

Original Article / 원저

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포주에서 內疎黃連湯의 항염증 기전 및 항산화 효능 연구

전선홍¹·김태준²·김용민³

세명대학교 화장품학과 (¹대학원생, ³교수)
세명대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과 (²수련의)

본 논문은 2020년도 세명대학교 석사학위 졸업논문임

Anti-inflammatory mechanism and Anti-oxidant Effects of Naesohwangryun-tang in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells

Seon-Hong Jeon¹·Tae-Jun Kim²·Yong-Min Kim³

^{1,3}Dept. Of Cosmetic Sciences, Semyung University
²Dept. Of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology,
College of Korean Medicine, Semyung University

Abstract

Objectives : The aim of experiment is to examine anti-inflammatory effect and anti-oxidant effect of Naesohwangryun-tang (NSHRT) in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells.

Methods : In the present study, The cell viability was performed by MTT assay. Nitric oxide (NO) production and prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis were performed by NO assay and ELISA KIT. The anti-oxidant effect was performed by DPPH and ABTS radical scavenging activity. The inhibitory effects of pro-inflammatory mediators and cytokines were confirmed by realtime PCR and western blotting.

Results : NSHRT was no cytotoxicity at treated group. NO and PGE₂ production were inhibited compared to the LPS treated group and also mRNA and protein expressions were significantly decreased compared to the LPS treated group.

Conclusions : According to the above experiments, we confirmed that NSHRT has anti-inflammatory and anti-oxidant effects. It is suggested that NSHRT is potential ingredient of skin diseases.

Keywords : Naesohwangryun-tang (NSHRT), Anti-inflammatory. Anti-oxidant, NO, COX-2

I. 서 론

염증반응은 외부의 물리적 자극이나 화학적으로 유해한 물질 등에 의해 발생하는 조직 손상에 대한 방어반응으로, 생체내의 세포 및 조직이 외부에서 받은 자극을 국소화시켜 손상된 부위를 정상적으로 회복하고 유지하려는 생체의 방어기전이다. 주로 통증, 발열, 기능상실 등과 증상이 나타난다. 과도한 염증 반응 시 면역을 담당하는 세포가 활성화되는데, 대표적으로 대식세포가 있다¹⁾. 대식세포는 동물 체내 모든 조직에 분포하며 침입한 세균 등을 잡아 소화시키고, 활성화 된 대식세포는 체내 유입된 염증의 원인을 인식해 prostaglandin (PG), nitric oxide (NO)와 같은 염증 매개체 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α), Inter-leukin-1 β (IL-1 β), Inter-leukin-6 (IL-6)와 같은 pro-inflammatory cytokines 등의 염증 매개물질을 생성한다. 이 때, 대식세포는 다른 면역 세포들의 활성화를 유도하고 그에 따른 염증원인을 제거하고 복구하는 조절자 역할을 한다²⁾. Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 세포 외막에 존재하는 염증 유발 물질 역할을 하며, 대식세포 자극을 통해 NO, PGE₂ 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 염증 매개체들을 생성시킨다³⁾. 이러한 염증 매개체들의 과발현은 숙주에 치명적이며 혈관투과성과 부종 등의 염증반응을 촉진시킨다⁴⁾. 대식세포에서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 대표적 신호 전달 매개체의 역할을 하여 NO, COX-2 및 염증성 사이토카인의 발현과 생성에 관여한다^{5,6)}.

內疎黃連湯(Naesohwangryun-tang, NSHRT)은 《東醫寶鑑 雜病篇 癰疽》⁷⁾에 수록되어 있으며, 當歸, 連翹, 赤芍藥, 大黃, 檳榔, 梔子, 黃芩, 黃連, 甘草, 桔梗, 木香, 薄荷로 구성되어 있고, "治癰疽, 脉洪一作沈實, 發熱

煩躁, 藏府祕澁, 當先通利, 宜用此."로 인체의 體表에 발생하는 化膿性 질환인 癰瘍에 속하는 癰과 疽를 치료하는 처방이다⁸⁾. NSHRT에 대해 지금까지의 국내연구동향은 staphylococcus aureus 등에 대한 항균효과에 대한 천 등⁹⁾, 항산화, 항암, 항균에 대한 안 등¹⁰⁾, LPS로 염증을 유발한 흰쥐의 혈액에서 WBC count, IL-6 감소를 통한 소염에 대한 안 등¹¹⁾이 있으나, 항염증 기전에 관한 연구는 미비한 실정이다. 하지만 본원 외래에서 구내염을 호소하는 환자들에게 사용하여 증상 개선이 있었던 1-2례를 바탕으로 이 처방에 대한 항염의 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것을 인지하였고, 이에 본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 NSHRT의 항염증 기전 및 염증반응에서 생성되는 자유기의 소거능을 밝히고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험 재료

NSHRT 처방의 구성약재들은 (주)HMAX(제천, 한국)에서 구입하였으며, 처방된 약재들의 구성비는 아래의 표에 표기하였다(Table 1). 배합된 약재 192g과 3차 증류수 2000ml를 heating mantle(MS-DM607, M-TOPS, Korea)을 이용하여 100℃에서 4시간동안 환류 추출하였다. 추출물을 2회에 걸쳐 여과 후 감압농축기(CH-9230 Flawil 1, BUCHI Switzerland)로 농축시켜 100ml의 농축액을 얻었으며, 동결건조를 위해 초저온냉동고에 보관 후 동결건조기를 이용하여 동결건조를 시켰다. 동결건조 후 건조 분말은 40g을 얻었으며, 수율은 20.8%였다.

