키는데 염증 및 신경질환등

다양한 질병과 관련이 있으며, COX-2는 세포 인지질에서 유래하고 불포화 지방산인 arachidonic acid를 prostaglandin<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)로 전환시켜 혈관확장과, 통증을 생성시키는 등<sup>6,7)</sup> iNOS와 COX-2는 만성염증과 자가면역질환의 원인이 된다<sup>8,9)</sup>.

加減通順散은 『晴崗醫鑑』<sup>10)</sup>의 疼痛, 痺風疾患編에 수록된 처방이다. 『東醫寶鑑·雜病編』의 通順散을 原方으로 하였고, 癰疽編에 속하여 그 중 특히 流注骨疽를 치료하는 약물로 기재되어 있다. 그 증상으로는 국부적으로 發熱, 發赤, 堅勁, 腫痛, 환부의 陷沒, 突起 및 化膿의 양상을 나타낸다<sup>11)</sup>. 加減通順散은 通순산을 기본방으로 하여 川芎, 半夏, 橘皮 등의 약재를 加味하여 活血祛瘀하면서 理氣祛痰 효능을 증진시켜, 炎症 억제와 함께 인체를 유지하는 특성을 가진 痰飲을 제어하여, 다발성 염증질환에 적용하였다<sup>11)</sup>.

그에 따라 본 연구에서는 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 mouse macrophage cell line을 이용하여 加減通順散 추출물이 나타내는 염증억제반응을 관찰하여, 염증성 질환과 통증치료에 활용 가능성을 확인하고자 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 加減通順散의 구성과 용량은 『晴崗醫鑑』<sup>10)</sup>에 준하였고, 구성약재를 에이치맥스(제천, 대한민국)으로부터 구입하여 사용하였다. 加減通順散 1첩의 구성과 용량은 다음과 같다 (Table I).

실험에 사용하기 위해 加減通順散 5첩 분량 (약 290 g)을 10배 중량의 70% ethanol에 넣고 상온에서 1일 동안 추출한 후 감압농축기 (EYELA, Japan) 및 동결건조기 (Labcono, USA)를 이용하여 추출물 (45 g, 수율 6.2%)을 만들었으며, 이를 냉동실에 보관하였다가 실험 직전에 필요한 농도로 만들어 사용하였다. 상기 추출물을 본 연구에서는 GT라고 이름하였다.

#### 2) RAW264.7 세포

본 실험에 사용한 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, 서울, 대한민국) 으로부터 구입하여 사용하였다.

#### 3) 시약

추출에 사용한 ethanol은 SK chemicals (Seoul, South Korea), 세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS)과 Penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사 제품을, PGE<sub>2</sub> Assay는 R&D Systems (Minneapolis, USA)사 제품을, Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 Sodium carbonate, Diethylene glycol, 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl 등 이하 나머지 시약들은 Sigma-Aldrich Co.를 이용하였다.

## 2. 방법

#### 1) 세포배양

마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5%

**Table I.** The Compositions of Gagamtongsoon-San (jiājǎntōngshùn-sǎn)

Herb name	Pharmacognostic name	Amount(g)
白何首烏	Polygoni Multiflori Radix	6
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
橘皮	Citri Pericarpium	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
獨活	Angelicae Pubescentis Radix	4
木通	Akebiae Caulis	4
半夏	Pinelliae Rhizoma	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	4
小茴香	Foeniculi Fructus	4
烏藥	Linderae Radix	4
赤茯苓	Hoelen	4
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	4
枳殼	Aurantii Immaturus Fructus	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
Total		58

CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

## 2) RAW264.7 세포 독성 시험

GT에 대한 세포 생존율을 측정하기 위해 세포 개수를 세어 well 당  $2 \times 10^5$  cells가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 18시간 배양하였다. 이후 부착된 각 세포들에 추출물을 농도별 (62.5µg/ml, 125µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml, 1000µg/ml)로 처리하고, 1시간 뒤 10 ng/ml의 농도로 LPS를 처리하여 24시간 처리하였다.

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 방법으로 분석하였다. 이는 Carmichael 등의 방법<sup>12)</sup>을 응용하였다. 세포가 부착되어 있는 plate에 MTT solution (1 mg/ml)을 동량반응 시켜 2시간 동안 incubator에서 반응시키고 상층액을 제거 한 후 남아 있는 formazan을 용해시켜 Fluorescence reader를 이용해 570 µm에서 흡광도를 측정하였다. 각 데이터들은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Percent values (\%)} = [1 - (\text{Control Abs} - \text{Sample Abs}) / \text{Control Abs}] \times 100$$

## 3) NO 생성 억제효과 측정

약물 처리 후 NO를 측정하기 위해 상기와 같이 처리한 균의 상층액을 다른 plate에 옮겨 Griess reagent (1% (w/v) sulfanilamide, 1% (w/v) naphthylethylendiamine in 30% acetic acid)와 동량 반응 시켜 ELISA reader를 이용해 540µm에서 흡광도를 측정하였다.

