

단삼 물 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 생쥐 염증모델에서의 항염증 효과

원광대학교 한의과대학 한방부인과학교실
김건희, 홍가경, 조한백, 최창민, 김송백

ABSTRACT

Anti-inflammatory Effects of *Salvia Miltiorrhizae Radix* Water Extract in RAW 264.7 Cells and Mouse Induced by Lipopolysaccharide

Gun-Hee Kim, Ka-Kyung Hong, Han-Baek Cho,
Chang-Min Choi, Song-Baek Kim

Dept. of Korean Gynecology and Obstetrics, College of Korean Medicine,
Wonkwang University

Objectives: This study was performed to identify the anti-inflammatory effects of *Salvia miltiorrhizae radix* Water extract (SMW) on lipopolysaccharide (LPS) induced inflammation.

Methods: RAW 264.7 cells were treated with 500 ng/ml of LPS. SMW (0.1, 0.25, 0.5 mg/ml) was treated 1 h prior to LPS. Cell viability was measured by MTT assay. Levels of nitric oxide (NO) were measured with Griess reagent and pro-inflammatory cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time polymerase chain reaction (PCR). We also examined molecular mechanisms such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation by western blot. In addition, we observed mice survival rate after LPS and examined their cytokine levels of serum and liver tissue.

Results: SMW itself did not have cytotoxic effects in RAW 264.7 cells less than 0.5 mg/ml. SMW treatment inhibited the production of NO, and interleukin (IL)-1 β which is pro-inflammatory cytokine. And SMW treatment inhibited the LPS-induced activation of MAPKs such as extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), p38 kinases (p38), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and NF- κ B. In addition, it also showed reducing the level of IL-1 β on the serum and liver tissue of mice. Also, death of LPS-induced mice was inhibited by SMW.

Conclusions: The result suggests that treatment of SMW could reduce the LPS-induced inflammation. Thereby, SMW could be used as a protective agent against inflammation. Also, this study could give a clinical basis that SMW could be a drug or agent to prevent inflammatory diseases.

Key Words: *Salvia miltiorrhiza radix*, RAW 264.7 Cell, Lipopolysaccharide (LPS), Cytokine, Inflammation

I. 緒 論

염증은 물리적 외상, 유해화학물질, 미생물 또는 약품 등에 의해 야기되는 조직손상에 대한 정상적인 국소적 보호 반응의 하나로, 임상적으로는 동통, 발열, 발적, 종창, 기능상실 등의 증상이 나타난다¹⁾. 과도한 염증반응은 국소세포조직의 수동적 변화와 순환장애, 특히 혈관 내 혈장이나 혈구의 비정상적인 삼출과 해당 부위의 세포증식²⁾을 유발하며 인체의 기관 및 세포의 손상을 악화시키게 된다. 또한 산화적 스트레스가 발생되면 단백질 분해 및 DNA합성이 억제되어 각 기관의 세포에 손상이 유발 된다³⁾.

Cytokine이란 cell signaling에 있어서 중요한 단백질로써, interleukin(IL), chemokine, interferon, tumor necrosis factor(TNF) 등을 포함하는 개념이다⁴⁾. 이는 염증이 진행되는 동안 macrophage, lymphocyte 같은 염증세포의 과도한 면역반응으로 유도되는 물질로 급성염증 시 증가하고, 염증부위에 고농도로 존재하여 염증반응의 진행 및 조절에 중요한 작용을 한다⁴⁾.

염증성 질환의 치료는 근본적으로 염증억제, 즉 소염에서 시작하는데 최근 부작용이 없고 효능이 우수한 소염치료법의 개발을 위하여 많은 노력이 이루어지고 있다. 하지만 현재 사용되는 대부분의 소염제들은 장기복용을 할 경우 출혈성 위장관계양, 신기능 저하 및 혈압상승, 심근경색 및 혈전형성 등의 순환계 질환도 유발할 수 있다고 하여⁵⁾ 소염제의 효능과 안전성을 개선할 필요성이 대두되고 있다. 따라서 기존 소염제에 비해 부작용이 적고 안전성이 좋은 한약물 제제 중 단

미와 탕전형태를 통한 연구⁶⁻⁸⁾가 활발하게 보고되고 있다.

단삼(*Salvia miltiorrhizae radix*, SM)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본식물로 뿌리와 근경을 건조하여 쓰고, 苦微寒하며 活血祛瘀, 調經止痛, 除煩安神, 涼血消癰 등의 효능이 있다⁹⁾.

단삼에 대한 기존의 연구로는 염증세포에 대한 효과¹⁰⁻⁷⁾, 손상된 세포 및 근육에 대한 효과^{18,19)}, 혈관질환에 대한 효과^{20,21)}, 면역조절작용에 대한 효과²²⁾, 종양 세포에 미치는 효과²³⁾ 등이 보고되어 있다. 이러한 연구들을 미루어 볼 때 단삼이 항염증 효과가 있다고 사료되지만, 기존의 염증에 관한 대부분의 연구¹³⁻⁷⁾들이 단삼 메탄올 추출물을 이용하여 이루어져 왔으며, 때문에 그 연구결과를 물 추출의 탕전 방법을 사용하는 한의학 임상에서 적용시키기에는 무리가 있었다. 또한 동물실험까지 진행한 연구²⁴⁾ 또한 지용성 물질인 tanshinone I을 다루고 있을 뿐이었다. 이에 저자는 임상에서 한의약 투여 상황에 부합되도록 단삼 물 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포 및 mouse에서의 항염증반응과 더불어 mouse 간 조직에서 나타난 염증과 출혈양상 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재 료

1) 약 재

단삼(*Salvia miltiorrhizae radix*)은 (주) 음니허브(대구, 대한민국) 에서 1 kg을 구입하여 정선한 후 사용하였다.

2) 시 약

Fetal bovine serum(FBS), RPMI Medium 1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 시약 중 Chloroform, TRIzol, Sodium dodesyl sulfate(SDS), Acrylamide, Tris-HCL, lipopolysaccharide(LPS) 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK는 Cell Signaling(MA, USA)사에서 구입하였고, Anti-I κ -Ba, Anti- β -actin, Anti-ERK, Anti-JNK, Anti-p38는 Santa Cruz(CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 세포주

Mouse의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, 서울, 대한민국)으로부터 분양받았다. 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillinstreptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

4) 실험동물

이 실험에 사용한 C57BL/6 mouse(weight 15~20 g, aged 6 weeks, female)는 오리엔트 바이오(성남, 경기도, 대한민국)에서 구입하여 일주일의 적응 기간 후 실험을 진행하였다. 모든 실험은 ○○대학교에서 정해놓은 동물관리 규정에 따라 수행되었다.