2. 세포 배양

본 연구에서는 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA)에서 구입한 RAW 264.7 마우스 대식세포를 사용하였으며, 1% Penicillin/Streptomycin (Gen DEPOT, USA)과

Corresponding author : Yong-Min Kim, Dept. Of Cosmetic Sciences, Semyung University, Jecheon, Chungbuk 27136, South Korea

(Tel : 043-653-6303, E-mail : dragonroom@hanmail.net)

•Received 2020/4/12 •Revised 2020/5/1 •Accepted 2020/5/8

10% fetal bovine serum (FBS; GenDEPOT, USA)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gen DEPOT, USA) 배양액에서 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기로 배양하였다.

Table 1. Contents of NSHRT

Herbal name	Scientific Name	Weight (g)
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	16
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	24
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	24
大黃	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	32
檳榔	<i>Arecae Semen</i>	16
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	16
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	16
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	16
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	8
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	8
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	8
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	8
Total		192

3. 세포 독성 평가

NSHRT의 세포 독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 7×10^4 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 상층액을 걷어내고 NSHRT를 농도별로 (62.5, 125, 250 및 500 µg/ml) 처리하고 24시간 반응시켰다. 이후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Bio basic, Canada)를 처리하고 4시간 반응시켰으며, dimethyl sulfoxide (DMSO, Bio basic, Canada)를 넣고 반응시킨 후 spectrophotometer (Synergy HT, bio-TEK, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도 측정을 하였다.

4. NO 생성 측정

RAW 264.7 세포에서 염증성 지표인 nitric oxide (NO)의 함량을 측정하기 위해 LPS (1 µg/ml)와 농도별

NSHRT를 (62.5, 125, 250 및 500 µg/ml) 처리하고 24 시간 배양하였다. 이후 Griess reagent (Sigma, USA)와 상층액을 동일한 비율로 하여 상온에서 반응시키고 spectrophotometer를 이용하여 540nm에서 흡광도 측정을 하였다.

5. PGE2 측정

NSHRT의 PGE₂ 생성을 측정하기 위해 ELISA kit (abcam, UK)를 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 6 well-plate에 6×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이후 상층액을 걷어내고 NSHRT를 농도별로 (62.5, 125, 250 및 500 µg/ml) 처리하고 24시간 반응시켰다. 이후 상층액을 수집하여 원심 분리 후 ELISA kit의 방법으로 진행하였으며, 최종적으로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. DPPH 라디칼 소거능 측정

NSHRT의 항산화 효과를 측정하기 위해 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 메탄올과 증류수를 동일한 비율로 섞은 용액을 용매로 사용하여 250 µM의 DPPH용액과 농도별 NSHRT를 (62.5, 125, 250 및 500 µg/ml) 제조 하고 96well-plate에 250 µM DPPH 용액과 농도별 NSHRT (62.5, 125, 250 및 500 µg/ml)를 동일한 비율로 혼합하고 spectrophotometer를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 200 µM Ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였다.

7. ABTS 라디칼 소거능 측정

NSHRT의 항산화 효과를 측정하기 위해 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 양이온 형성을 위해 7mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt 와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하고 빛을 차단한 조건에서 24시간 반응시켰다. 이후 ABTS의 흡광도 값이

0.7-0.8 사이의 값이 되도록 맞추고 농도별 NSHRT (62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 제조하여 ABTS 용액 100 μl 와 농도별 시료를 20 μl 를 빛이 차단된 상온에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 734nm에서 흡광도 측정을 하였다.

8. Real-time PCR

RAW 264.7 대식세포에서 NSHRT의 항염증 관련 유전자들의 mRNA 발현 수준을 확인하기 위해 5×10^5 cells/well 농도로 6 well-plate에 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 이후 상등액을 걷어내고 NSHRT를 농도별(62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하고 다시 24시간 반응시켰다. Trizol reagent (Ambion, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였고, diethylpyrocarbonate (DEPC treated-water; Sigma, USA)로 용해하고 정량하였다. cDNA 합성 kit (Revetra ACE-A-; Toyobo, Japan)를 사용해 정량된 RNA를 cDNA로 합성 후 Tagman master mix (Thermo-fisher, USA) 10 μl , 멸균수 4 μl , primer 1 μl , cDNA 5 μl 를 혼합하여 실시간으로 중합반응을 수행하였다.

9. Western blotting

RAW 264.7 대식세포에서 NSHRT의 항염증 및 항산화 관련 유전자들의 단백질 발현 수준을 확인하기 위해 1×10^6 cells/well로 6 well-plate에 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 상등액을 걷어내고 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 농도별 NSHRT

(62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 24시간 배양하였다. 상등액을 걷어내고 PBS로 2-3회 세척 후 HaltTM Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail kit (Thermo fisher, USA)를 첨가한 RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo fisher, USA)로 세포를 용해시켰다. 그 후 20분간 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000rpm의 조건으로 원심 분리하고 단백질을 얻었다. 추출된 단백질을 BCA assay (Thermo fisher, USA)로 정량하였고, 정량된 단백질을 10% polyacrylamide gel에 loading하고 전기영동 시켰다. Gel을 membrane으로 transfer하고 5%의 skim milk로 50분-1시간동안 blocking한 후 1차 항체와 over night하였다. 그 후 Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST)로 5분 단위로 3회 반복 세척한 후 2차 항체와 2시간동안 반응시킨 다음 단백질 발현을 확인하였다.