## 4) RNA 추출

유전자 발현량의 변화를 확인하기 위하여 다음과 같이 Trizol (ThermoFisher, Seoul, South Korea)을 이용하는 방법으로 RNA를 추출하였다. 실험한 세포를 모아 Trizol 용액에 넣고 분쇄한 후 chloroform을 첨가하여 잘 섞어주

고 4°C, 12,000 × g에서 15분간 원심분리 하였다. 이후 상층액을 취하여 isopropanol과 혼합한 뒤 다시 4°C, 12,000 × g에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 75% DEPC-treated water를 첨가하여 4°C, 7,500 × g에서 5분간 원심분리 하고 다시 상층액을 제거한 뒤 상온에서 10분간 건조시켰다. 완전히 건조된 튜브에 RNase-Free water를 50 µl 넣어 RNA를 녹인 후 정량하여 -80°C에서 보관하였다.

## 5) iNOS, COX-2의 mRNA 발현 측정

추출된 total RNA는 Qiagen사의 Quantitect™ RT kit (Qiagen, Valencia, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA로 합성하였다. 12 µl의 RNA에 2 µl의 gDNA wipeout buffer를 첨가한 후 42°C에서 2분간 반응시켰다. 이후 reverse transcriptase 1 µl와 RT buffer 4 µl, RT primer mix 1 µl를 첨가하여 42°C에서 15분간 반응시킨 후 95°C에서 3분간 반응시켰다. 이렇게 합성된 cDNA에서 mRNA 발현을 동사의 QuantiTect™ SYBR® Green PCR kit를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. iNOS, COX-2의 Primer 서열은 Table II에 표시한대로 합성하였으며, cDNA template (1 µl)와 forward, reverse primer (10 µM, 각 1 µl), Kit에서 제공된 master mix (10 µl) 및 H<sub>2</sub>O (7 µl)를 혼합한 후 95°C에서 10분간 Polymerase를 활성화 시켰다. 이후 denaturing 95°C 10초, annealing 60°C 15초, polymerization 72°C 20초씩 40 cycle을 반복하고, post-polymerization은 72°C 2분을 수행하였다.

분석은 Rotor-gene Q Realtime PCR (Qiagen, USA)을 이용하여 수행하였으며, 유전자 발현 값은 동사의 Rotor-gene Q series software 1.7을 이용하여  $\Delta\Delta$  CT 방법에 기초하여 계산하였다.

## 6) Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 측정

활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증물질인 PGE<sub>2</sub>

**Table II.** PCR Primers

mRNA	Forward	Reverse
iNOS	5'-GCT ACC ACA TTG AAG AAG-3'	5'-GAG CTG GAA GAA ATA GTC-3'
COX-2	5'-TGT CCT TTA AAT ATG TGT TAC C-3'	5'-CCT TGG TTC TTG TTA AGC-3'
GAPDH	5'-GCC ATT TGC AGT GGC AAA GTG G-3'	5'-GAT GGG CTT CCC GTT GAT GAC AAG C-3'

의 양을 세포배양액으로부터 효소면역반응법 (Enzyme Immuno-Assay; EIA, R&D systems, Minneapolis, USA) 을 이용하여 측정하였다. 즉 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약물을 처리하여 30분간 배양한 다음 LPS (10 ng/ml)를 처리하여 16시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 내에 존재하는 PGE<sub>2</sub>의 양을 측정하였으며, 세포배양액 내 존재하는 PGE<sub>2</sub>의 농도는 PGE<sub>2</sub> 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

### 7) 통계 분석

모든 실험은 3회 반복하고, 실험 결과는 평균 ± 표준편차 (mean ± S.D.)로 표현하였다. 대조군 및 실험군 간의 통계적 유의성은 일원 분산 분석 (One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test)을 통해 확인하였다. 모든 그래프에서 *p* 값은 0.05이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

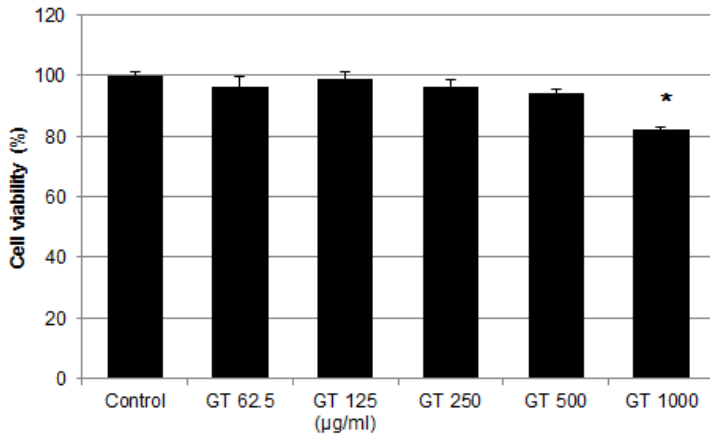
## 결과»»»»