2. 연구 방법

1) 약물 추출

단삼은 ○○대학교 한의과대학에서 동정 및 확인되었다. 단삼 물추출물(*Salvia*

miltiorrhizae radix Water extract, SMW)을 얻기 위하여 물 1 ℓ에 단삼 100 g을 약탕기(대웅, 한국)에 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 액을 여과한 후, -80°C에서 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여 여과 후 사용하였다. 동결 건조시킨 후 나온 분말 가루는 13.6 g으로 수율은 13.6%였다.

2) MTT assay

RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 용액을 이용하여 측정했다. RPMI-1640 배지에서 2×10^5 /ml의 밀도로 현탁 하였고, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml의 농도로 SMW를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)로 formazan을 용해하여 96-well plate에 loading한 후, spectrophotometer(MD, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 하지 않은 군과의 비율로 나타냈다.

3) Nitric Oxide 농도의 측정

Nitric Oxide(NO)의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였는데, 그리스 시약(Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethylendiamide)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이는 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁 하였고, 0.1 mg/ml,

0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml의 농도로 SMW를 처리하였다.

RAW 264.7 세포 실험에 사용한 LPS는 기존의 연구^{25,26)}에 기초하여 모두 500 ng/ml 농도로 설정하였다. LPS를 자극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 µl의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 spectrophotometer(MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다.

4) Cytokine(IL-1β, IL-6, TNF-α) 측정
SMW가 LPS(500 ng/ml)로 유도된 RAW 264.7세포에서의 염증매개물질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, LPS를 자극하기 전 SMW를 1시간 동안 전 처리한 후, RAW264.7 세포에 LPS를 24시간 동안 자극하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질은 세포 상층액에서 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 정량하였다. ELISA는 BD pharmingen (CA, USA)에서 Mouse ELISA kit for IL-1β, IL-6, TNF-α를 구입하여 시행하였다.

5) RNA 분리 및 Quantitative RT-PCR
Total RNA는 Easy Blue(Intron Biotechnology, USA)시약을 통해 추출하였다. 먼저 배양

한 세포에 SMW를 1시간 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 Phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척하였다. 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 바닥에 남은 세포에 Easy Blue 용액을 1 ml 넣어 세포를 용해시킨 후 100 µl의 chloroform 용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 µl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

mRNA는 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 µl, Real time PCR aster mix 4 µl(Roche), primer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응시켰다. PCR 조건은 92℃에서 30초, 60℃에서 45초, 72℃에서 30초를 40 cycle로 하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 forward(f)와 reverse(r) primer 및 TaqMan probe는 Roche (Basel, Switzerland)에서 합성하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

Table 1. The Primer of IL-1β, IL-6 and TNF-α

Gene	Primer
IL-1β	5´-TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3´ (forward)
	5´-GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3´ (reverse)
	universal probe, M15131.1V (probe)
IL-6	5´-TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3´ (forward)
	5´-GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3´ (reverse)
	universal probe, M20572.1V (probe)
TNF-α	5´-TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3´ (forward)
	5´-ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3´ (reverse)
	5´-CCC GAC TAC GTG CTC CTC ACC CA-3´ (probe)

6) Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 SMW(0.5 mg/ml)를 전처리 하고 LPS(500 ng/ml)로 자극하여 0, 15, 30, 60 분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 cell을 획득하여 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer(RIPA buffer 1 ml+phosphatase inhibitor 10 μ l+protase inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 10% SDS-PAGE에 electrophoresis 한 후 membrane에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 NF- κ B를 ECL detection 용액(Amersham)으로 확인하였다.

7) mouse 모델 실험군 설정

실험실 환경에 적응시킨 생쥐들은 아무 처리도 하지 않은 정상군, LPS로 급성 염증을 유발한 대조군과 SMW 투여 농도에 따라 SMW 0.1 mg/kg 투여군(SMW 0.1), 0.5 mg/kg 투여군(SMW 0.5) 두 종류의 실험군으로 설정하여 대조군과 실험군을 실험 횟수별로 6마리, 6마리, 8마리로 나누어 총 3회, 군별 20마리씩 진행하였다. 연구에서 적용한 SMW 농도는 기존에 진행된 in-vivo 연구가 없기에 임의로 설정하였다.

In-vivo 실험에서의 LPS 처리는 37.5 mg/kg 수준으로 모두 동일하게 복강 주사하였는데, 이는 기존의 연구^{27,28)}에서 적용한 농도를 참고하여 설정하였다. LPS 주사 1시간 전에 SMW를 두 실험군에 각

각 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 복강주사 하였고, 주사 후 12시간 마다 mouse의 생존율을 조사하였다.

8) mouse 혈청 및 간의 cytokine 정량

LPS 처리는 37.5 mg/kg의 수준으로 모두 동일하게 복강 주사하였고, LPS주사 한 시간 전에 SMW를 두 실험군에 각각 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 복강주사 하였다. 3시간 후에 mouse를 마취시켰고, Syringe를 이용하여 심장에서 혈액을 채취했으며 혈액은 3,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 혈청만 분리하였다. Mouse 혈청에서는 ELISA 방법으로, 간 조직에서는 정량 중합 효소 반응을 통해 cytokine을 측정하였다.

9) mouse 간 조직의 조직학적 관찰 및 분석

마지막 LPS 주입 후 3시간 뒤에 간 조직을 분리하여, 10% formalin 용액을 사용하여 고정시킨 다음, 일반적인 조직 표본 제작 방법으로 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색을 시행하였다. 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다. 조직 손상 정도는 면적을 통해 판단하였으며, 기존의 연구²⁹⁾에서 사용한 조직학적 진단 기준을 참고하여 0=normal, absent; 1=uncommon, detectable; 2=multifocal, moderate; 3=extensive, severe으로 설정한 후 세 임상병리사의 blind test를 통해 평가하였다.

3. 통계 방법

모든 실험 결과는 3회 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D.로 나타내었다. 실험 데이터는 student's t-test로 분석하였고, p-value<0.05 일 경우 유의한 것으로 판단하였다. 이상의 통계처리는 SPSS for windows 12.0을 사용하였다.