10. 통계분석

모든 데이터는 3회 반복하였으며, SPSS 12.0 version (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였다. Student t-test를 통하여 비교 분석하였으며, 모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. ($p < 0.05$ 가 통계적으로 유의)

III. 실험결과

1. 세포 생존율 측정

NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 세포 생존율을

Table 2. Gene Name and Assay ID Number in Real-time PCR Analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1
COX-2	Cyclooxygenase 2	Mm00478374_m1
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Mm004344228_m1
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
iNOS	Inducible nitic oxide synase	Mm00440502_m1

농도별(62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 확인한 결과, 처리한 농도(62.5-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 독성이 없음을 확인하였다. 이때의 세포 생존율은 각각 102.48 \pm 6.7%, 99.03 \pm 3.5%, 105, 94 \pm 3.8%, 104.59 \pm 4.6%, 103.83 \pm 11%로 나타났으며, 이에 본 연구에서는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 최고 농도로 실험을 진행하였다(Fig. 1).

2. NO 생성 저해 효과

NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 NO 생성 저해

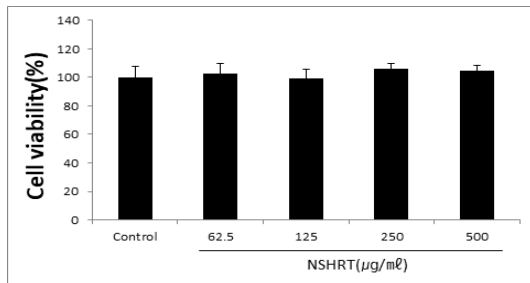


Fig. 1. The Effects of NSHRT on Cell Viability in RAW 264.7 Macrophage Cells.

Control: untreated group. 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$: treated with various concentrations of NSHRT.

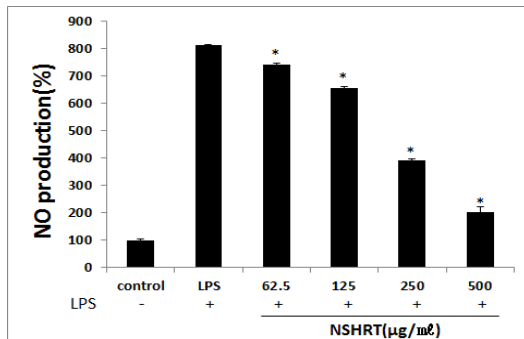


Fig. 2. The Effects of NSHRT on NO Production in LPS-induced RAW264.7 Macrophage Cells.

Control: untreated group. LPS: treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$: treated with various concentrations of NSHRT with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Values are relative to the control. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS.

효과를 농도별(62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 확인한 결과, 대조군의 값은 98.46 \pm 3.79%로 나타났으며 LPS만 처리한 군은 812.05 \pm 4.96%로 나타나 NO생성량이 상당히 많은 것을 확인했으며, NSHRT을 농도별로 처리한 군에서는 741.74 \pm 5.46%, 657.38 \pm 3.08%, 392.54 \pm 5.08%, 202.03 \pm 19%로 나타나 LPS 처리군에 비하여 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다(Fig. 2).

3. PGE2 생성 저해 효과

NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 PGE₂ 생성 저해 효과를 농도별(62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 확인한 결과, 대조군의 값은 52.02 \pm 0.5%로 나타났으며 LPS만 처리한 군은 100으로 나타나 PGE₂ 생성량이 상당히 많은 것을 확인했다. NSHRT을 농도별로 처리한 군에서는 86.74 \pm 1.75%, 80.80 \pm 1.88%, 66.37 \pm 1.99%, 50.80 \pm 2.3%로 나타나 LPS 처리군에 비하여 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다(Fig. 3).

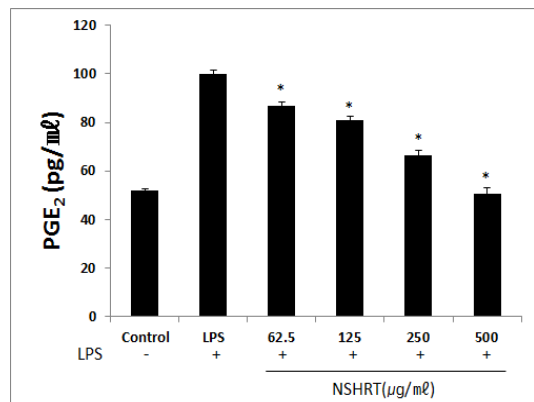


Fig. 3. The Effects of NSHRT on PGE2 Synthesis in LPS-induced RAW264.7 Macrophage Cells. Control: untreated group.

LPS: treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$: treated with various concentrations of NSHRT with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Values are relative to the control. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS.