### 1. 세포 독성 측정

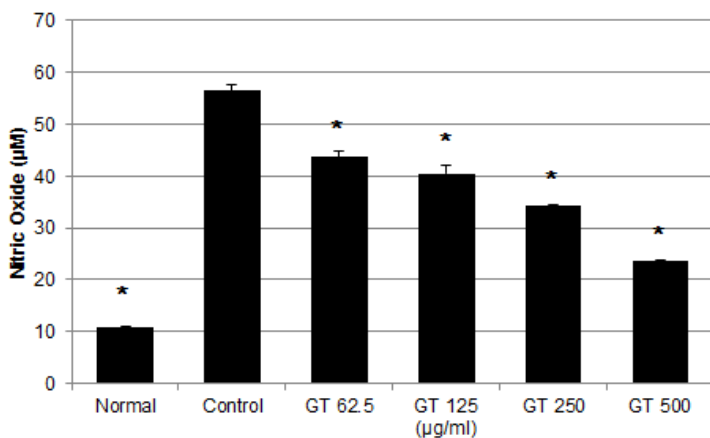
GT에 의한 대식세포의 독성을 MTT assay에 의해 확인한 결과 농도별 약물을 주입하였을 때 모든 농도에서 독성을 나타내지는 않았으나, 1000µg/ml 농도에서 cell viability의 유의한 저하가 관찰되었다 (Fig. 1).

### 2. NO 측정

RAW264.7 세포의 NO 생성 억제 효능을 측정하기 위해 GT를 농도별로 처리한 결과, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 및 500 µg/ml 투여군에서 LPS로 유도된 NO생성을 각각 43.6 ± 1.1 µM, 40.4 ± 1.8 µM, 34.2 ± 0.2 µM, 및 23.5 ± 0.3 µM로 농도의존적으로



**Fig. 1.** Effect of Gagamtongsoon-San (GT) Extract on the Cell Viability of RAW264.7 Cells. The values represent mean ± S.D.(Standard Deviation) of three independent experiments. Cell viability expressed as a percentage of the Control group. Asterisk indicates a significant difference at \**p* < 0.05 level.



**Fig. 2.** Effects of Gagamtongsoon-San (GT) Extract on NO(Nitric Oxide) Production in LPS(Lipopolysaccharide)-Stimulated RAW264.7 cells. The values represent mean ± S.D.(Standard Deviation) of three independent experiments. Control, GT 62.5, GT 125, GT 250, and GT 500 groups were stimulated by LPS (10 ng/ml). All GT-treated groups (62.5, 125, 250, and 500) showed the statistical significances compared with control group. Asterisk indicates a significant difference at \**p* < 0.05 level.

억제하였고, 모든 시험군에서 대조군 GT0군 (control군) 의  $56.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 의 NO 생성량과 비교하여 통계적으로 유의한 NO 생성 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

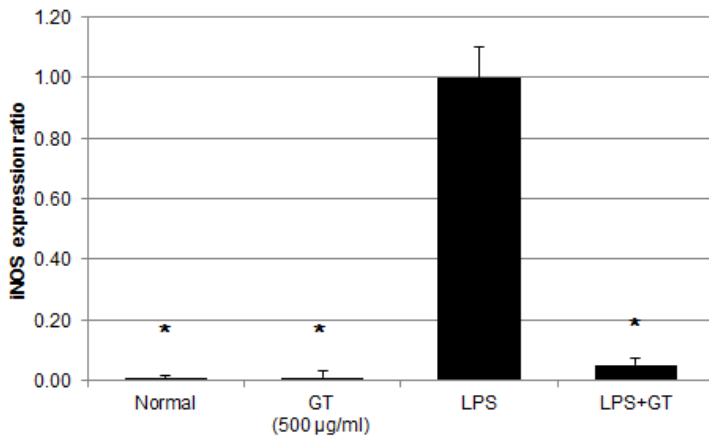
### 3. iNOS 발현 결과

이상에서 실험한 GT 농도 중 최대 억제효능을 보인  $500\mu\text{g/ml}$  농도를 선택하여 이후 기전연구 실험에 사용하였다. RAW264.7 세포의 iNOS 유전자 발현에 대한 효능을 측정하기 위해, 시험군과 동일한 양의 용매만 처리한 Normal군, GT ( $500 \mu\text{g/ml}$ )만 처리한 GT군, LPS ( $10 \text{ ng/ml}$ )만 처리한 LPS군, 및 LPS와 GT  $500 \mu\text{g/ml}$ 를 모두 처리한 LPS+GT군의 4개 군으로 분류하였다. LPS군을 기준으로 하여 iNOS 유전자 발현량을 GAPDH를 내부표준품으로 계산한 결과, Normal군에서  $0.01 \pm 0.01$ , GT군에서  $0.01 \pm 0.02$ , LPS군에서  $1.00 \pm 0.10$ , LPS+GT  $0.05$