Ⅲ. 研究結果

1. SMW의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

무처치군의 생존율을 100으로 설정하였을 때, SMW은 각각 농도 0.1 mg/ml 처리군에서 99±0.82%, 0.25 mg/ml 처리군에서 99.67±0.94%, 0.5 mg/ml 처리군에서 97.67±1.25%의 생존율을 보였으나 1 mg/ml 처리군에서는 92±0.82%로 무처치군과 유의한 차이를 보였다($P<0.05$)(Fig. 1).

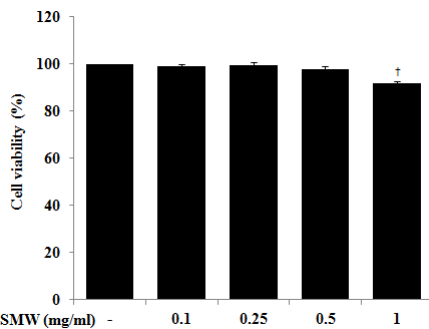


Fig. 1. The cytotoxicity of SMW in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with SMW as indicated concentration. After 24h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data were given as means of values±SD from three independent experiments.

* $P<0.05$ as compared with none group.

2. SMW이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성에 미치는 영향

NO는 LPS 처리군에서 13.40±0.588 μ M로 상승하였으나, SMW 0.1 mg/ml 처리군에서 11.53±0.4784 μ M, SMW 0.25 mg/ml 처리군에서 8.70±0.374 μ M, SMW 0.5 mg/ml 처리군에서 5.97±0.403 μ M로 감소하였고, SMW 1 mg/ml 처리군에서는 8.80±0.082 μ M로 감소하였으나, 자체적인 NO 증가 및 0.5 mg/ml군 대비 억제능력 감소를 보였다

($P<0.05$)(Fig. 2). 세포독성 검사에서 SMW 1 mg/ml 농도는 미세 독성을 보였으나 그 정도가 미흡하고, 유효농도 기준을 명확히 설정하기 위해 이 실험에 포함하였다. SMW 1 mg/ml의 농도는 세포 생존에는 무리를 주지 않았지만, 자체적인 NO 생성을 유도하여 세포에 유해할 수 있고 세포독성 실험에서도 유의한 차이를 보였으므로, 추후 실험에서는 SMW 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도만 사용하였다.

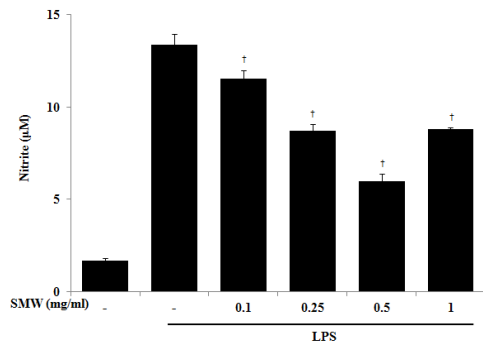


Fig. 2. Effects of SMW on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cell was treated with 0.1, 0.25, 0.5 and 1 (mg/ml) of SMW and LPS (500 ng/ml) for 24 h. The amount of NO in supernatant was measured by using Griess reagent. Data were given as means of values±SD from three independent experiments.

* $P<0.05$ as compared with only-LPS-treated group.

3. SMW이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성에 미치는 영향

LPS로 유도된 cytokine 발현을 측정할 결과, SMW은 IL-6, TNF- α 에서는 유의한 효과를 보이지 않았으나, IL-1 β 에서는 LPS 처리군의 237.00±2.944 pg/ml에 비해 SMW 0.1 mg/ml 처리군에서 224.67±5.313 pg/ml, SMW 0.25 mg/ml 처리군에서 179.67±1.700 pg/ml, 0.5 mg/ml 처리군에서 142.67±5.793

pg/ml으로 각각 감소되는 것이 관찰되었고, 특히 SMW 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 농

도에서 유의한 억제 효과를 보였다($P<0.05$) (Fig. 3).

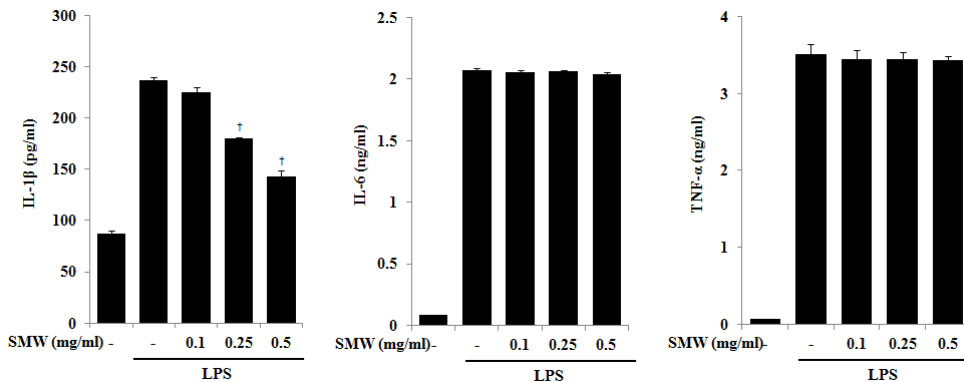


Fig. 3. Effects of SMW on the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with SMW as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

* $P<0.05$ as compared with only-LPS-treated group.

4. SMW이 mRNA 수준에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성에 미치는 영향

mRNA 수준에서 cytokine 발현을 측정 한 결과, SMW은 IL-6, TNF- α 에서는 유의한 효과를 보이지 않았으나, IL-1 β 에서는 무처리군을 1로 설정하였을 때, LPS 처

리군 154.33 \pm 5.793배 증가한 것과 비교하여 SMW 0.1 mg/ml 처리군에서 151.67 \pm 8.654 배, SMW 0.25 mg/ml 처리군에서 115.33 \pm 8.730배, 0.5 mg/ml 처리군에서 59.33 \pm 4.497 배로 각각 감소되는 것이 관찰되었고, 특히 SMW 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도에서 유의한 억제 효과를 보였다($P<0.05$) (Fig. 4).