4. DPPH 및 ABTS radical 소거능 측정

NSHRT의 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다.

DPPH 소거능은 각각의 농도별(62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 소거능을 나타내었으며, 대조군으로 Ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였다. 각각의 농도별(62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리했을 때, DPPH 소거능은 각각 18%, 39%, 56%, 59%의 radical 소거능을 나타냈으며, ABTS 소거능은 각각 5%, 15%, 24%, 35%의 radical 소거능을 나타내었다.(Fig. 4).

5. Real-time PCR

NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 iNOS, COX-2

및 pro-inflammatory cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과, LPS 처리군과 비교하였을 때 TNF- α 는 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였으며, TNF- α 를 제외한 나머지 인자들은 농도 의존적으로 감소하였다. 이런 억제효과는 NSHRT의 항염증 효능을 나타냈다(Fig. 5).

6. Western Blotting

NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 iNOS, COX-2 및 pro-inflammatory cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 protein 발현 수준을 확인한 결과, iNOS와 COX-2는 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였으며, 상위 신호전달 경로인 MAPKs (ERK, JNK, P38)의 인산화는 유의성 있게 감소하였다.(Fig. 6).

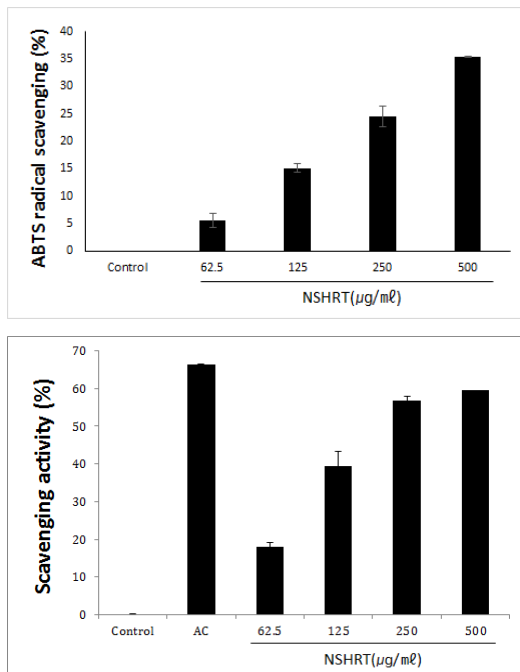


Fig. 4. The Effects of NSHRT on DPPH and ABTS Radical Scavenging.

Control: untreated group. Positive control: ascorbic acid (200 μm). 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$: treated with various concentrations of NSHRT.

IV. 고찰

NSHRT는 朝鮮代 許浚의 《東醫寶鑑 雜病篇 癰疽》⁷⁾에 수록되어 있으며 "治癰疽, 脉洪一作沈實, 發熱煩躁, 藏府祕澁, 當先通利, 宜用此, 癰疽不可不痛, 亦不可大痛. 未潰前痛者, 爲熱毒, 便秘者, 內疏黃連湯." 으로 통증이 강도가 강한 癰疽를 치료하는 처방으로 제시되어 있다. 癰疽는 한의학 피부질환인 癰과 疽가 혼재되어 있는 것으로, 癰은 體表皮肉之間에 발생하는 急性 化膿性 疾患의 일종으로 발생부위가 浮淺하며 局部가 光軟無頭하며 紅腫疼痛하면서 發病이 신속하고 易腫, 易膿, 易潰, 易斂하며 或 惡寒, 發熱, 口渴 등 全身症狀이 나타나는 특징이 있고¹²⁾, 疽는 急性 化膿性 疾患으로 肌膚間에 발생하는 有頭疽와 骨格과 關節사이에서 발생하는 無頭疽로 나누며 焮熱紅腫脹痛하며 難消 難潰 難斂하는 특징이 있다¹³⁾. 이와 같은 癰疽의 특징은 통증, 발적, 열감, 종창, 기능장애의 증상을 보이는 조직 손상에 대한 생체의 자가 방어능력 중의 하나인 염증 반응의 산물이라 볼 수 있다¹⁴⁾.

염증반응성 질환인 癰疽의 치료에 사용하는 NSHRT

는 當歸, 連翹, 赤芍藥, 大黃, 檳榔, 梔子, 黃芩, 黃連, 甘草, 桔梗, 木香, 薄荷로 구성된 처방으로 약재별 항염 효과에 대해서는 다음과 같이 연구되어져있다.大黃은 LPS

로 유도된 NO, TNF- α , IL-6, iNOS 등을 억제하는 것으로¹³⁾, 連翹는 5-lipoxygenase 및 elastase에 대한 억제 활성 및 free radical 생성 시스템에서 지질과산