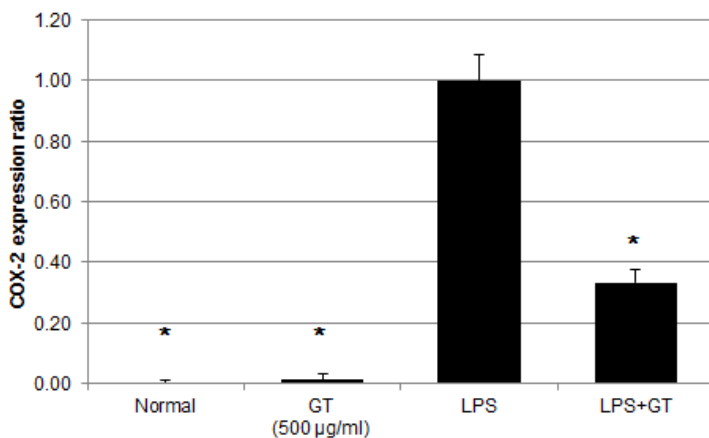
$\pm 0.02$ 로 나타났다. GT  $500 \mu\text{g/ml}$  단독처리군에서 iNOS 유전자 발현이 normal군에 비해 증가하지 않았고, LPS군에서 유전자 발현이 유의하게 증가하였으며, GT처리에 의해 유의하게 감소시켰음을 알 수 있었다 (Fig. 3).

### 4. COX-2 발현 결과

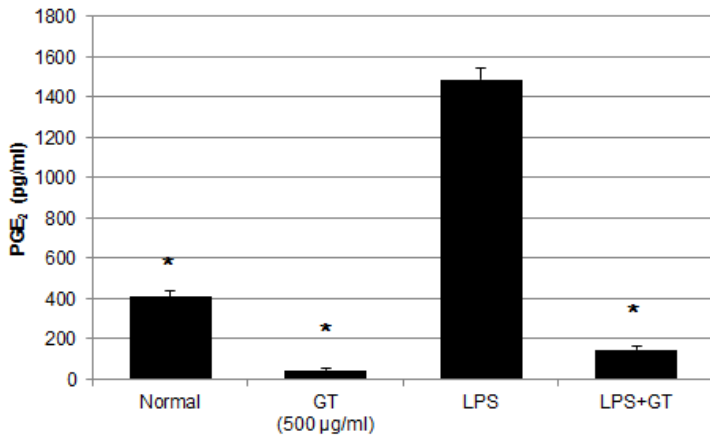
RAW264.7 세포의 COX-2 유전자 발현에 대한 효능을 측정하기 위해, 시험군과 동일한 양의 용매만 처리한 Normal군, GT ( $500 \mu\text{g/ml}$ )만 처리한 GT군, LPS ( $10 \text{ ng/ml}$ )만 처리한 LPS군 및 LPS와 GT  $500 \mu\text{g/ml}$ 를 모두 처리한 LPS+GT군의 4개군으로 분류하였다. LPS군을 기준으로 하여 COX-2 유전자 발현량을 GAPDH를 내부표준품으로 계산한 결과, Normal군에서  $0.00 \pm 0.01$ , GT군에서  $0.01 \pm 0.02$ , LPS군에서  $1.00 \pm 0.09$ , LPS + GT군에서  $0.33 \pm 0.04$ 로 나타났다. GT군에서 normal 군에 비



**Fig. 3.** Effects of Gagamtongsoon-San (GT) Extract on iNOS Gene Expression Ratio in LPS(Lipopolysaccharide)-Stimulated RAW264.7 cells. The values represent mean  $\pm$  S.D.(Standard Deviation) of three independent experiments. All values were calculated as a ratio of LPS group. All three groups (Normal, GT, and LPS+GT) showed the statistical significances compared with LPS group. Asterisk indicates a significant difference at  $*p < 0.05$  level.



**Fig. 4.** Effects of Gagamtongsoon-San (GT) Extract on COX-2 Gene Expression Ratio in LPS(Lipopolysaccharide)-Stimulated RAW264.7 cells. The values represent mean  $\pm$  S.D.(Standard Deviation) of three independent experiments. All values were calculated as a ratio of LPS group. All three groups (Normal, GT, and LPS+GT) showed the statistical significances compared with LPS group. Asterisk indicates a significant difference at  $*p < 0.05$  level.