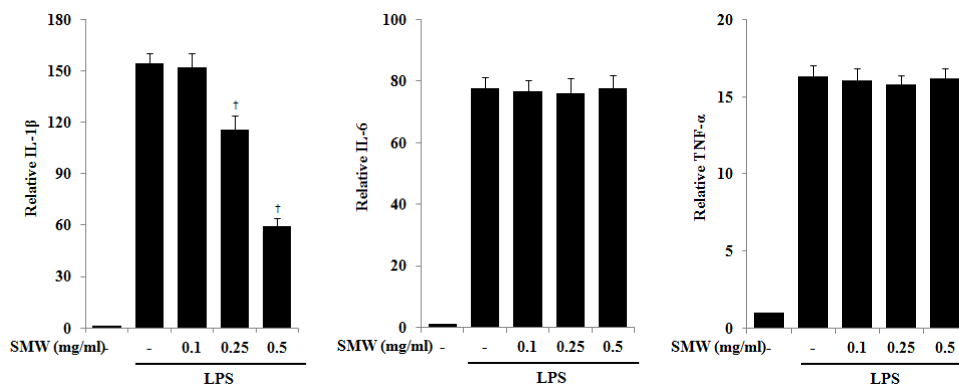


Fig. 4. Effects of SMW on the mRNA expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in RAW 264.7 cells.

The cells were pre-treated with SMW as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. IL-1 β , IL-6, and TNF- α mRNA levels were measured by real time RT-PCR. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

* $P<0.05$ as compared with only-LPS-treated group.

5. SMW이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs 및 NF-κB의 활성화에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포는 다양한 신호전달물질에 의해 cytokine들을 분비하게 되는데, 대표적인 경로로 MAPKs와 NF-κB가 있다. SMW를 0.5 mg/ml의 농도로 전 처리한 후 LPS를 15분, 30분, 60분으로 나누어 시간대별로 자극하였다. 이를 분석한 결과 SMW은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 p38, JNK, ERK1/2 모두 인산화를 억제하는 결과를 보였다. 반면에 NF-κB의 활성화 지표인 Iκ-Bα의 분해 결과, SMW이 LPS에 의한 Iκ-Bα의 분해는 억제하지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

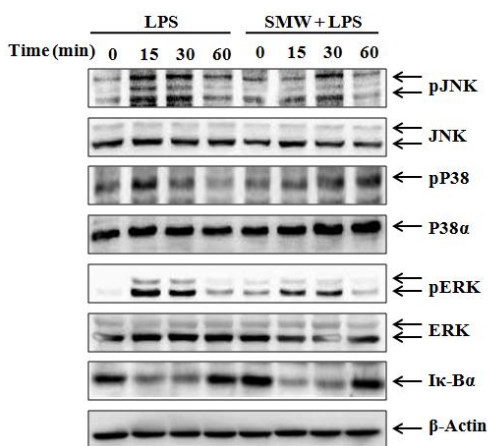


Fig. 5. Effects of SMW on MAPKs activation and Iκ-Bα degradation in RAW 264.7 cells. The cell were pre-treated with SMW (0.5 mg/ml) for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods. Representative western blots of at least three separate experiments are shown.

6. SMW이 LPS로 유도된 mouse 모델의 생존율에 미치는 영향

LPS를 복강주사 한 후 12 h 마다 생존율을 관찰한 결과, LPS 처리군은 60 h에 생존율 0%를 보였으며, SMW 0.1 mg/kg 투여군(SMW 0.1)에서는 120 h 시점에 20%의 생존율을 보였고, SMW 0.5 mg/kg 투여군(SMW 0.5)에서는 120 h 시점에 50%의 생존율을 보였다(Fig. 6).

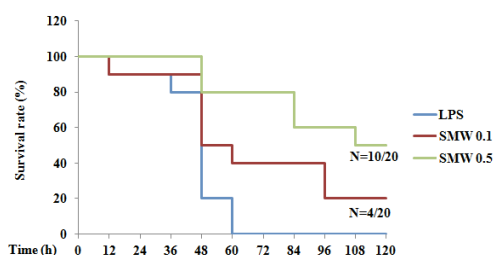


Fig. 6. Effects of SMW on the survival rate of mice.

The mice were pre-intraperitoneal injected with SMW for 1 h, and then intraperitoneal injected with LPS (37.5 mg/kg). After 60 h, survival rate of only-LPS-treated group was 0%. But after 120 h, the survival rate of SMW 0.1 was 20%, and SMW 0.5 was 50%. The number of mice of each group was 20.

7. SMW이 LPS로 유도된 mouse 혈청 cytokine 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 cytokine 생성 결과와 동일하게 IL-6, TNF-α에서는 유의한 효과를 보이지 않았으나, IL-1β에서는 LPS 처리군의 523.67±11.585 pg/ml에 비해 SMW 0.1 mg/kg 투여군에서 440±26.733 pg/ml, 0.5 mg/kg 투여군에서 358.00±27.797 pg/ml로 각각 유의하게 감소되는 것이 관찰되었고, 특히 SMW 0.1 mg/kg 투여군에 비해 0.5 mg/kg 농도 투여가 효과적이었다($P<0.05$) (Fig. 7).

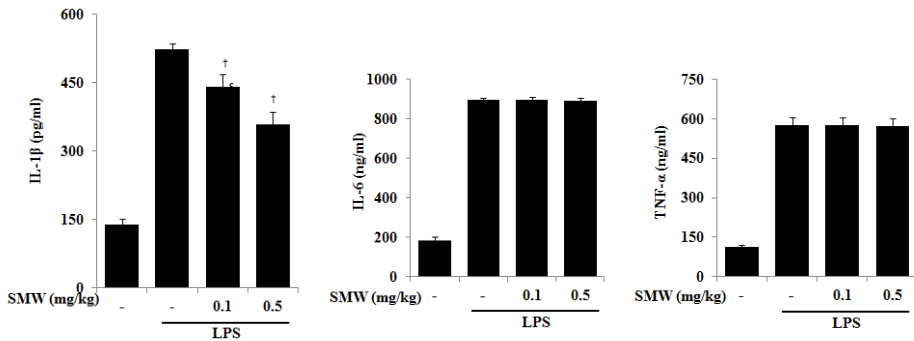


Fig. 7. Effects of SMW on the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum of mice. The serum of mice was pre-treated with SMW 0.1, 0.5 (mg/kg) for 1 h, and then incubated with LPS (37.5 mg/kg) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments. † $P < 0.05$ as compared with only-LPS-treated group.