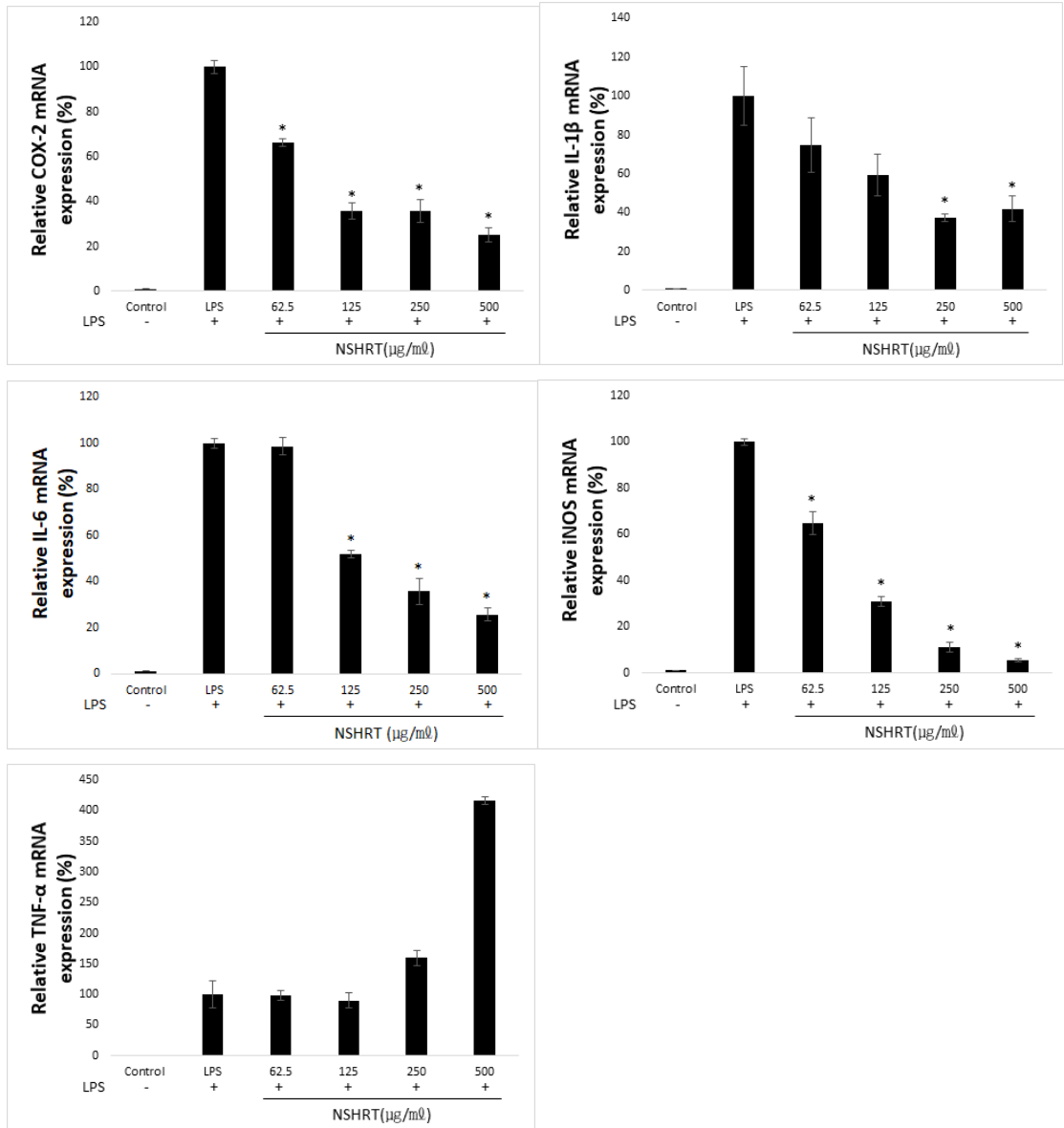


Fig. 5. Effect of NSHRT on LPS-induced iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 and IL-1 β , mRNA Expressions in RAW 264.7 Macrophage Cells.

Control : untreated group. LPS: treated with LPS (1 μ g/ml); 62.5, 125, 250 and 500 μ g/ml: treated with various concentrations of NSHRT with LPS (1 μ g/ml). Values are relative to the control. *p < 0.05 indicate a significant different from the LPS.

