



Original Article / 원저

NF- κ B 및 MAPK억제를 통한 止渴散 물추출물의 염증억제효과

정덕자, 박상미, 김상찬*

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

Aqueous extract of Jigal-san ameliorates acute inflammatory responses in RAW 264.7 cells and rats

Deok Ja Jeong, Sang Mi Park, Sang Chan Kim*

Department of Korean Medicine, of Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Jigal-san (JGS, 止渴散) has been used in East Asia including Korea, Japan and China for the treatment of breast inflammatory disorders and severe thirst. JGS originated from Eumunpalbeob (醫門八法; Yimenbafa) composed of Lonicerae Flos and Taraxaci Herba. According to previous studies Lonicerae Flos and Taraxaci Herba have an anti-inflammatory effect, respectively. But, there is no studies regarding on the effects of JGS in the immunological activities. The present study evaluated the anti-inflammatory effects of JGS *in vitro* and *in vivo*.

Methods : Cell viability was evaluated by MTT assay, and NO was evaluated by content of the nitrite content in culture medium. TNF- α , IL-1 β and IL-6 were quantified by ELISA. The protein expression of NF- κ B, MAPKs, and iNOS were assessed by western blot analysis. Furthermore, the effects of JGS on acute inflammation were observed in rat paw edema model.

Results : The JGS ameliorates the LPS-activated changes in the protein expression of NF- κ B, p-JNK, and iNOS, as well as the production of NO and pro-inflammatory cytokines. In rat paw edema study, administration of 0.3 and 1.0 g/kg of JGS for 4 consecutive days inhibited the carrageenan (CA)-induced increases of edema and iNOS expression.

Conclusions : These results demonstrate that JGS has anti-inflammatory effect in LPS-stimulated RAW 264.7 cells through decreasing the production of inflammatory mediators, via suppression of the NF- κ B and MAPK pathways (JNK, not p-38 and ERK). In addition, the results of the CA-induced paw edema indicate that JGS ameliorates an inflammatory edema. Therefore, the present study could provide scientific evidence for the anti-inflammatory effect of JGS as well as the underlying mechanisms.

Key words : Jigal-san, Lonicerae Flos, Taraxaci Herba, Inflammation, NF- κ B, MAPK, RAW 264.7 cell, Rat.

I. 서론

止渴散은清代劉鴻恩이 편찬한『醫門八法』의 제4권에 기록된方劑로金銀花 5錢, 蒲公英 5錢으로 구성되어 있으며, ‘乳癰膿已成, 乳房紅而且紫, 大渴煩躁者’를 치료한다¹⁻³⁾. 止渴散의 구성약물 중, 金銀花(Lonicerae Flos)는忍冬科에 속한多年生 半常綠木質藤木인忍冬, 紅腺忍冬, 山銀花 및 毛花桂忍冬의花蕾를 건조한 것으로, 性은寒無毒하고 味는甘하다. 주로肺, 胃, 心經에 작용하여, 清熱解毒의 효능으로癰腫瘡毒, 風熱感冒, 喉痺 등을 치료하고, 涼血止痢의 효능으로熱毒血痢를 치료한다.⁴⁻⁶⁾ 또한 蒲公英(Taraxaca Herba)은菊花科에屬한多年生 草本인민들레, 함지포공영 또는同屬近緣植物의全草를乾燥한 것으로, 性은寒無毒하고 味는苦甘하다. 주로肝, 胃經에 작용하여, 清熱解毒의 효능으로目赤腫痛, 咽喉腫痛 등을 치료하고, 散結消腫의 효능으로急性乳腺炎, 癰癤, 疔瘡, 肺癰, 腸癰 등을 치료하며, 利水通淋의 효능으로熱淋澀痛을 치료한다.⁴⁻⁶⁾

止渴散의 구성약물과 관련된 연구로, 金銀花에는 항바이러스 효과⁷⁾, 항균효과⁸⁾, 항산화효과^{9,10)}, 항염증효과^{11,12)} 세포보호작용¹³⁻¹⁵⁾, 항암효과^{16,17)} 등 다양한 약리작용이 있음이 알려져 있으며, 蒲公英에는 항산화효과¹⁸⁾, 항염증효과^{19,20)}, 항암효과^{21,22)}, 세포보호작용^{23,24)} 등의 약리작용이 있음이 밝혀져 있다. 그러나 止渴散에 대한 연구는 전무한 상황이며, 止渴散과 가장 근접한 연구로는 홍 등이²⁵⁾ 金銀花(0.025%), 蒲公英(0.025%), sodium chloride (2%), triclosan (0.10%)을 함유하는 외용제제(치약)에 대한 세균막 및 치은염에 대한 연구가 있었다. 그러나 홍 등의 연구는 止渴散의 구성약물에 sodium chloride, triclosan이 추가되었고, 또한 외용제제이므로, 止渴散의 구성약물과 일치하는 내복약의 연구는 전무하며, 또한 止渴散의 항염증효과와 그 기전에 관한 연구도 극히 미흡한 실정이다.

止渴散은 또한 方劑의 基本方으로도 중요한 의미를 지

닌다. 즉, 止渴散은 救乳化毒湯 『洞天奧旨』²⁶⁾, 立消湯 『洞天奧旨』²⁷⁾, 三星湯 『辨證錄』²⁸⁾, 加味三星湯 『洞天奧旨』²⁷⁾, 化毒救生湯 『洞天奧旨』²⁾, 回生至聖丹 『辨證錄』²⁹⁾, 五味消毒飲 『醫宗金鑑』³⁰⁾ 등 다양한癰疽의 열성 질환에 배합이 된다.

이에 저자는 止渴散 물추출물이 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 RAW 264.7 cells에서의 nitric oxide (NO) 생성량, inducible nitric oxide (iNOS)의 발현 및 염증매개 cytokine의 생성량 등으로 항염증효과를 평가하고, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)와 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 신호전달체계에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 또한 *in vivo*로 carrageenan으로 유도된 급성염증 모델에서 止渴散의 항염증효과를 평가하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 止渴散 물추출물(JGS)의 제조

止渴散 구성약재인 金銀花, 蒲公英은 대원약업사(대구, 대한민국)에서 구매하였으며, 金銀花와 蒲公英을 각각 100 g씩 물 1.7 L에 넣고 3시간 추출하였다. 이후 止渴散 물추출물을 거여드로 1차 여과하고, 이 여액을 3000 ×g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액만을 취하여 0.2 μ m 여과지(Nalgene, New York, USA)로 여과한 후, 여과액을 Rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 止渴散 농축액은 초저온냉동기(Operon, Gimpo, Korea)에서 24시간 이상 동결하고, 동결 추출액은 동결건조기(LABCONCO, Kansas, MO, USA)에 넣어 동결건조 하였으며, 최종적으로 건조물 63.58 g을 얻었으며, 사용 때까지 냉동고에 보관하였다. JGS의 수율은 31.79%였으며, *in vitro* 처치에서는 DMEM에 녹여 농도에 맞게 처치하였고, *in vivo* 실험에서는 saline에 녹여 사용하였다.