8. SMW이 LPS로 유도된 mouse 간 조직 손상에 미치는 영향

간 조직의 염증 정도는 정상군 0.4 ± 0.082 에 비해 LPS 처리군은 2.8 ± 0.82 로 유의하게 증가하였고 ($P < 0.05$), SMW 0.1 mg/kg 투여군에서 1.73 ± 0.125 로, SMW 0.5 mg/kg 투여군에서 1.13 ± 0.047 로 모두 LPS군에 비해 유의하게 염증 정도를 억제시켰다 ($P < 0.05$) (Fig. 8).

간 조직의 출혈 정도는 정상군 0.4 ± 0.082 에 비해 LPS 처리군은 2.6 ± 0.082 로 유의하게 증가하였고 ($P < 0.05$), SMW 0.1 mg/kg 투여군에서 1.1 ± 0.082 로, SMW 0.5 mg/kg 투여군에서 0.6 ± 0.082 로 유의하게 출혈 정도를 억제시켰는데, 특히 SMW 0.5 mg/kg 투여군의 출혈 정도는 정상군의 간조직과 유의한 차이가 없었다 ($P < 0.05$) (Fig. 8).

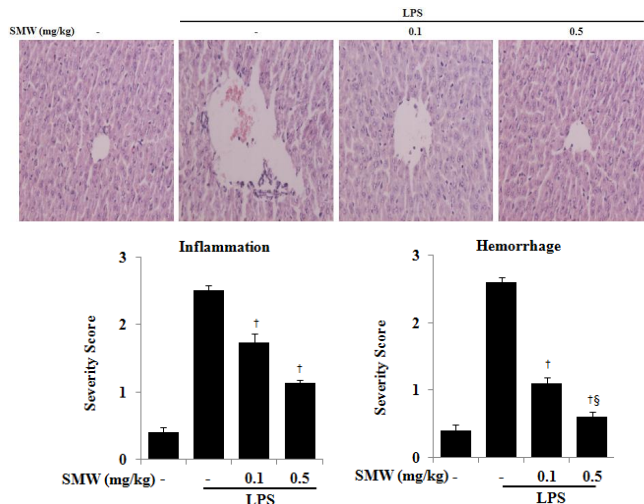


Fig. 8. Effects of SMW on the liver tissue of mice. Representative H & E stained sections of the liver tissue in the normal mice not given LPS, in the control mice given LPS, and in mice given SMW 1 h before the first LPS injections. Histological sections of the pancreas were scored from 0 (normal) to 3 (severe) for inflammation and hemorrhage. These figures show representative images of experiment group. The score was calculated by three pathologists who were blinded. † $P < 0.05$ as compared with only-LPS-treated group. § $P < 0.05$ as compared with none-treated group.

9. SMW이 LPS로 유도된 mouse 간 cytokine 생성에 미치는 영향

Mouse의 혈청 cytokine 생성 결과와 동일하게 IL-6, TNF- α 에서는 유의한 효과를 보이지 않았으나(Fig. 8), IL-1 β 에서는 아무 처리를 하지 않은 군을 1로 설정했을 때, LPS 처리군의 9.13 \pm 0.125배 증가한 것에

비해 상대적으로 SMW 0.1 mg/kg 투여군에서 7.33 \pm 0.263배, SMW 0.5 mg/kg 투여군에서 5.47 \pm 0.287배로 각각 유의하게 감소되는 것이 관찰되었고, 특히 SMW 0.1 mg/kg 농도에 비해 0.5 mg/kg 농도 투여가 효과적이었다 ($P < 0.05$) (Fig. 9).

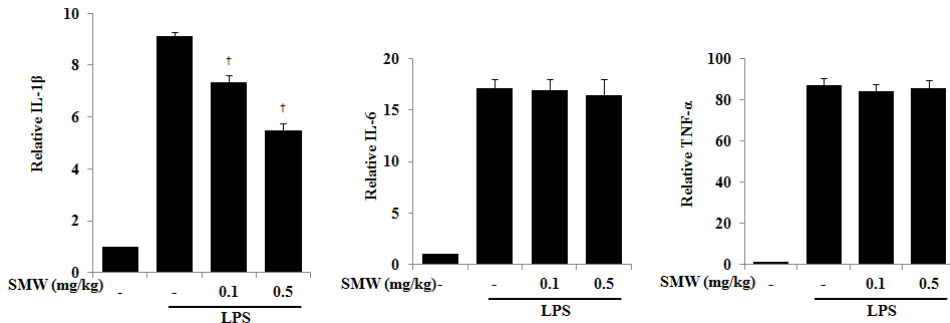


Fig. 9. effects of SMW on the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in liver tissue of mice.

The cells were pre-treated with SMW as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (37.5 mg/kg) for 3 h. IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels were measured by real time RT-PCR. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$ as compared with only-LPS-treated group.

IV. 考 察

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응으로, 그람 음성균의 세포외막 성분인 Lipopolisaccharide (LPS)나 바이러스, 미생물 등의 자극에 의해 대식세포가 활성화되면 염증반응과 관련된 많은 염증인자들의 생성이 촉진되어 외부 병원균으로부터 숙주를 방어하는 현상인 발적, 종창, 발열, 동통 등의 증상이 나타나게 된다. 그러나 이러한 외부 인자에 의해 활성화된 대식세포에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine 과 nitric oxide(NO) 및 prostaglandin E₂

(PGE₂)가 과량 생산되면 염증반응이 지속적으로 유발되어 조직학적으로 소동맥, 모세혈관 및 소정맥의 투과성과 혈류증가를 동반한 확장, 혈장단백을 포함한 혈장의 삼출, 백혈구의 염증부위로의 이동 등의 증상들이 나타나게 된다^{1,2)}.

단삼(*Salvia miltiorrhizae radix*)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본식물로 뿌리와 근경을 건조하여 쓰고, 성미는 苦微寒하며 活血祛瘀, 調經止痛, 養血安神, 涼血消癰의 효능이 있다¹⁰⁾. 또한 月經不調, 痛經, 經閉, 產後瘀滯腹痛, 癥瘕積聚, 心腹疼痛, 跌打損傷, 煩燥不安, 心煩失眠 등을 치료한다³⁰⁾. 이로 인해 여성 질환을 비롯한 다

양한 질병에 사용되어 왔고, 특히 《本草綱目》³¹⁾에서 처음 언급된 《婦人明理論》³²⁾에서는 ‘四物湯治婦人病，不問產前產後，經水多少，皆可通用。惟一味丹參散，主治與之相同.’라고 서술하여 단삼 단미만으로 그 효과가 사물탕에 못지않아 제반 여성 질환에 두루 쓰인다고 하였다.