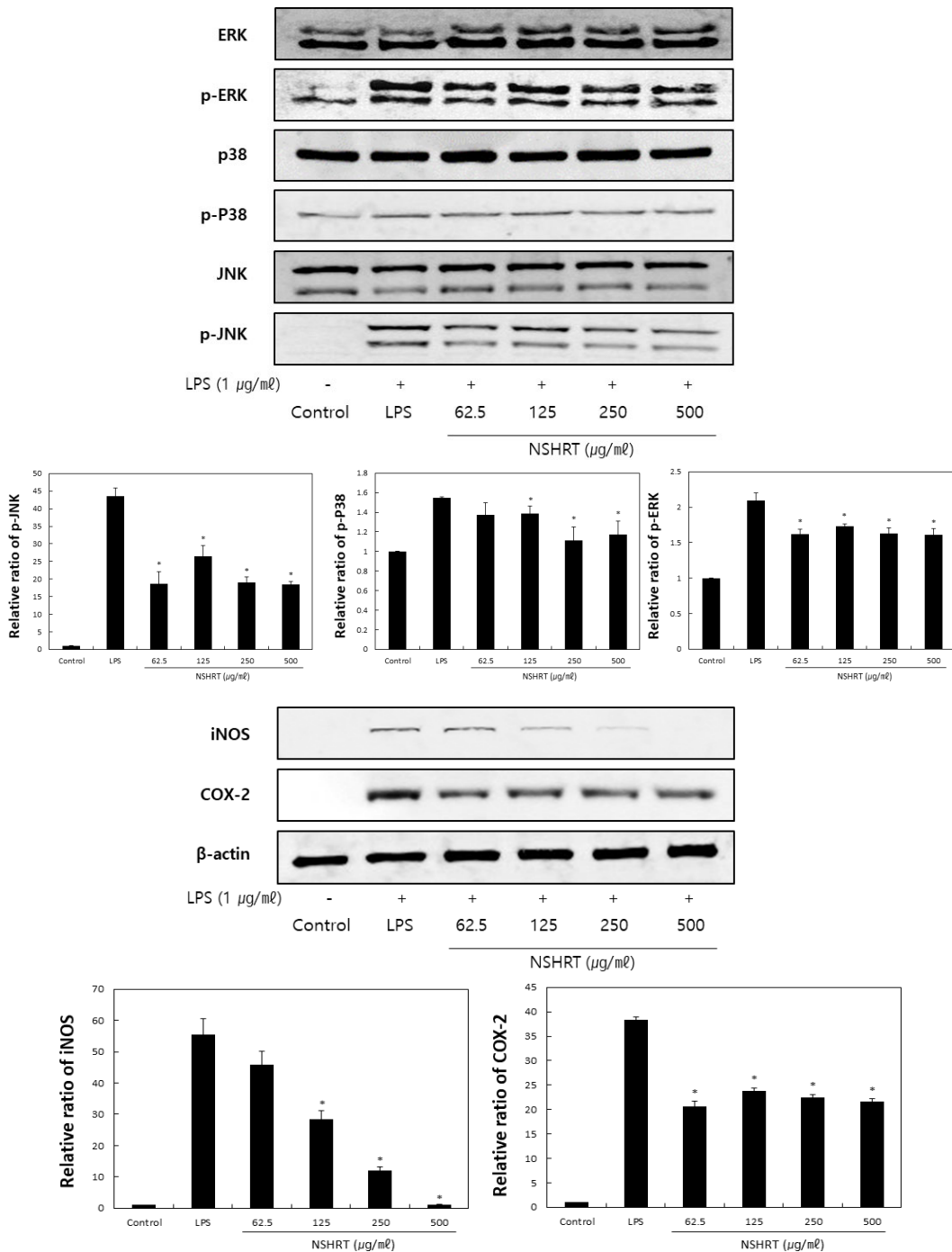


Fig. 6. Inhibition of iNOS, COX-2, MAPKs (ERK, JNK, P38) Protein Expressions of NSHRT by Western Blotting in LPS-induced RAW 264.7 Macrophage Cells.

Control: untreated group. LPS: treated with LPS(1µg/ml); 62.5, 125, 250 and 500µg/ml: treated with various concentrations of NSHRT with LPS(1µg/ml). Values are relative to the control. *p < 0.05 indicate a significant different from the LPS.

화를 억제하는 것으로, 梔子是 용량 의존적으로 NO 생성 저해작용이 있는 genipin과 PGE₂의 유리 억제 작용이 있는 crocin를 통해 항염증 효과가 있는 것으로, 黃芩은 유효성분 중 baicalein의 NF- κ B 활성억제를 통한 iNOS 발현 억제를 하는 것으로, 黃連은 유효성분인 pinoresinol, isolariciresinol, woorenosides이 TNF- α 분비를 억제 하는 것으로, 桔梗은 NF- κ B 억제를 통한 항염 작용이 있는 prosapogenin D methyl ester가 유효성분으로 있는 것으로¹⁵⁾, 芍药藥은 유효성분 중 paeoniflorigenone이 NO 생성억제와 T-림파구의 증식 억제 효과가 있는 것으로¹⁶⁾, 檳榔은 유효성분 중 arecoline이 pro-inflammatory cytokines인 IL-6를 억제하는 것으로^{17,18)}, 木香은 LPS로 유도된 염증 상황에서 NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β 를 억제하는 것으로¹⁹⁾, 薄荷는 LPS로 유도된 염증 상황에서 NO, PGE₂, TNF- α 를 감소시키는 것으로²⁰⁾, 當歸는 DNCB로 유도된 염증 상황에서 TNF- α , IL-6, COX-2를 억제 하는 것으로²¹⁾, 甘草는 iNOS 활성화 억제 및 NO, PGE₂를 감소시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다²²⁾.

NSHRT를 구성하는 개별 약재들의 항염 효과는 상술한 것과 같이 연구가 되어 있으나, 개별 약재들의 복합물인 NSHRT의 경우 staphylococcus aureus 등에 대한 항균에 대한 천 등의 논문⁹⁾, 항산화, 항암, 항균에 대한 안 등¹⁰⁾, LPS로 염증을 유발한 흰쥐의 혈액에서 WBC count, IL-6 감소를 통한 소염에 대한 안 등¹¹⁾이 있으나, 항염 효과와 항염증의 기전에 대한 연구는 미비한 실정이었다. 이에 본 연구는 LPS로 유도된 RAW264.7 cells에서 열수 추출된 NSHRT의 항염증 효과 및 기전과 항산화 효과를 평가하였다.