*Corresponding author : Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuiddae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea
Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : October 29, 2021 / Revised : November 19, 2021 / Accepted : November 22, 2021



2. 시약 및 기구

MITT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)와 LPS (lipopolysaccharide; *Escherichia coli* 055:B5, Difco, Detroit, MI, USA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 FBS (Fetal bovine serum), 및 penicillin, streptomycin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, dimethylsulfoxide (DMSO)는 (주)純粋化學(Junsei Chemical Co., Ltd. Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. Anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), anti-inhibitory κ B α (I κ B α)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho-I κ B α , anti-nuclear factor- κ B (NF- κ B), MAPKs (anti-phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK), anti-JNK, anti-phospho-p38, anti-p38, anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK), anti- β -actin, anti-lamin A/C 및 peroxidase-conjugated secondary antibody는 Cell Signaling (Danvers, MA, USA)으로부터 구입하였다. Griess reagent system은 Promega (Madison, WI, USA)로부터 구입하였으며, NC (nitrocellulose) paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였으며, 배지에서 TNF (Tumor Necrosis Factor)- α 및 IL (interleukin)-1 β , IL-6의 cytokine은 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입한 ELISA Kit를 사용하였다. 급성염증성부종 유발 물질인 carrageenan은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며, 부종 측정은 Plethysmometer (LE 7500; LETICA Scientific Instruments, Spain)를 사용하여 측정하였다.

고성능액체크로마토그래피(UPLC)는 Waters사의 ACQUITY™ ultra performance LC system (USA)와, Waters사의 ACQUITY™ photodiode array detector (PDA), HPLC 컬럼은 Waters사의 ACQUITY™ BEH C₁₈ column (1.7 μ m, 2.1 \times 100)을 사용하였으며, software는 Empower를 사용하였다.

또한, UPLC에 필요한 시료 추출에 사용된 추출기는 Branson사의 ultrasonic cleaner 8210R-DHT를 사용하였다. 분석에 사용된 methanol (HPLC용)은 Junsei Chemical Co., Ltd., 아세트니트릴(HPLC용)은 JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA), 물은 3차 증류수를 사용하였다. 실험에 사용된 표준품 중 Luteolin 7-O- β -D glucoside와 Chlorogenic acid는 Sigma사로부터 구입하였고, Cichoric acid와

(E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester는 Chem Faces사 (Wuhan, Hubei China)로부터 구입하여 사용하였다.

3. 세포 배양

설치류의 대식세포주인 RAW 264.7 cells는 한국세포주 연구재단(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 세포배양액은 DMEM에 10%의 FBS, 100 U/mL의 penicillin, 100 μ g/mL의 streptomycin을 혼합한 배지를 사용하였으며, 세포배양기(Sanyo, Japan)의 배양조건은 37°C, 5% CO₂를 유지하였다. 실험과정의 모든 세포는 세포배양 dish의 면적에 세포가 80~90%이상 배양되었을 때 실험을 실시하였고, 계대배양 횟수는 20회를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

4. 止渴散의 성분분석

止渴散 물추출물의 정량에 사용된 표준품은 金銀花에서는 Luteolin-7-O- β -D-glucoside와 Chlorogenic acid, 蒲公英에서는 Cichoric acid와 (E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester를 지표성분으로 측정하였다. 각 표준품들을 1 mg/mL이 되게 UPLC용 methanol에 녹여 표준원액을 만들고, 이를 바탕으로 UPLC용 methanol로 1, 5, 10 μ g/mL의 농도로 희석하여, 표준액으로 제조하였다. 각 표준품의 표준곡선의 결정계수(R²) 값은 모두 0.999 이상이였다.

止渴散 물추출물 내에서 각 성분의 함유량을 평가하기 위하여, 균질하게 혼합한 止渴散 물추출물 동결건조 시료를 0.2 g 칭량하고, 이에 70% methanol 10 mL을 추가하여 1시간 초음파 추출하였다. 위 검액을 공경(孔徑) 0.22 μ m의 멤브레인 필터로 여과하여 검액으로 사용하였다.

분석 시 column의 온도는 실온에서 분석하였으며, PDA의 분석 파장은 Luteolin-7-O- β -D-glucoside와 (E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester는 380 nm, Chlorogenic acid, 은 330 nm, Cichoric acid는 310 nm에서 분석하였다.

이동상으로는 0.1% formic acid를 함유한 물, 0.1% formic acid를 함유한 아세트니트릴의 혼합액을 사용하여, Table 1의 조건으로 분석하였다. 표준품 또는 JGS 검액은 2 μ L 주입하였으며, 유속은 0.4 mL/min로 설정하였다. 분석결과는 머무름 시간(hold up time)에 의해 확인을 하였으며, 피크면적법으로 정량하였다.

Table 1. Gradient profile for the analysis of UPLC

Time (minutes)	0.1% Formic acid/acetonitrile (%)	0.1% Formic acid/water (%)	Flow rate (mL/min)
0	2	98	0.40
0.5	2	98	0.40
2.0	10	90	0.40
4.0	30	70	0.40
7.0	50	50	0.40
8.0	70	30	0.40
11.0	90	10	0.40
12.0	99	1	0.40
13.0	2	98	0.40
16.0	2	98	0.40

UPLC; Ultra Performance Liquid Chromatography

5. NO 생성량 측정

RAW 264.7 cells에서 생성된 Nitric Oxide의 양은 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉, Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ L에 각 실험군의 세포배양 상등액 50 μ L을 96 well plate에 잘 혼합하여 암실에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 microplate reader (Model; Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 control cell에 대한 각 실험군의 fold로 나타내었다.

$$\text{NO production (fold)} = \frac{\text{absorbance of treated sample}}{\text{absorbance of control}}$$

6. 세포 생존율 측정

RAW 264.7 cells를 24 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주한 다음 JGS를 10 ~300 μ g/mL로 처치하고, 이후 LPS를 처치한 후 37°C, 5% CO₂의 조건이 유지되는 배양기에서 18시간 배양한 후 세포생존율을 구하였다. 즉, 배양 후 24 well plate에 well당 MTT (0.1 mg/mL) 200 μ L를 넣고 4시간 추가 배양하였다. MTT는 생존세포의 미토콘드리아에 작용하여 암자색의 formazan을 형성한다. 배양 후 배지 well 바닥의 세포에 압력이 가해지지 않게 배지를 조심스럽게 제거하고 생성된 보라색 formazan crystal을 DMSO에 녹여 microplate reader (Model; Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대하여 각 실험군의 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\% control)} = 100 \times \frac{\text{absorbance of treated sample}}{\text{absorbance of control}}$$

7. 단백질 발현 측정

JGS과 LPS의 처치가 종료된 RAW 264.7 cells은 관찰하고자 하는 단백질에 따라 전세포 추출액(whole cell lysate)과 핵 분획 추출물(nuclear fraction)을 분리하였으며, 다음의 방법으로 분리하였다.

먼저, 전세포 추출액은 처치가 종료된 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 25 mM Tris-HCl (pH 7.6) 및 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS와 Halt protease, phosphatase inhibitor cocktail을 포함한 radioimmnoprecipitation (RIPA) buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 첨가하여, 4°C에서 30분 동안 반응시키고 15,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 본 상등액을 전세포 추출액으로 BCA protein assay kit를 이용하여 전세포 추출액의 단백질 함량을 정량하였다.