이러한 단삼의 주요 성분은 크게 두 종류로 분류할 수 있다. 첫 번째로 수용성인 phenolic 화합물로서 salvianolic acid, lithospermate B, benzoic acid, β -sitosterol, ursolic acid 등이 있고, 두 번째로 abietane 형의 diterpene quinone으로서 tanshinone I, hydrotanshinone I, methylenetanshinone, danshenxin-kun A-D 등이 있다^{33,34)}. 현재까지 보고된 단삼의 실험적 연구로는 손상된 세포 및 근육에 대한 효과^{18,19)}, 혈관질환에 대한 효과^{20,21)}, 면역조절작용에 대한 효과²²⁾, 종양 세포에 미치는 효과²³⁾ 등이 있다. 특히 메탄올 추출 등을 통해 단삼 단미 또는 단삼의 단일 성분의 항염증효과¹⁰⁻⁷⁾를 주제로 다룬 연구가 다수 발표되어, 단삼이 염증반응에 좋은 효과를 미친다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이와 같은 연구¹³⁻⁷⁾ 대부분이 메탄올 추출물을 통해 in-vitro에 한정하여 이루어졌고, 같은 주제로 in-vivo까지 진행한 연구²⁴⁾도 지용성 물질인 tanshinone I을 다루고 있었다. 또한 in-vitro에서 진행된 단삼의 수용성 추출물 연구¹⁰⁻²⁾에서도 항염증작용을 파악하기에는 그 내용이 다소 제한적이었고, 이를 그대로 in-vivo에서 적용하기에는 무리가 있을 것으로 사료되었다. 이에 저자는 물 추출의 탕전 방법을 사용하는 한의학 임상에서 적용 가능한 단삼 물 추출물(SMW)을 사용하여 in-vivo와 in-vitro 양측 모두 항염증작용 관련

실험을 진행하여 유의한 결과를 얻었기에 다음과 같이 보고하는 바이다.

연구에 앞서 SMW의 자체 독성 평가를 하였고, 무처치군의 생존율을 100으로 설정하였을 때, SMW는 각각 농도 0.1 mg/ml 처리군에서 99±0.82%, 0.25 mg/ml 처리군에서 99.67±0.94%, 0.5 mg/ml 처리군에서 97.67±1.25%의 생존율을 보였으나 1 mg/ml 처리군에서는 92±0.82%로 무처치군과 유의한 차이를 보였다.

NO는 macrophage가 활성화되면 inducible NO synthase(iNOS)로부터 생산되며 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 화학적 매개체의 역할을 하지만 과도한 NO 생성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상을 일으키는 것으로 알려져 있다^{35,36)}. 따라서 SMW를 통해 NO 생성 억제를 관찰하였고, 전 SMW 처리군에서 NO 생성 억제가 관찰되었으나 SMW 1 mg/ml의 농도에서는 자체적인 NO 증가 및 0.5 mg/ml 농도대비 억제능력 감소를 보였다. 이에 먼저 실험한 독성평가와 결부해 1 mg/ml의 농도는 세포 독성 유발뿐 아니라, 자체적인 NO 생성을 유도하여 세포에 유해할 수 있다고 판단하여 추후 실험에서 배제하고 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 처리군 만을 유효농도로 설정하였다.

LPS는 그람 음성균의 외막 성분으로 macrophage의 감염초기에 반응하여 숙주 방어에 주요 역할을 하지만, 반대로 과도한 자극 시 활성화된 macrophage에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하며, NO, PGE₂ 등의 염증매개물질을 분비 시키거나 촉진시키기 때문에 각종 염증반응을 연구하는 실험 모델로 많이 응용되고 있기에^{2,37)} 이 연구

에서도 활용하였다.

이 연구에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 cells의 cytokine 발현을 측정된 결과, SMW는 IL-6, TNF- α 에서는 유의한 효과를 보이지 않았으나, IL-1 β 는 유의하게 감소되는 것으로 관찰되었고, 특히 SMW 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도에서 효과적으로 IL-1 β 발현을 감소시켰다($P < 0.05$). 이처럼 SMW이 전 염증성 cytokine들을 단백질 수준에서 억제하였음을 착안하여 mRNA 수준에서도 전 염증성 cytokine의 활성을 억제 할 수 있는지 추가 실험을 진행한 결과, IL-1 β 의 활성이 유의하게 억제되는 것을 관찰하였고 이는 SMW이 IL-1 β 생성 억제를 통해 염증을 조절할 수 있음을 시사한다.

MAPKs는 세포의 자극을 세포막에서 세포내 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달경로로 성장호르몬, cytokine, stress 등의 수용체로부터 활성화된 신호를 세포내로 전달하여 세포증식, 분화, 사멸 등 다양한 기능을 담당한다. 크게 ERK(the Extracellular signal-activated kinase), JNK(the c-JUNN-terminal kinase), p38 MAPK로 분류할 수 있다. ERK는 성장호르몬의 신호전달에 관여하며 세포의 증식과 분화에 중추적인 역할을 담당하고, JNK와 p38는 세포 외부의 스트레스성 자극에 의해 활성화되며 염증반응, 세포사멸 등을 매개한다³⁸⁾. 그리고 NF- κ B는 활성화 되면 결합해 있던 inhibitory kappa Ba(I κ -Ba)가 분해되면서 세포질에서 핵 내로 이동하여 cytokine 발현을 촉진시키는 전사인자로 작용한다. Cytokine의 분비는 이러한 MAPKs와 NF- κ B에 의해 조절되어 인산화의 활성화가 발생하게 된다^{39,40)}.

이 연구에서는 SMW를 0.5 mg/ml의 농

도로 전 처리한 후 LPS를 시간대별로 자극하였고, 이를 분석한 결과 SMW는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 p38, JNK, ERK1/2 모두 인산화를 억제하는 결과를 보였다. 반면 NF- κ B의 활성화 지표인 I κ -Ba의 분해 결과 SMW이 LPS에 의한 I κ -Ba의 분해는 억제하지 않는 것으로 나타났다. 이를 통해 SMW는 염증반응에서 I κ -Ba의 분해는 억제하지 못하지만, p38, JNK, ERK1/2의 인산화를 억제하고, 특히적으로 IL-1 β 억제에 더욱 민감하게 작용하여 항염증 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.