대식세포는 선천적 혹은 후천적 면역반응에서 NO, PG를 포함하는 염증 매개체 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6을 포함하는 pro-inflammatory cytokines을 조절하는 세포이다²³⁾. NO는 L-arginine의 합성 효소인 NOS에 의해 생성되며, NOS는 화학적 특성에 따라 3가지의 종류로 나뉘어진다. Type I (neuronla NOS),

Type II (endothelial NOS), TypeIII (inducible)의 3가지 NOS 중 Type I, II는 세포내에 항상 존재하고 있으며, TypeIII NOS만 특징적으로 LPS와 같은 외부 자극에 의해 발현된다²³⁾. 형성된 NO는 다양한 생리 활성 및 방어기작으로 작용하나 과발현 시 염증반응을 촉진시켜 조직과 신경 등을 손상시킨다. COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환 시 작용하는 효소로 2가지가 있으며, COX-1은 정상상태에서 작용하지만 COX-2는 염증부위에서 발현이 되며 염증반응 촉진뿐만 아니라 암의 발생과 연관이 있다²⁴⁾. 면역계는 본질적으로 사이토카인의 신호전달을 통해 상호간을 촉진시킨다. 또한 사이토카인은 특정 수용체에 결합하거나 막 결합 단백질에 신호를 전달한다²⁵⁾. LPS와 같은 외부자극에 의해 활성화된 대식 세포에서 TNF- α 는 IL-6, IL-1 β 등의 염증성 사이토카인의 생성을 촉진하여 염증 유발을 유도하며²⁶⁾, IL-1 β 는 염증성 자가 면역질환을 치료와 관련 있지만 과발현 시, 자가 면역장애, 관절염 및 피부염을 유도한다고 하며²⁷⁾, TNF- α 매개 염증성 질환을 조절한다. IL-6는 선천성 및 후천성 면역 반응과 항상성 유지 역할을 하나 과하게 생성되면 질환을 일으킨다^{28,29)}. 또한, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokines 및 단백질의 유전자 발현은 MAPKs와 nuclearfactor kappa B (NF- κ B)에 의해 조절된다. 정상 상태에서 NF- κ B는 inhibitory kappa B α (IkB α)에 의해 세포질에서 통제가 되며, 염증 반응 시에 IkB α 로부터 떨어져 활성화 된다. 활성화 된 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 들어가 pro-inflammatory cytokines 발현의 전사 인자로서 중요한 역할을 한다³⁰⁾. MAPKs는 ERK, JNK, P38로 이루어져있으며, ERK 및 P38은 IL-1 β 방출에 관여하고, P38은 TNF- α , IL-6 방출에 관여하고, JNK는 iNOS, COX-2 발현에 관여한다³¹⁾. 따라서 본 연구에서 LPS로 유도된 대식세포에서 NSHRT의 항염증 기전 및 항산화 효과를 평가하였다. NSHRT의 세포 독성을 파악하고자 MTT assay를 진행하였고 62.5-500 μ g/ml에서도 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 세포 독

성이 없는 농도에서 실험을 진행하여 염증성 매개인자인 NO와 PGE₂ 생성량을 확인 했으며(Fig. 2, 3), pro-inflammatory cytokines 및 iNOS, COX-2의 유전자 발현을 확인하였다(Fig. 5). 또한 단백질 발현정도를 확인하고자, 상위 신호전달 경로인 MAPKs (ERK, JNK, P38)의 인산화 정도를 확인했으며, NSHRT의 62.5-500 μ g/ml 농도에서 인산화 억제능을 확인했다. 이 결과 LPS로 유도된 대식세포에서 NSHRT의 항염증 효과를 확인했으며, MAPKs 신호 전달 경로를 통해 염증 반응을 억제하는 것으로 밝혀졌다. NSHRT의 추가적인 효능 확인을 위해 대표적 항산화 실험인 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 실시했으며, 항염증에서 설정된 농도에서 radical 소거능을 확인했다.

이러한 NSHRT의 염증 억제효과는 아토피피부염 등을 포함한 다양한 염증성 피부 질환에 대한 치료 소재로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 본 연구에서는 NSHRT가 어떠한 기전으로 항산화 효과를 내는지에 대해서는 밝히지 못하였기에, 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NSHRT의 항염증 기전 및 항산화 효과를 연구하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 농도에 따른 생존율을 확인한 결과, (62.5-500 μ g/ml)에서 독성이 없음을 확인하였다.
2. NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 NO 및 PGE₂ 생성 저해 효과를 확인한 결과, 농도 의존적으로 저해함을 확인하였다.
3. NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 iNOS, COX-2 및 pro-inflammatory cytokine(IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과, TNF- α 는 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하

였으며, TNF- α 를 제외한 나머지 인자들은 농도 의존적으로 감소하였다.

4. NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 protein 발현을 확인한 결과, iNOS, COX-2는 농도 의존적으로 감소하였으며, MAPKs (ERK, JNK, P38)의 인산화 또한 유의적으로 감소하였다.
5. NSHRT에 대한 RAW 264.7 세포의 항산화 실험 결과, DPPH 및 ABTS radical 소거능 평가에서 농도 의존적으로 radical 소거능이 있음을 확인하였다.