핵 분획은 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 10 mM Hepes (pH 7.9) 및 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Noridet P-40, 1 mM dithiothreitol과 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유한 완충액을 100 μ L 넣어 vortex하고 10분 동안 ice에 방치한 후 4°C에서 16,000 \times g로 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 제거하고 핵이 포함되어 있는 침전물에 20 mM Hepes (pH 7.9) 및 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride로 구성된 완충액을 40 μ L 넣은 후 현탁시켜



ice에서 1시간 방치한 후 4°C에서 16,000 ×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 핵분획물로 얻었다. 핵 분획은 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질 함량을 정량하였으며, 실험 시까지 -70°C에 보관하였다.

전세포추출액 및 핵분획의 단백질함량을 측정하고, 동일량의 단백질을 취하여 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법(SDS-PAGE; sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)으로 전기영동 시킨 후 nitrocellulose (NC) membrane으로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 NC membrane에 iNOS, I- κ B α , p-I- κ B α , NF- κ B, Lamin A/C 및 β -actin의 1차 antibody와 반응시킨 후, blocking, washing과정을 거치고, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시켜서 Amersham Biosciences사(Piscataway, NJ, USA)의 ECL detection reagents로 발색하여 단백질의 발현을 가시화하였다. 각 단백질의 발현량은 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하여 계량화하였으며, 각 단백질의 발현량은 control대비 각 실험군의 fold로 나타내었다.

$$\text{Relative protein level (fold)} = \frac{\text{density of treated sample}}{\text{density of control}}$$

8. Cytokine의 측정

Cytokine의 측정을 위하여 RAW 264.7 cells을 6 well plate에 5 × 10⁵ cell/mL를 분주하고 배양한 후, JGS를 100, 300 μ g/mL의 농도로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였으며, LPS 처치 후 18시간 만에 배지를 회수하여 cytokine을 측정하였다.

TNF- α 와 IL-1 β , IL-6는 Pierce endogen의 ELISA Kit를 사용하여 측정하였으며, 각 cytokine의 표준품마다 7개

의 농도를 측정하여 표준곡선을 얻었으며, 각 cytokine의 발현량은 표준곡선에 대입하여 pg/mL로 나타내었다.

9. 실험동물 및 처치

실험동물은 동물환경제어사육장치(ECRS; Environment Controlled Rearing System)에서 사육하였으며, 4주령 130-160 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐는 오리엔트바이오(Seongnam, Republic of Korea)로부터 구입하였으며 1주일 동안 사육장치에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물환경제어사육장치의 온도는 20-23°C, 습도는 60%, 명암주기는 12시간이 유지되도록 설정하였고, 사료(Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험은 대구한의대학교 산학협력단 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 획득한 후(승인번호; DHU 2020-059) 실험을 진행하였다.

실험은 어떠한 처치도 하지 않은 군을 normal군으로 설정하였고, carrageenan (100 μ L/rat)을 피하주사하여 염증을 유도한 군을 CA군으로 하였으며, carrageenan과 0.3 g/kg의 JGS를 투여한 군을 JGS 0.3 g/kg + CA군, carrageenan과 1.0 g/kg의 JGS를 투여한 군을 JGS 1.0 g/kg + CA군, carrageenan과 dexamethasone (1 mg/kg, p.o.)을 투여한 군을 DEXA + CA군으로 설정하였다. 각 실험군당 흰쥐의 마리 수는 5마리로 하였다. Dexamethasone과 JGS는 1일 1회로 4일 연속 투여하였으며, 4일째 마지막 약물투여 후 1시간에 랫드의 오른쪽 발바닥에 carrageenan을 100 μ L/rat로 주사하였다.

Table 2. Experimental Groups in This Study

Group	Treatment			
	CA	JGS 0.3	JGS 1.0	DEXA
Normal	-	-	-	-
CA	+	-	-	-
JGS 0.3 g/kg + CA	+	+	-	-
JGS 1.0 g/kg + CA	+	-	+	-
DEXA + CA	+	-	-	+

10. Paw edema의 유도 및 측정

4일 동안 매일 1회 약물을 투여하고, 마지막 투여 후 1시간에 carrageenan을 주사하여 paw edema를 유발시켰다. Paw edema의 부종정도는 carrageenan을 주사한 후 1시간마다(0, 1, 2, 3, 4시간) 측정하였으며, 부종측정기(Plethysmometer)로 측정하였다. 부종의 정도는 normal군 대비 각 실험군의 fold로 나타내었다.

$$\text{Paw edema volume (fold)} = \frac{\text{Paw volume of treated rats}}{\text{Paw volume of normal rats}}$$

11. 동물조직에서의 iNOS발현 측정

실험동물을 희생시킨 후 발바닥 조직을 채취하여 radioimmnoprecipitation (RIPA) buffer 1 mL을 넣고 조직파쇄기(Taco™ Prep Bead Beater; GeneReach, Taichung, Taiwan)를 이용하여 발바닥 조직을 균질화시켰다. 균질화 된 액을 15,000 ×g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻은 후, 이를 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)로 단백질의 함량을 정량하였다. 단백질 정량 후 전기영동 및 발색, 발색강도의 측정은 *in vitro*의 방법과 동일하게 하였다.

12. 조직처리 및 조직학적 평가

Carrageenan의 paw edema의 유발과 JGS의 염증회복여부를 살펴보기 위해 부종측정이 완료된 랫드의 오른쪽 후지(後肢)의 발목아래를 절단하여 조직을 채취하였다. 채취된 조직은 10% 중성포르말린에 24시간 이상 고정시킨 다음 탈수와 파라핀 포매를 실시한 후, 3~4 μm

의 두께로 paw의 전후종단(anterior-posterior longitudinal section)으로 절편을 제작하여 H&E (hematoxylin-eosin)로 염색하고, Park 등의 방법³¹⁾을 응용하여, 발등 및 발바닥의 피부 각각에서 1mm²의 영역에서 침윤된 염증세포의 수를 측정하였다.

13. 통계적 검증

모든 실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 먼저 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman - Keuls test로 검정하였다. 검정의 유의성은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

III. 결과

1. JGS의 UPLC분석

止渴散 물추출물의 개략적인 표준화를 위하여 金銀花에서는 Luteolin-7-O-β-D-glucoside와 Chlorogenic acid, 그리고 蒲公英에서는 Cichoric acid와 (E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester를 지표성분으로 측정하였다. 분석결과 본 연구에 사용된 JGS에는 Luteolin 7-0-B-D glucoside는 4,146 ± 0.024 ppm, Chlorogenic acid는 4,630 ± 0.019 ppm이 함유되어 있었으며, Cichoric acid는 20,476 ± 0.068 ppm, (E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester는 0.703 ± 0.010 ppm이 함유되어 있었다 (Table 3, Fig. 1).

Table 3. Contents of four kinds of marker components in JGS Extract

Herbal Formula	JGS (Jigal-san)			
Herb	Lonicerae Flos		Taraxaca Herba	
Compound	Luteolin 7-0-B-D glucoside	Chlorogenic acid	Cichoric acid	(E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester
Content (ppm)	4,146 ± 0.024	4,630 ± 0.019	20,476 ± 0.068	0.703 ± 0.010

The Extracts were analyzed for 4 kinds of components content using UPLC. Values are expressed as the means ± S.D. of three independent experiments. UPLC; Ultra Performance Liquid Chromatography.