**Fig. 5.** Effects of Gagamtongsoon-San (GT) Extract on PGE<sub>2</sub>(Prostaglandin E<sub>2</sub>) Secretion in LPS(Lipopolysaccharide)-Stimulated RAW264.7 cells. The values represent mean ± S.D.(Standard Deviation) of three independent experiments. All three groups (Normal, GT, and LPS+GT) showed the statistical significances compared with LPS group. Asterisk indicates a significant difference at \**p* < 0.05 level.

해 COX-2 유전자가 유의하게 증가하지 않았으며, LPS군에서 유전자 발현이 유의하게 증가하였고, GT 500 µg/ml 처리에 의해 유의하게 감소시켰음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

### 5. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 결과

RAW264.7 세포의 PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 효능을 측정하기 위해, 시험군과 동일한 양의 용매만 처리한 Normal군, GT (500 µg/ml)만 처리한 GT군, LPS (10 ng/ml)만 처리한 LPS군 및 LPS와 GT 500 µg/ml를 모두 처리한 LPS+GT군의 4개군으로 분류하였다. PGE<sub>2</sub> 단백질 생성량을 효소면역반응법으로 측정한 결과 Normal군, GT군, LPS군, LPS+ GT군의 PGE<sub>2</sub> 생성량은 각각 409.6±25.4 pg/ml, 43.6±14.2 pg/ml, 1486.7±56.0 pg/ml, 145.9±18.1 pg/ml 이었다. GT 500 µg/ml 단독처리군에서 normal 군에 비해 PGE<sub>2</sub> 생성이 감소하였으며, LPS치리로 인해 PGE<sub>2</sub> 생성이 유의하게 증가하였고, 증가된 PGE<sub>2</sub> 생성은 GT치리에 의해 유의하게 억제되었음을 알 수 있었다 (Fig 5).

## 고찰

加減通順散은 『東醫寶鑑』<sup>11)</sup>의 通順散에서 기원한 처방으로, 卷八 癰疽(下)편의 榮衛返魂湯이라는 이름으로 기재되어 있다. 癰疽·發背·流注腫毒을 치료하며, 癰疽가 생겼을 때 이 약을 쓰면 능히 기혈 소통을 원활히 하여 癰疽를 치료할 수 있다고 명시되어 있다. 또한, 『方藥合

編』<sup>13)</sup>에는 ‘專治痰腫’이라 하여 주로 담종, 즉 피부종기를 치료한다고 되어 있다. 癰疽란 현재까지 보고된 논문 상 정<sup>14)</sup>은 癰疽가 영위기혈 순환 불통으로 인한 염증성 질환을 포함한 종양성 질환의 범주에 속한다고 보았다. 즉, 염증성 질환에 항염증제로 적용하였다고 볼 수 있다. 『晴崗醫鑑』<sup>10)</sup>에서는 상기한 通順散을 기본방으로 川芎, 橘皮, 半夏, 赤茯苓 등 活血, 理氣祛痰之劑를 가미하여 加減通順散이라고 이름하였으며, 외과·피부과 질환이 아닌 疼痛·痺風編에 포함시켰다. 염증억제와 더불어 유주성을 가진 痰飲이라는 病因에 중점을 두고 창제한 처방으로, 流注痰瘀로 전신을 돌아다니면서 통증을 유발하는 다발성 류마티스성 질환에 지금까지 적용되었다. 痰飲流注證은 『東醫寶鑑』<sup>11)</sup>에서 이르길, ‘凡人忽患胸背手脚腰膀隱痛不可忍, 連筋骨牽引釣痛, 坐臥不寧, 時時走易不定’ 이라고 하였고, 이와 같은 증상은 痺證의 범주와 유사하다<sup>15)</sup>. 痺證은 風寒濕熱에 감수되어 肢體, 關節, 肌肉에 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着이 나타나는 것으로, 流注性이거나 한 곳에 장기간 고정되어 있고, 或刺痛, 感麻木, 感腫脹한다. 주로 氣血不通으로 인해 근맥과 관절이 濡養받지 못하여 발생한다. 서양의학적으로는 다발성 관절염, 류마티스 관절염이 이 범주에 속한다<sup>16)</sup>. 종합하자면, 加減通順散은 경락과 기혈이 소통되지 않아 痰飲이 발생하고, 이로 인해 인체에 발생한 다발성 염증성 통증질환인 痰飲流注證에 적용되었다고 볼 수 있다<sup>10)</sup>.