ORCID

Seon-Hong Jeon
(<https://orcid.org/0000-0002-1519-4325>)

Tae-Jun Kim
(<https://orcid.org/0000-0001-8976-1399>)

Yong-Min Kim
(<https://orcid.org/0000-0002-3064-9412>)

References

1. Perer P. Text of The Immune System / Third edition. Seoul:Lifescience 2011;1-27.
2. Kim IS, Kim SH, Lee KJ, Lee DS, Park JS, Lee NK, et al. Text of Essential Immunology. Seoul:daihak. 2017;28-9.
3. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. Brain Research Bulletin. 2011;87(1):10-20.
4. Hori M, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, et al. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology. 2001;280(5):930-8.

5. Samuel JA, Keith, Elazibeth AM. Specific Inhibitors of p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Block Inducible Nitric Oxide Synthase and Tumor Necrosis Factor Accumulation in Murin Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide and Interferon- γ . *The journal of Infectious Diseases*. 1999;179(4):939-44.
6. Joseph JB, Yanhua BI, Clifford JB. The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in IL-1 β Transcription. *The Journal of Immunology*. 1999;162(9):5367-73.
7. Heo J. Donguibogam. Hadong:Donguibogam Publisher. 2006:1539-86.
8. Ko WS, Kim KJ, Kim NK, Kim YB, Kim JH, Kim HT, et al. *Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery*. Busan:Seonu. 2007:139-62.
9. Chun SC, Jee SY, Lee SK. The Antimicrobial Activity of Naesohwangryuntang and Its Composition Oriental Medicins. *The Korea Journal of Herbology*. 2004;19(4):51-60.
10. An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Park TS, Park JM, et al. Antioxidant, Anticancer and Antibacterial Activities of Naesohwangryuntang and its Ingredients. *The Korea Journal of Herbology*. 2005;20(4):17-26.
11. Ahn JH, Sim SY, Kim KJ. The Anti-Inflammatory Effects of NeiShu-HuangLianTang In Experimental Animals. *Journal Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2004;17(3):8-17.
12. Kim JH, Kim TJ, Kim EH, Kim YM. Inhibitory effects of Wisaengtang on Inflammatory mediators in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2019;32(3):48-57.
13. Kim SJ, Kim TJ, Kim EH, Kim YM. Anti-inflammatory and Anti-oxidant Studies of Osung-tang Extracts in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2020;33(1):1-11.
14. Kim TJ, Kim YM, Kim HT. Effects of Naetakcheongeum-san on Anti-inflammatory Activities in RAW 264.7 cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2018; 31(1):12-21.
15. Korean pharmacology Textbook Editing Board. *Korean pharmacology*. Seoul: Shinilbooks. 2010:305-819.
16. Kim HY, Han YM. Anti-inflammatory Effect of Paeoniflorigenone Isolated from Paeoniae Radix. *Yakhak Hoeji*. 2012;56(1):20-5.
17. National Korean Medicine University Textbook Editing Board. *Traditional Herbology*. Seoul:Younglimsa. 2008:420-1.
18. Jeng JH, Wang YJ, Chiang BL, Lee PH, Chan CP, Ho YS, et al. Roles of keratinocyte inflammation in oral cancer: regulating the prostaglandin E2, interleukin-6 and TNF- α production of oral epithelial cells by areca nut extract and arecoline. *Carcinogenesis*. 2003;24(8):1301-15.
19. Choi WY, Jo MJ, Kim SC, Jung JY. Aucklandiae Radix has Inhibitory effects of pro-inflammatory mediator in LPS-induced RAW 264.7 cell. *The Journal of Jeahan Oriental Medical Academy*. 2009;7(1):1-12.
20. Lim HS, Kim JH, Ha HK, Seo CS, Shin HK. Comparative Study of the Anti-inflammatory Effects of Menthae Herba from Korea and

- China. Kor. J. Pharmacogn. 2012;43(3): 231-8.
21. Ryu DH, Oh SR, Jung TS, Ryu DS. The Effect of *Angelica gigas* Nakai Extract and *Bacillus Polyfermenticus* KJS-2 on Atopic Dermatitis induced by DNCB in mice. *J Korean Med.* 2017;38(3):30-42.
 22. Han MH, Lee MH, Hong SH, Choi YH, Moon JS, Song MK, et al. Comparison of Anti-inflammatory Activities among Ethanol Extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their Mixtures in RAW 246.7 Murine Macrophages. *Journal of Life Science.* 2014;24(3):329-35.
 23. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology.* 2001;1(8):1397-406.
 24. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *PNAS.* 1994;91(8):3228-32.
 25. Kevin A, Bockerstett, Richard JD. Regulation of gastric carcinogenesis by inflammatory cytokines. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2017;4(1): 47-53.
 26. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology.* 1998;20(1):133-47.
 27. Dinarello CA. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *The Journal of The American Society of Hematology.* 1996;87(6):2095-147.
 28. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 Family of Cytokines and gp130. *The Journal of The American Society of Hematology.* 1995;86(4):1243-54.
 29. Kim DY. Anti-allergic Effect of *Sapindus Mukorossi* Fruits Extract in Human Mast Cells. *Journal of Investigative Cosmetology.* 2019;15(4):389-95.
 30. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- κ B. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology.* 2010;42(4):519-23.
 31. Kim HK. Role of ERK/MAPK signalling pathway in anti-inflammatory effects of *Ecklonia cava* in activated human mast cell line-1 cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2014;7(9):703-8.