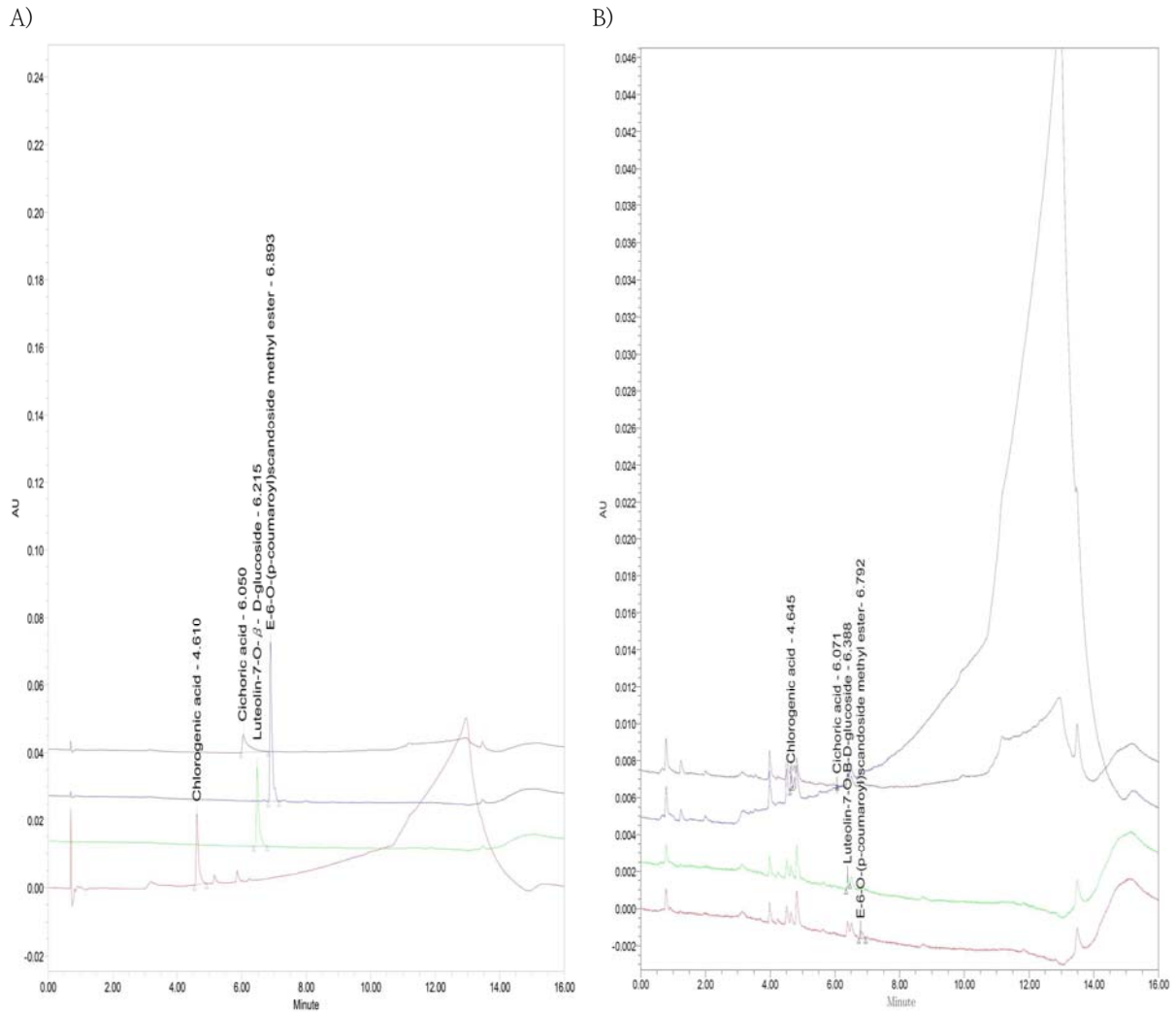


Fig. 1. UPLC chromatogram of the four marker compounds identified in JGS

UPLC chromatogram of commercial standard compounds (A). UPLC chromatogram of four marker compounds in JGS (B). The chromatograms were obtained at 380 nm (Luteolin-7-O- β -D-glucoside and (E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester), 330 nm (Chlorogenic acid) and 310 nm (Cichoric acid).

2. JGS가 NO production에 미치는 영향

JGS의 항염증효과를 평가하기 위하여 먼저 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cells에서 NO의 생성정도를 관찰하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 3.01 ± 0.05 배 증가하여 유의성 있는 NO의 증가($p < 0.01$)를 나타내었다. JGS 10과 $30 \mu\text{g/mL}$ 에서는

2.82 ± 0.07 과 2.97 ± 0.06 로 LPS군에 비교하여 감소하였으나, 유의성을 나타내지는 않았으며, JGS 100과 $300 \mu\text{g/mL}$ 의 전처치는 2.63 ± 0.09 와 2.07 ± 0.12 로 LPS군에 비교하여 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 2).

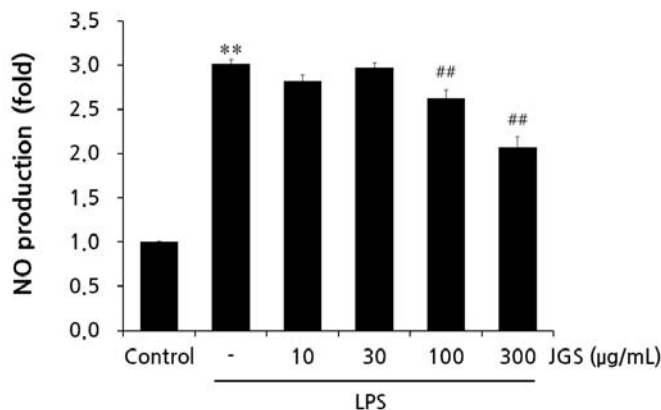


Fig. 2. Effects of JGS on the NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with 10, 30, 100 and 300 µg/mL of JGS dissolved in DMEM for 1 h before to the treatment of LPS (1 µg/mL), and then the cells were incubated for 18 h. After the incubation, the concentration of nitric oxide in culture medium was evaluated as described in materials and methods part. Values represent the mean ± S.D. of four separate experiments for each condition. *: vs. control group, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, ## $p < 0.01$.

3. JGS가 세포생존율에 미치는 영향

100과 300 µg/mL 농도의 JGS가 LPS에 의해 증가된 NO를 감소시킨 원인이 JGS + LPS (1 µg/mL)의 세포독성에서 기인한 것인지를 관찰하기 위하여, LPS + JGS를 처리하고 18시간 후에 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 구하였다.

LPS군에서는 control군에 비교하여 77.58 ± 1.30 %의 세포생존율을 나타내었으나($p < 0.01$), LPS와 JGS (10 ~

300 µg/mL)를 처리한 군에서는 각각 84.23 ± 0.68 , 91.21 ± 1.39 , 97.93 ± 2.11 , 84.98 ± 2.58 (%)로 LPS 단독 처리군과 비교하여 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다(Fig. 3).