In-vitro 실험 결과에서 SMW이 IL-1 β 에만 유의한 감소효과를 보였지만, IL-1 β 단일 지표도 염증의 주요 인자라는 연구⁴¹⁾를 바탕으로 추가적인 in-vivo 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 관찰할 수 있었다.

In-vivo에서 일반적으로 경구투여는 대순환을 하기까지 약물의 대사로 인한 생체이용률이 낮고 작용시간이 연장되며 고용량이 필요한 점 등 불리한 면이 많으나 복강 내 주사는 흡수 면적이 넓어 그 작용이 빠르고 경구투여에 비해 약리작용의 정확성이 있다는 연구⁴²⁾를 기반으로 이 실험에서는 SMW를 mouse에서 복강주사로 진행하였다. 그 결과 mouse의 생존율에 눈에 띄는 효과를 보였는데, LPS를 복강주사 한 후 12 h 마다 생존율을 관찰한 결과, LPS 처리군은 60 h에 생존율 0%를 보였으며, SMW 0.1 mg/kg 투여군에서는 120 h 시점에 20%의 생존율을 보였고, SMW 0.5 mg/kg 투여군에서는 120 h 시점에 50%의 생존율을 보였다.

일반적으로 전신적인 염증반응에서 발생하는 장기손상은 간 손상이 대표적이며, 그람 음성균 세포벽을 구성하는 LPS

는 특히 간염과 유사한 간 손상을 일으키기 때문에⁴³⁾, 쥐의 혈청 외에 간 조직에서의 cytokine 농도를 함께 측정하기로 하였다. 그 결과 RAW 264.7를 통한 in-vitro 결과와 동일하게 SMW는 mouse의 혈청과 간 조직에서 IL-6, TNF- α 모두 유의한 효과를 보이지 않았으나, IL-1 β 를 유의하게 억제하는 것으로 관찰되었고($P<0.05$), 특히 SMW 0.1 mg/kg에 비해 0.5 mg/kg 농도 투여에서 효과적이었다.

마지막으로 간세포를 조직학적으로 관찰하였는데, 조직의 염증 및 출혈 정도는 해당 부위 면적을 0=normal, absent; 1=uncommon, detectable; 2=multifocal, moderate; 3=extensive, severe으로 기준을 설정한 후 세 임상병리사의 blind test를 통해 평가하였다. SMW을 투여한 군 모두 LPS 처리군에 비해 염증조직의 크기 및 출혈 정도가 유의하게 억제되었고($P<0.05$), 특히 출혈 부분에서 SMW 0.5 mg/kg 투여군은 정상군과 유의한 차이가 없다고 평가될 만큼 SMW의 효과는 뛰어났다. 이 결과를 통해 SMW는 전신 염증반응 모델에서 장기손상을 억제하여 질병의 이환 기간이나 전변 또는 후유증 정도 부분에서도 긍정적인 영향을 미칠 것이라 사료된다.

이 실험 결과 단삼 단미 만으로도 충분한 항염증 효과를 나타내는 것을 관찰하였고, 특히 물 추출물로 in-vivo에서 우수한 효과를 나타낸 만큼 당제는 물론 약침제제로의 투여 등 실제 임상에서 활용 폭이 넓을 것이라고 사료된다. 단삼에서 Phenolic acid 계열의 Salvianolic acid B가 가장 주요한 수용성 복합체라는 연구⁴⁴⁾와 단삼의 Water-decoction 시 새로운 복합체가 추출되며, 기존의 성분 구성에 변화가

생긴다는 기존의 연구⁴⁵⁾를 참고할 때, 이 연구에서 관찰한 항염증효과는 Salvianolic acid B 기원일 가능성이 있다고 사료된다. 그러나 현재까지 Salvianolic acid B와 관련된 연구로는 항혈전 효과⁴⁶⁾와, angiogenic process 항진⁴⁷⁾ 정도만 보고된 만큼, SMW 성분 중 이 연구 결과와 관련된 주요 항염증 인자에 대해서는 향후 추가적인 실험이 필요할 것이다. 또한 실험에서와 같이 주사투여가 흡수율이 높은 치료법 중 하나인 만큼 골반염, 자궁내막염, 자궁내막증과 같은 염증과정이 질병의 경과에 중요한 영향을 미치는 부인과적 질환에 약침제제로도 응용할 수 있을 것이라고 사료된다.

V. 結 論

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 mouse 염증모델에서 단삼 물 추출물(SMW)의 항염증효과를 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RAW 264.7 세포에서 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml 농도 모두 세포독성을 나타내지 않았으나, 1 mg/ml에서는 무처리군과 유의한 차이를 보였다.
2. RAW 264.7 세포에서 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도 모두 NO생성을 유의하게 억제하였으나($P<0.05$), 1 mg/ml에서는 자체적인 NO 증가 및 0.5 mg/ml군 대비 억제 능력 감소를 보였다.
3. RAW 264.7 세포에서 IL-1 β 의 생성을 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도에서 유의하게 억제시켰으나($P<0.05$), IL-6, TNF- α 에서는 유의한 결과를 얻지 못하였다.

- mRNA 수준 연구 또한 동일한 결과를 보였다.
- RAW 264.7 세포에서 p38, JNK, ERK1/2 모두 인산화를 억제하였으나, I κ -Ba의 분해는 억제하지 않았다.
 - Mouse 모델에서 120 h 시점에 0.1 mg/kg 투여군 20%, 0.5 mg/kg 투여군 50%의 생존율을 보였다.
 - Mouse 혈청과 간 조직의 cytokine에서, IL-1 β 를 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 농도에서 유의하게 억제시켰으나($P<0.05$) IL-6, TNF- α 에서는 유의한 결과를 얻지 못하였다.
 - Mouse 간 조직에서 SMW 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg 농도 모두 염증과 출혈 정도를 유의하게 억제하였고($P<0.05$), 특히 0.5 mg/kg 농도에서 간조직의 출혈 정도는 정상군과 유의한 차이가 없었다.