서양의학적으로 inflammatory response는 생체 내에서 항원침입이나 조직손상과 같은 응급상황이 발생하였을 때, lymphocyte를 비롯한 immunocyte들에 의해 나타나는 항원제거 등의 일련의 생체보호반응이다. 염증반응이 일정

수준 이상으로 발생하게 되면, 생체기능에 이상반응을 야기하고 새로운 질병을 발생시키거나 기존 질병을 악화시킨다<sup>16)</sup>. 이러한 사실로 볼 때, 염증 제어는 임상 환자 치료에 있어 중요한 부분을 차지하며, 약물의 항염효능으로 통증 유발의 근원을 차단할 수 있다.

한국사회가 고령화 사회를 넘어 고령사회로 진입함에 따라, 중·노년층에 있어 퇴행으로 인한 관절염 치료법에 관심이 모아지고 있다. 뿐만 아니라 난치병이라고 인식되는 류마티스 관절염에 대해서도 韓藥뿐만 아니라 藥鍼 등 다양한 치료방법들이 연구·개발되고 있다. 상기 질환 치료에 있어, 大羌活湯은 안<sup>17)</sup>, 정<sup>18)</sup>, 大防風湯은 조<sup>19)</sup>, 三氣飲은 최<sup>20)</sup>, 淸熱瀉濕湯은 박<sup>21)</sup> 등의 논문에서 각 한약의 항염증 효능이 실험연구로써 증명되었고, 약침 중 蜂毒藥鍼<sup>22)</sup>, 大防風湯藥鍼<sup>23)</sup>은 염증억제 작용이 실험적으로 보고되었다. 하지만, 加減通順散에 관한 연구는 보고되지 않았고, 원방인 通順散 관련 논문은 항암치료에 관한 논문 1편<sup>24)</sup>, 압박골절 치료에 관한 논문 1편<sup>25)</sup>뿐이었으며, 관절염 염증억제효능에 관한 실험연구는 통순산 원방과 加減通順散 모두 보고되지 않았다. 따라서 저자는 加減通順散의 염증억제 효과를 규명하고자 LPS로 유발한 RAW264.7 세포를 사용하여 본 연구를 진행하였으며, NO 생성 억제효과, iNOS·COX-2 발현 억제효과, PGE<sub>2</sub> 생성 억제효과를 평가하였다.

RAW264.7 세포는 대식세포주로서 IL-1 또는 INF- $\gamma$  등과 같은 cytokine의 자극만으로도 자력으로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있다. 그에 따라, 세포 독성유발물질의 독성 검정을 위해 실험연구에서 다용되고 있다<sup>26)</sup>.

염증유발물질로 사용한 LPS는 병원균 내독소로서 인지질, 다당류 및 소량의 단백질로 구성되며, RAW264.7 세포와 같은 대식세포에서 Tumor necrosis factor-alpha를 증가시키며 염증을 유발한다<sup>27)</sup>. 그에 따라 항염증 효능을 규명하는 연구에 있어, LPS가 염증 유발물질로 많이 활용되고 있다<sup>28)</sup>.

지표로 활용한 iNOS는 ROS의 일종인 NO를 생성하는데, NO는 세포 내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. NO의 비정상적 증가는 숙주세포를 파괴하며, 호산구 증가를 유도하고, iNOS의 발현 증가는 혈관투과성 증가를 유도하고, 산화 스트레스를 증가시켜 염증에 의한 조직손상을 가속화시킨다<sup>29)</sup>. 실험 결과, GT는 62.5  $\mu$ g/ml, 125  $\mu$ g/ml, 250  $\mu$ g/ml, 및 500  $\mu$

g/ml 투여군에서 LPS로 유도된 NO생성을 각각  $43.6 \pm 1.1 \mu$ M,  $40.4 \pm 1.8 \mu$ M,  $34.2 \pm 0.2 \mu$ M, 및  $23.5 \pm 0.3 \mu$ M로 농도 의존적으로 억제하였고, 모든 시험군에서 통계적으로 유의하게 NO 생성을 억제하였다. 또한, iNOS 유전자 발현에 있어, LPS군을 기준치로 하여 iNOS 유전자 발현량을 계산한 결과, 정상군에서  $0.01 \pm 0.01$ , GT 500 $\mu$ g/ml 처리군에서  $0.01 \pm 0.02$ , LPS처리군에서  $1.00 \pm 0.10$ , LPS와 GT 500 $\mu$ g/ml 동시처리군에서  $0.05 \pm 0.02$ 로 나타났다. GT 500 $\mu$ g/ml 단독처리군에서 iNOS 유전자 발현이 정상군에 비해 유의성 있게 증가되지 않았으며, LPS군에서만 유전자 발현이 유의하게 증가하였고, LPS에 GT 500 $\mu$ g/ml 처리를 한 군에서 iNOS 유전자 발현이 유의하게 감소하였다.