이러한 세포생존율의 결과와 NO생성 억제 결과를 바탕으로 이후의 기전 연구는 JGS 100과 300 µg/mL의 농도에서 실험을 하였다.

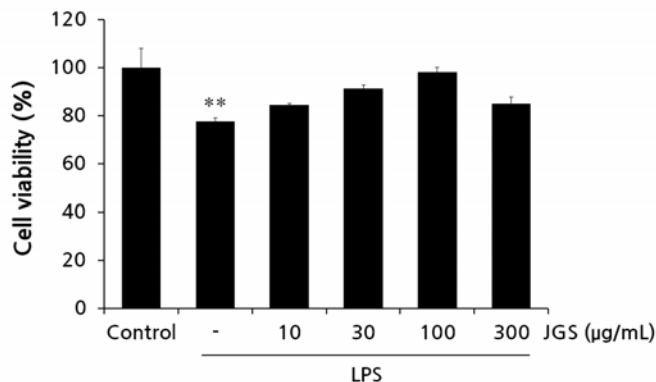


Fig. 3. Effects of JGS on the cell viability in LPS-activated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with 10, 30, 100 and 300 µg/mL of JGS dissolved in DMEM for 1 h before to the treatment of LPS (1 µg/mL), and then the cells were incubated for 18 h. After the incubation, the cells were treated with MTT solution. Values represent the mean ± S.D. of four separate experiments for each condition.

*: significant as compared to control, ** $p < 0.01$

4. JGS가 iNOS 발현에 미치는 영향

JGS 100과 300 μ g/mL 농도에서 NO를 유의하게 억제하는 것이 NO의 합성을 담당하는 핵심 효소인 iNOS 단백질의 조절과 관련이 있을 가능성을 평가하기 위해, 세포질에서 iNOS의 발현을 평가하였다.

LPS군에는 iNOS의 발현이 control 대비 24.35 \pm

1.26배로 유의하게 증가되었으나, JGS 100 μ g/mL의 농도에서는 24.59 \pm 1.52배로 LPS군과 유사하였으나, JGS 300 μ g/mL에서는 17.57 \pm 1.41배로 LPS군에 대비하여 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 JGS가 NO를 억제함에는 JGS가 iNOS의 발현을 억제함에서 기인하는 것을 의미한다.

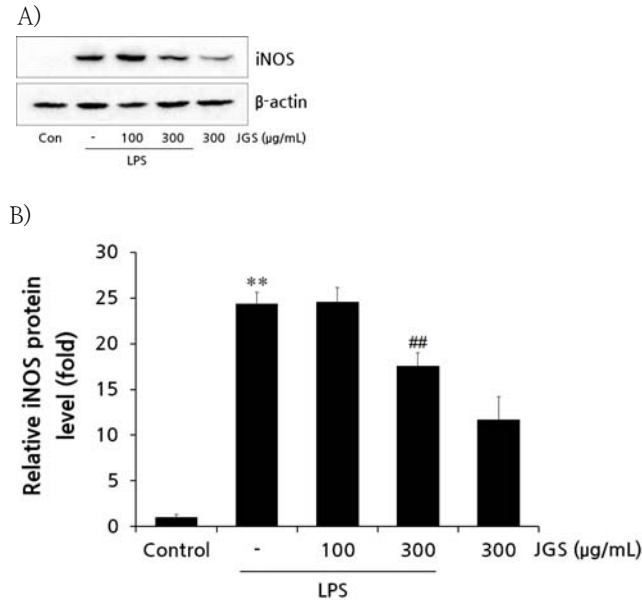


Fig. 4. Effects of JGS on the iNOS expression in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The levels of iNOS proteins were evaluated 18 h after treatment of LPS (1 μ g/mL) with or without JGS (100, 300 μ g/mL) pretreatment (i.e. 1 h before LPS). Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE. The iNOS protein were determined by immunoblot analysis using specific iNOS antibody. The expression of β -actin verified equal loading of the total lysates (A). The relative iNOS density was measured by scanning densitometry (B). Values represent the mean \pm S.D. of three separate experiments for each condition.

*: vs control group, ** $p < 0.01$, #: vs LPS alone, ## $p < 0.01$

5. JGS가 염증성 cytokine에 미치는 영향

Cytokine은 40 kDa이하의 분비단백질로 거의 모든 세포에서 생성되어 면역 반응을 조절하고 영향을 미친다. 전염증성 cytokine은 면역 세포의 활성화와 생산뿐만 아니라 추가적인 cytokine의 방출로 이어진다.³²⁾

본 연구에서는 대식세포(macrophage)에서 생성되는 TNF- α , IL-1 (α , β), IL-6, IL-10 등의 cytokine³³⁾ TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6의 생성량을 평가하였다.

TNF- α 는 염증반응을 매개하고, 시상하부에 작용하여 발열을 유도하며, 만성염증성 반응과도 관련되어 있다.³⁴⁾ 또한 근래에는 COVID-19 감염자에게 특징적으로 높게 나

타남이 보고되었다.³²⁾

본 연구에서는 아무런 처치도 하지 않은 control군에서는 TNF- α 가 21.78 \pm 0.99 pg/mL이었으나, LPS군에서는 2099.52 \pm 28.00 pg/mL로서 control군에 비교하여 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 TNF- α 의 증가는 JGS 100 μ g/mL과 300 μ g/mL에서 각각 1249.37 \pm 19.49, 516.67 \pm 35.93 (pg/mL)로 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 5A).

IL-1 β 역시 TNF- α 처럼 염증반응을 매개하고, 시상하부에 작용하여 발열을 유도하며, B-cell의 성숙, T-cell의 활성화 등과도 관련되어 있으며³⁵⁾, IL-1 α 및 IL-1 β 는

강력한 전염증성 물질로 역할을 한다.³⁶⁾ 또한 IL-6는 단핵구, 혈관내피세포, fibroblast 등에서 IL-1 및 TNF 등의 cytokine이나, 미생물에 의해 분비되며 B cell의 성장과 분화를 촉진한다^{37,38)}.

본 연구에서 control군에서는 IL-1 β 가 0.56 \pm 0.05 pg/mL이었으나, LPS군에서는 135.98 \pm 7.21 pg/mL로서 control군에 비교하여 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 IL-1 β 의 증가는 JGS 100 μ g/mL과 300 μ g/mL에서 각각 96.26 \pm 9.54, 25.38 \pm

3.58 (pg/mL)로 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 5B).

또한, IL-6는 control군에서는 6.04 \pm 0.47 pg/mL이었으나, LPS군에서는 598.54 \pm 9.91 pg/mL로서 control군에 비교하여 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 IL-6의 증가는 JGS 100 μ g/mL과 300 μ g/mL에서 각각 569.13 \pm 16.00, 286.60 \pm 20.66 (pg/mL)로 감소하였다. 특히 JGS 300 μ g/mL에서는 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었다 (Fig. 5C).