- Received : Apr 11, 2019
- Revised : Apr 22, 2019
- Accepted : May 30, 2019

References

- Tizard IR. Immunology, An introduction inflammation. New York:Saunders College Publishing. 1996:423-41.
- Male D, Brostoff J, Gray A. Immunology. London: Mosby. 1998:61-9, 229-32.
- Imalay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science. 1988; 240(4857):1302-9.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Science Health Science div. 2007:267-301.
- Boumpas DT, et al. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: Basic and clinical correlates. Ann Intern Med. 1993;119(12):1198-208.
- Choe HS. Anti-inflammatory effects of herbal medicines EtOH extracts in RAW264.7 cell lines. Department of Oriental Medicine, Graduate School, Gyeong Hui University. 2011.
- Jin GS, et al. Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of Seven Medicinal Herbs including Tetrapanax papyriferus and Piper longum Linne. 2013;14(2):253-62.
- Bak JH, Bak JY, Bak SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of 7 Herbal Extracts and Methods of Herbal Formula Compositioning. The journal of Korean Medicine Society for the Herbal formula study. 2014;22(2):87-103.
- The compilation committee of Herbal medicine of National University of Oriental Medicine. Bonchohak. Seoul: Yeongrimsa. 2011:458-59.
- Gim HE, Min SY, Gim JH. In Vitro Study of Anti-inflammatory and Analgesic Effects of *Salvia Miltiorrhiza* (SM) Extracts Using Luciferase Reporter Gene Assay. The Journal of Korean Medicine. 2008;29(3):88-99.
- Yeo IH. Effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* hot aqueous extract on NO, PGE2 production and DPPH radical scavenging in macrophage. Department of Oriental Medicine, Graduate School, Se Myeong University. 2013.

12. Ren DC, Du GH, Zhang JT. Inhibitory Effect of the Water-Soluble Extract of *Salvia miltiorrhiza* on Neutrophil-Endothelial Adhesion. *Jpn J Pharmacol*. 2002;90(3):276-80.
13. Yun HJ, et al. Anti-inflammatory effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix*. *The journal of Korean Herbology*. 2007;22(4):65-73.
14. Gim YG. Anti-inflammatory effects of Single Compounds isolated from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*. Graduate School of Yeongnam University. 2009.
15. Jeon SJ. Studies on the chemical analysis ant anti-inflammatory activities of the components isolated from the *salvia miltiorrhiza Bunge*. Graduate School of Andong University. 2007.
16. Mun SH. Studies on the anti-inflammatory effect of *Salvia miltiorrhiza* by the increase induction of Th-2 cytokine. Graduate School of Samyuk University. 2010.
17. Ye Jin. Anti-inflammatory activity of 15,16-dihydrotanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza*. Graduate School of Yeongnam University. 2012.
18. Bak SM, et al. Effect of *Salviae Multiorrhizae Radix* on the Vasculotoxicity induced by glucose oxidase in cultured Pumonary Endothelial cells. *The Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 2003;17(1):136-9.
19. Liang W, et al. Inhibitory effects of *salviae miltiorrhize radix* (danshen) and *puerariae lobatae radix* (gegen) in carbachol-induced rat detrusor smooth muscle contractility. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2012;4(1):36-44.
20. Gim YS, Bak CH. Effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* on Blood-Brain Barrier Impairment of ICH-Induced Rats. *The journal of Korean Herbology*. 2014;19(1):19-26.
21. Bak OG. Comparative study on the therapeutic effects of five major lipophilic diterpenoids from Danshen extract against cerebral ischemic damage. Graduate School of Hanrim University. 2012.
22. Eun JS, et al. Immunoregulative Action of *Salviae miltiorrhizae Radix* Water Extract. *The Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 2001;15(6):876-80.
23. Choe SM, Choe SH, An GS. Study on Antitumor and Apoptosis-Inducing Effects of *Salviae miltiorrhizae Radix*. *The Journal of Oriental Pathology*. 2000;14(2):22-47.
24. Kim SY, et al. Effects of tanshinone I isolated from *Salvia mitiorrhiza* on arachidonic acid metabolism and in vivo inflammatory responses. *Phytotherapy Res*. 2002;16(7):616-20.
25. Hambleton J, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(7):2774-8.
26. Atochina-Vasserman EN, et al. SP-D-dependent regulation of NO metabolism in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal

- macrophages. *Bull Exp Biol Med.* 2009; 147(4):415-20.
27. Shuzo O, et al. Polaprezinc Protects Mice against Endotoxin Shock. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46(3):234-43.
 28. Tateda K, et al. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun.* 1996;64(3):769-74.
 29. Laura CW, et al. NOX2 protects against progressive lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2014;307(1):71-82.
 30. Gim CM, et al. Jungyakdaesajeon. Seoul: Jeongdam. 1998:1117-26.
 31. I SJ. Bonchogangmok. Beijing: Junguigojeokchulpansa. 1994:330-31.
 32. Nijjima Y. Jinajungseuihaksa. Donggyeong: Gwahakseowon. 1981:262.
 33. Wen ZM, Xu LX. Isolation and elucidation of chemical constituents of Shandanshaoyao Decoction. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2001;26(6):406-8.
 34. Li HB, Chen F. Preparative isolation and purification of six diterpenoids from the Chinese medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 2001; 925(1-2):109-14.
 35. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991;21(4):361-74.
 36. Yoon WJ, et al. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsia J BioSci.* 2009; 3(1):130-43.
 37. McDaniel ML, et al. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 211(1):24-32.
 38. Caivano M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett.* 1999;429(3):249-53.
 39. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* 2004;382(2):393-409.
 40. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7(1):25-32.
 41. Zheng H, et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 β -deficient mice. *IMMUNITY.* 1995;3(1):9-19.
 42. Lukas G, Brindle SD, Greengard P. The Route of Absorption of Intraperitoneally Administered Compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1971;178(3):562-6.
 43. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:335-76.
 44. Hu P, et al. Quality Assessment of *Radix Salviae Miltiorrhizae*. *Chem. Pharm. Bull.* 2005;53(5):481-6.
 45. I HJ. Chemical Conversion of Water-Soluble Compounds of *Salvia miltiorrhiza*

- Bunge(Dansham)* by Decoction. Graduate School of Jeonnam University. 2007.
46. Li M. et al. Inhibition of shear-induced platelet aggregation in rat by tetramethylpyrazine and salvianolic acid B. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2004;31(2):97-103.
47. Lay IS, et al. Crude extract of *Salvia miltiorrhiza* and salvianolic acid B enhance in vitro angiogenesis in murine SVR endothelial cell line. *Planta Med*. 2003;69(1):26-32.