COX-2는 염증효소로서 COX-2 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다. 실험 결과, LPS처리군을 기준치로 하여 COX-2 유전자 발현량을 산출하였으며, Normal군에서  $0.00 \pm 0.01$ , GT 500 $\mu$ g/ml 처리군에서  $0.01 \pm 0.02$ , LPS군에서  $1.00 \pm 0.09$ , LPS와 GT 500 $\mu$ g/ml 동시처리군에서  $0.33 \pm 0.04$ 로 나타났다. GT 500 $\mu$ g/ml 단독처리군에서 COX-2 발현이 정상군에 비해 유의성있게 증가되지 않았으며, LPS군에서 COX-2 유전자 발현이 유의하게 증가하였고, LPS군에 GT 500 $\mu$ g/ml 동시처리를 한 군에서 COX-2 발현이 유의하게 감소되었다. 이를 통해, GT처치가 LPS유발한 대식세포 염증반응을 효과적으로 억제하는 효과를 증명할 수 있었다. 따라서 인<sup>30)</sup> 등의 연구와 유사하게 항염증 작용을 위해서 염증효소 COX-2 작용을 차단하여 염증으로 유발되는 관절막 내 조직손상을 차단하는 방법을 활용할 수 있다.

PGE<sub>2</sub>는 COX-2에 의해 형성되는 대표적 염증 화학 매개체로 염증이 주변조직을 파괴할 수 있다. 따라서, 항염 효과를 나타내는 하나의 준거자료로 판단된다<sup>31)</sup>. 실험 결과 PGE<sub>2</sub> 생성 억제에 있어, GT 500 $\mu$ g/ml 단독처리군, LPS군 및 LPS에 GT 500 $\mu$ g/ml 처리군의 PGE<sub>2</sub> 생성량은 각각  $409.6 \pm 25.4$  pg/ml,  $43.6 \pm 14.2$  pg/ml,  $1486.7 \pm 56.0$  pg/ml, 및  $145.9 \pm 18.1$  pg/ml이었다. GT 500  $\mu$ g/ml 단독처리군에서 normal 군에 비해 PGE<sub>2</sub> 생성이 감소하였으며, LPS처리로 인해 PGE<sub>2</sub> 생성이 유의하게 증가하였고, LPS로 인해 증가된 PGE<sub>2</sub> 생성은 GT처리에 의해 유의하게 억제되었다. 특히 GT는 LPS로 염증반응을 유발하지 않은 상황에서도 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제한 것으로 보아, 세포

내 발현되어 항상 존재하고 있는 COX-1의 기능도 억제한 것으로 생각된다. 또한 GT는 COX-2 유전자 생성을 완벽히 억제하지는 않았지만, PGE<sub>2</sub> 생성을 Normal군보다 더 많이 억제한 것으로 보아, GT는 COX-2 유전자 생성을 불완전하게 억제하고, 생성된 COX-2의 기능을 완벽하게 억제한 것으로 보인다. 추가실험이 필요하겠지만 GT는 non-selective COX inhibitor로 작용할 것으로 생각된다.

위와 같은 실험결과를 토대로 加減通順散을 임상적으로 응용함에 있어 염증억제기전을 통한 관절질환 치료에 적용할 근거자료를 마련하였다는 점에 본 실험연구의 의의가 있는 것으로 사려된다.

## 결론»»»»»

GT의 항산화 활성이 mouse macrophage에서의 항염증, iNOS, COX-2 발현 및 PGE<sub>2</sub>분비를 억제하는 연구를 수행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. GT는 500 µg/ml 이하의 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다.
2. GT는 농도의존적으로 대식세포 내 NO 생성을 통계적으로 유의하게 억제하였다.
3. GT는 대식세포 내 iNOS 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였다.
4. GT는 대식세포 내 COX-2 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였다.
5. GT는 대식세포 내 COX-2로 인한 PGE<sub>2</sub> 생성을 통계적으로 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로, 加減通順散 추출물은 대식세포 내 iNOS와 COX-2 발현을 억제하여 각각 NO 생성억제, PGE<sub>2</sub> 생성억제 기전을 통하여 항염증 반응을 나타내는 것으로 확인되었다.

## References»»»»»

1. Kim KW, Moon JG, Jang JS, Kim EH, Baek YS, Cho HJ. Hwangjenegyung: somun · Yungchu, Seoul:Bubin Publishing Inc, 2014:547.
2. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454(7203):428-35.

3. Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, Sims JE. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family 1. FEBS Lett. 1997;402(1):81-4.
4. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. Trends Mol Med. 2007;13(11):460-9.
5. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest. 2001;107(1):7-11.
6. Kang CH, Choi YH, Choi IW, Lee JD, Kim GY. Inhibition of Lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and TNF-α expression by aqueous extract of Orixia Japonica in RAW264.7 cells via suppression of NF-kB activity. Trop J Pharm Res. 2011;10(2):161-8.
7. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE<sub>2</sub> in inflammation and cancer. Semin Immunopathol. 2013;35(2):123-37.
8. Bae DS, Kim YH, Pan CH, Nho CW, Samdan J, Yansan J, Lee JK. Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. BMB Rep. 2012;45(2):108-13.
9. Cerella C, Sobolewski C, Dicato M, Diederich M. Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. Biochem Pharmacol. 2010;80(12):1801-15.
10. Kim YH. Cheonggangeuigam. Seoul:Seongbosa. 2001:314-7.
11. Hur J. Dongeuibogam. Seoul:Bubin Publishing Inc. 2005:2682-737.
12. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. Cancer Res. 1987;47(4):943-6.
13. Hwang DY. Bangyakhappyun. Seoul:Younglimsa. 2011:248.
14. Jung YS, Kang KH, Kim KC, Lee YT. Study on carbuncle of viscera and bowel in hyungsang medicine, Korean J. Oriental Medical Physiology & Pathology. 2001;15(5):637-44.
15. Department of Internal medicine of Korean medicine. Hanbang Soonhwan · singyungnegwakak. Seoul:Koonja chulpansa. 2013:416.
16. Bang JS. Anti-inflammatory effect of Injinsook (Artemisia capillaris Herba) herbal acupuncture in lipopolysaccharide-exposed rats [dissertation]. [Wonju]:Sangji University;2009:1-2.
17. An JH, Lee MJ. Effects of Daeganghwal-tang(Daquianguoshang) on the carrageenan-induced arthritis in animal model. J Oriental Rehab Med. 2006;16(2):79-96.
18. Jeong SH, Kim SJ, Seo IB. Anti-pathogenetic and curative effects of Taeganghwal-tang (Daquianguo-tang) on the collagen-induced arthritis in wistar rats. J Oriental Rehab Med. 2004;14(3):79-101.
19. Cho SM, Lee IS, Choi BT. Suppression of collagen-induced



- arthritis by continuous administration of Daebangpoong-tang (Dafangfeng-tang). *J Oriental Rehab Med*, 2000;10(2):111-20.
20. Choi ES, Jang HG, Kwon OG, Woo CH, An HD. Effects of Samki-eum on Freund's complete adjuvant-induced arthritic rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*, 2013;23(3):1-14.
  21. Park JS, Han MG, Lim YE, Lee SK, Shin BC, Kwon YD, Song YS. Effects of Cheongyeolsaseup-tang (Qingrexiishi-tang) in experimental model of rheumatoid arthritis. *J Oriental Rehab Med*, 2004;14(2):29-39.
  22. Gu JH, Kim ES, Park YC, Jung IC, Lee EJ. A systematic review of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*, 2017;27(3):47-60.
  23. Koo ST, Hwang JH, Sohn IC, Kim KS. Effect of Daebangpungtang herbal acupuncture on the carrageenan-induced arthritis in rats. *The Korean Journal of Meridian & Acupoint*, 2005;22(3):83-104.
  24. Keum JC. The effect of Gagamtongsun-san on the tumor and immune response in mouse B16 melanoma tumor model [dissertation]. [Seoul]:Kyunghee University; 2001:1-46.
  25. Han SW, Jung YH, Kim JW, Kim CY, Uhm BK, Lee CR, Lee JY. A case report of prescribing tong shun-san for three patients with compression fracture. *The Journal of Korea CHUNA Manual Medicine for Spine & Nerves*, 2011;6(2):145-54.
  26. Byun H, Park IS, Cho HS, Kim KS, Lee SD. The effectiveness of ulmus davidiana planch herbal acupuncture to inhibit mif activation on lipopolysaccharide-induced rheumatoid arthritis model. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*, 2006;23(6):125-6.
  27. Yoon JW. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Cheongjihwang-Tang extract on RAW264.7 cells [master's thesis]. [Jecheon]:Semyung University;2016:18.
  28. Mathiak G, Grass G, Herzmann T, Luebke T, Zetina CC, Boehm SA, Bohlen H, Neville LF, Hoelscher AH. Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. *Br J Pharmacol*, 2000;131(3):383-6.
  29. Lee HJ, Cho HS, Hwang MS, Jung CY, Lee DG, Kim EJ, Kim KS, Kim KH. Effect of Cervi Pantotrichum Cornu pharmacopuncture on suppressing the expression of iNOS and production of NO in type 2 collagen-induced arthritis mice. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*, 2008;25(5):105-16.
  30. Ahn SH, Kim HH. Lonicerae flos inhibited COX-2 and MMP-9 in LPS induced arthritis of mouse through regulation of MIF. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*, 2010;24(2):246.
  31. Yun SM, Jeong MJ, Kwon OG, Woo CH, An HD. Suppressing effects of Sowhalrack-dan on Freund's Complete Adjuvant Induced Arthritic Rats. *J Oriental Rehab Med*, 2011;21(1):110.