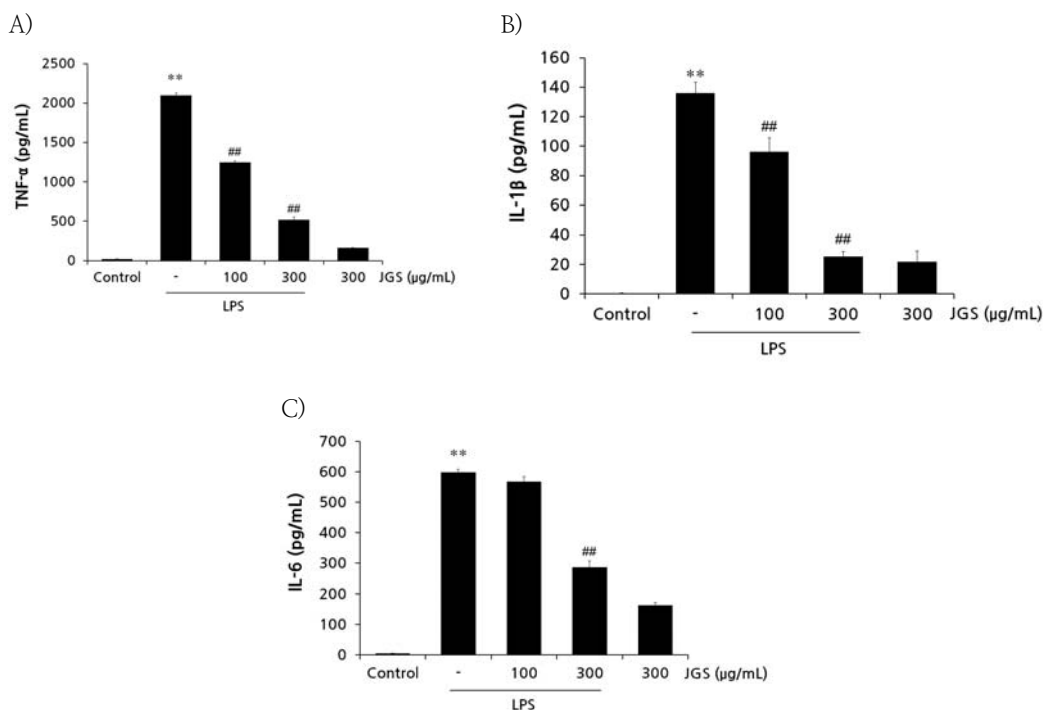


Fig. 5. Effects of JGS on the cytokine production in LPS-activated RAW 264.7 cells.

Pro-inflammatory cytokines were evaluated in the medium of RAW 264.7 cells treated with LPS (1 μ g/mL) in the presence or absence of JGS for 18 h. The amount of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) were evaluated by ELISA kit as described in materials and methods part. Values represent the mean \pm S.D. of three separate experiments for each condition. *: vs control group, ** $p < 0.01$, #: LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

6. JGS가 NF- κ B 발현에 미치는 영향

대식세포는 Toll-like receptors (TLR)를 통해 박테리아 산물을 감지하고 염증 반응을 조절하며, TLR4는 LPS (그람 음성 박테리아 지질 다당류)를 감지한다. 이후 전사 인자 NF- κ B를 활성화하여 NO, iNOS, cytokines를 생성하여 염증매개반응으로 이어진다. NF- κ B는 LPS의 자극에 의해 활성화되면 NF- κ B 억제단백질인 I- κ B가 인

산화되면서 분리되어 NF- κ B가 핵으로 이동하여 염증매개물질의 전사를 유도하게 된다³⁹⁾.

본 연구에서는 세포질에서 I κ B α , p-I κ B α 의 발현량을 평가하고, 핵분획에서는 NF- κ B 단백질의 발현량을 평가하였다.

본 연구에서 I κ B α 는 LPS군에서 control 대비 0.28 \pm 0.11 배로서 control군에 비교하여 유의하게($p < 0.01$) 감

소하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 I κ B α 의 증가는 JGS 100 μ g/mL과 300 μ g/mL에서 각각 0.85 ± 0.04 , 0.91 ± 0.01 (배)로 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 6A, B).

I κ B α 의 감소에 따라 p-I κ B α 는 LPS군에서 control 대비 2.56 ± 0.27 배로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였으나, JGS 300 μ g/mL에서는 증가된 p-I κ B α 가 1.43 ± 0.25

배로 LPS군에 비교하여 유의하게($p < 0.01$) 감소되었다(Fig. 6A, C).

NF- κ B는 핵분획에서 LPS 처치에 의해 control 대비 3.48 ± 0.12 배로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였으나, JGS 300 μ g/mL에서는 NF- κ B가 1.94 ± 0.07 배로 LPS군에 비교하여 유의하게($p < 0.01$) 감소되었다(Fig. 6D, E).

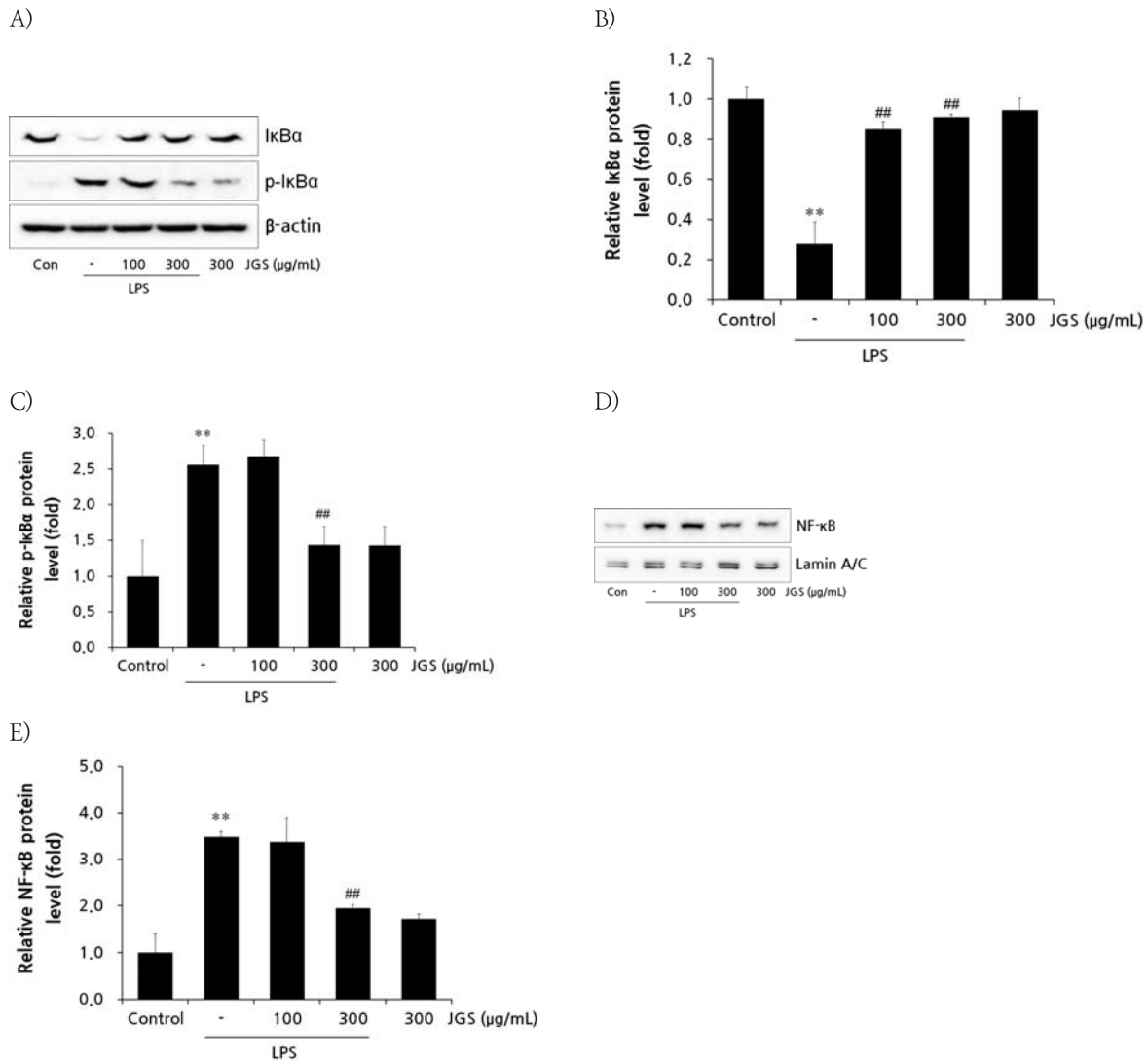


Fig. 6. Effects of JGS on the NF- κ B pathway in LPS-activated RAW 264.7 cells.

The levels of I κ B α proteins were monitored 30 min, p-I κ B α and NF- κ B proteins were 60 min after treatment of LPS (1 μ g/mL) with or without JGS pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The β -actin verified equal loading of the whole cell lysate, and Lamin A/C verified equal loading of the nuclear fraction (A and D). The relative density levels of the bands were measured by scanning densitometry (B, C and E). Data represent the mean \pm SD with three separate experiments. *: vs control group, ** $p < 0.01$, #: vs LPS alone, ## $p < 0.01$

7. JGS가 MAPK 발현에 미치는 영향

LPS는 LBP/CD14/TLR4을 통하여 NF- κ B cascade, MAPK (Mitogen-activated protein kinase) cascade를 활성화하여 염증반응을 유도한다³⁷⁾. 본 연구에서는 NF- κ B pathway외에 JGS가 MAPK pathway에 미치는 영향을 평가하였다. 이전의 연구들과^{40,41)} 같이 본 연구에서도 LPS는 JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38, 그리고 ERK (extracellular signal regulated kinase)의 인산화를 증가시켰다.

JNK의 인산화는 LPS군에서는 control군에 비교하여

2.86 \pm 0.66 배로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다. 그러나 이러한 LPS에 의한 JNK의 인산화는 JGS 100 μ g/mL과 300 μ g/mL에서 각각 1.25 \pm 0.26, 1.05 \pm 0.24 (배)로 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 7A, B).

p38의 인산화는 LPS군에서는 control군에 비교하여 3.44 \pm 0.22 배로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였으며, ERK의 인산화도 LPS군에서는 control군에 비교하여 2.70 \pm 0.25 배로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 그러나 JGS 100 μ g/mL과 300 μ g/mL은 p-38과 ERK의 인산화를 억제하지 못하였다(Fig. 7A, C, D).

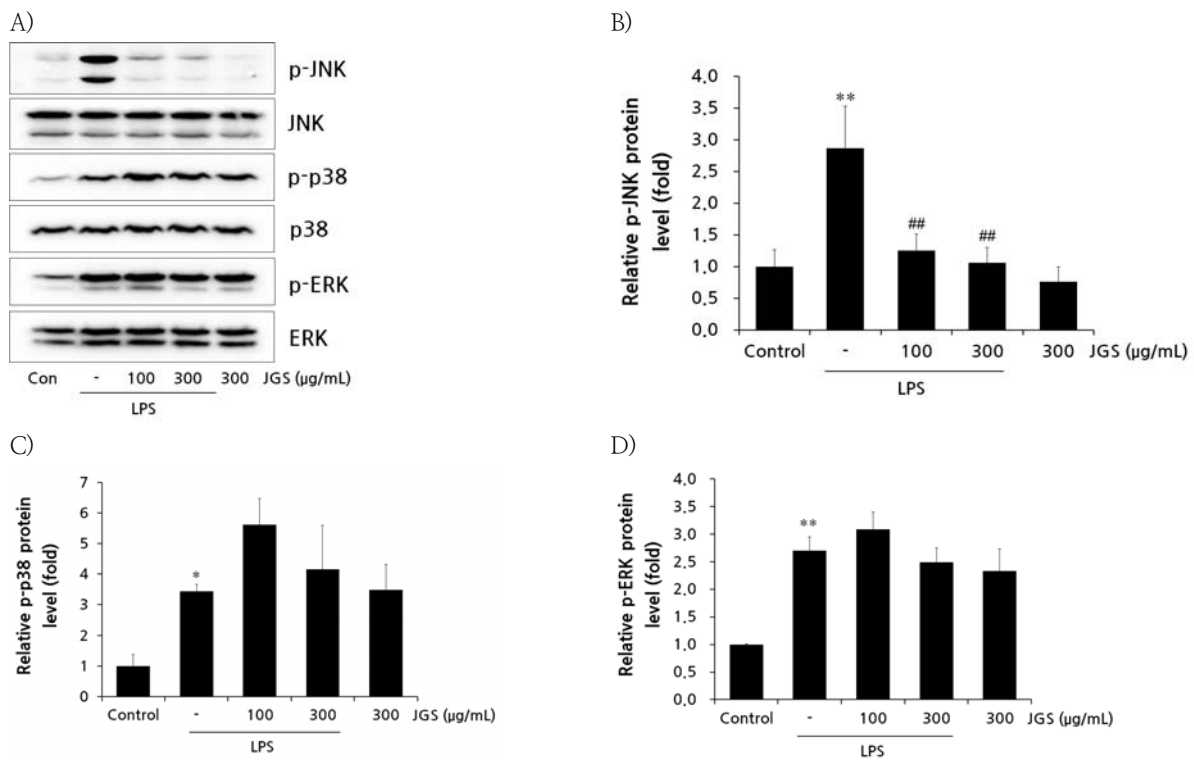


Fig. 7. Effects of JGS on the phosphorylation of MAPKs

The level of phosphorylated form and total amount of the MAPK proteins, JNK, p38 and ERK (A). The proteins were monitored 60 min after treatment of LPS (1 μ g/mL) with or without JGS pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The relative density levels of the bands were measured by scanning densitometry (B, C, D). Values represent the mean \pm S.D. of three separate experiments for each condition. *: vs control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, #: vs LPS alone, ## $p < 0.01$

8. JGS가 랫드의 paw edema에 미치는 영향

JGS의 *in vivo*에서의 항염증효과를 평가하기 위하여 랫드의 우측하지에 carrageenan (CA)을 주사하여 급성 염증성 부종 모델을 사용하였다.

Paw edema를 측정된 결과, CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4 시간에 각각 0.97 \pm 0.02, 1.18 \pm 0.05, 1.36 \pm 0.05, 1.52 \pm 0.02, 1.43 \pm 0.07 (배)를 나타내어 1~4 시간에 유의한($P < 0.01$) 발 부종이 유발되었다.

JGS 0.3 g/kg + CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4 시간에 각각 0.97 ± 0.03 , 1.10 ± 0.03 , 1.25 ± 0.10 , 1.19 ± 0.06 , 1.15 ± 0.03 (배)을 나타내어 3, 4시간에 유의하게($p < 0.01$) 발 부종이 억제되었다. JGS 1.3 g/kg + CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4 시간에 각각 0.94 ± 0.06 , 1.08 ± 0.04 , 1.16 ± 0.03 , 1.15 ± 0.06 , 1.12 ± 0.06 (배)을 나타내어 1시간($p < 0.05$) 및 2 ~ 4시간에

($p < 0.01$) 유의하게 발 부종이 억제되었다.

DEXA + CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4 시간에 각각 1.01 ± 0.03 , 1.07 ± 0.06 , 1.15 ± 0.06 , 1.19 ± 0.08 , 1.14 ± 0.09 (배)를 나타내어 1시간($p < 0.05$) 및 2 ~ 4시간에($p < 0.01$) 유의하게 발 부종이 억제되었다 (Fig. 8).

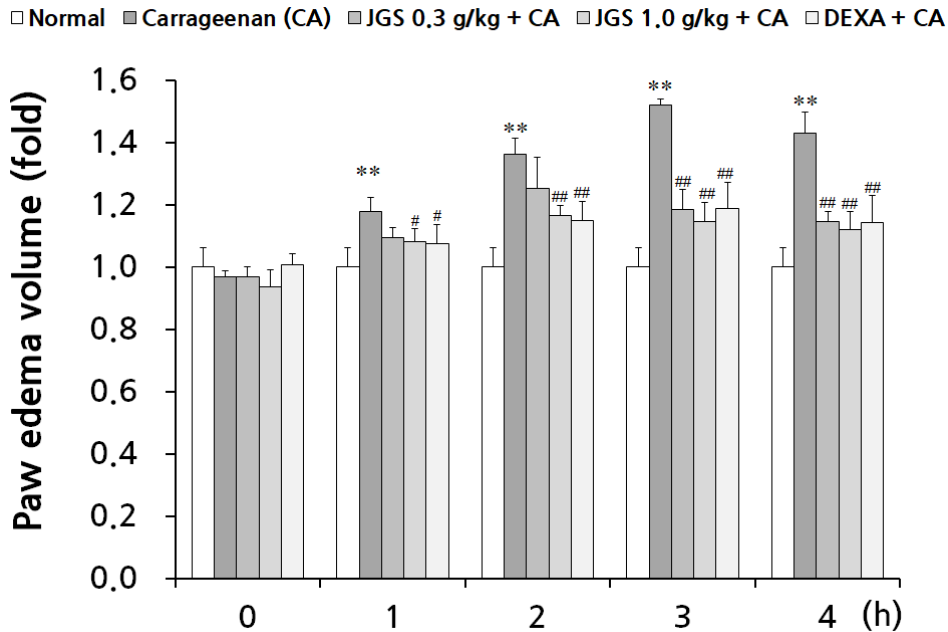


Fig. 8. Effects of JGS on the Paw Edema in Carrageenan-induced Rats

JGS was administered to rats at p.o. dose of 0.3 and 1.0 g/kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by injection of CA (s.c. 1% solution of CA dissolved in saline, 0.1 mL per rat) into the right hind paw. The paw swelling volume was measured at 0~4 h after CA injection. DEXA (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Values represent the mean \pm S.D. of five animals. *: vs normal group, ** $p < 0.01$, #: vs CA alone. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$.

9. JGS가 랫드의 paw edema에서 iNOS에 미치는 영향

JGS가 *in vitro*에서 300 μ g/mL의 농도에서 iNOS를 유의하게 억제하였으므로, 발 부종 모델의 부종 측정 후 염증조직을 적출하여 조직 내에서의 iNOS의 발현을 평가하였다.

iNOS 단백질의 발현에서 CA군에서는 normal (1.00

± 0.35) 대비 2.68 ± 0.08 배로 유의하게($p < 0.01$) 증가되었으나, JGS 1.3 g/kg + CA군에서는 1.42 ± 0.11 배로 CA군에 비교하여 유의성 있게($p < 0.01$) 감소되었으며, 이러한 결과는 양성대조군으로 사용된 DEXA군 (1.49 ± 0.23)과 동등한 수준을 나타내었다(Fig. 9A, B).

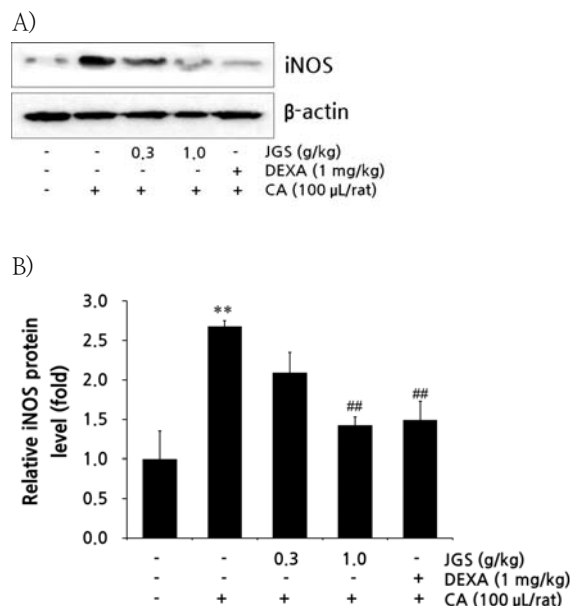


Fig. 9. Effects of JGS on the iNOS expression in Carrageenan-induced Rats

JGS was administered to rats at p.o. dose of 0.3 and 1.0 g/kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Expression of iNOS protein was determined by immunoblot assay using iNOS specific primary antibody. Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE. The expression of β -actin verified equal loading of lysate. (A) The relative density levels of the bands were measured by scanning densitometry (B). Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. *: vs normal group, ** $p < 0.01$, #: vs CA alone, ## $p < 0.01$

10. JGS가 랫드의 paw 조직에 미치는 영향

JGS가 carrageenan으로 유도된 급성염증성 부종에 대한 조직학적 평가를 위하여, 발 부종 측정이 완료된, 실험동물을 희생하여 부종이 유도된 우측하지 발의 발등 부분과 발바닥 부분에서 침윤염증세포의 수(cells/mm²)를 측정하였다.

발바닥의 침윤염증세포(cells/mm²)의 수는 normal에서는 59.20 \pm 14.86 개이었으나, CA군에서는 113.80 \pm 5.50으로 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였으며, JGS 0.3 g/kg, 1.0 g/kg 투여군에서는 각각 71.00 \pm 10.44,

78.40 \pm 4.83으로 CA군 대비 유의한($p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 양성대조군으로 사용된 DEXA군에서는 79.60 \pm 6.43으로 유의하게($p < 0.01$) 감소되었다. 발등의 침윤염증세포(cells/mm²)의 수는 normal에서는 44.00 \pm 3.24 개이었으나, CA군에서는 99.80 \pm 2.95로 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였으며, JGS 0.3 g/kg, 1.0 g/kg 투여군에서는 각각 51.20 \pm 9.73, 42.20 \pm 6.98로 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다. 양성대조군으로 사용된 DEXA군에서도 46.00 \pm 5.48로 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 10, 11).

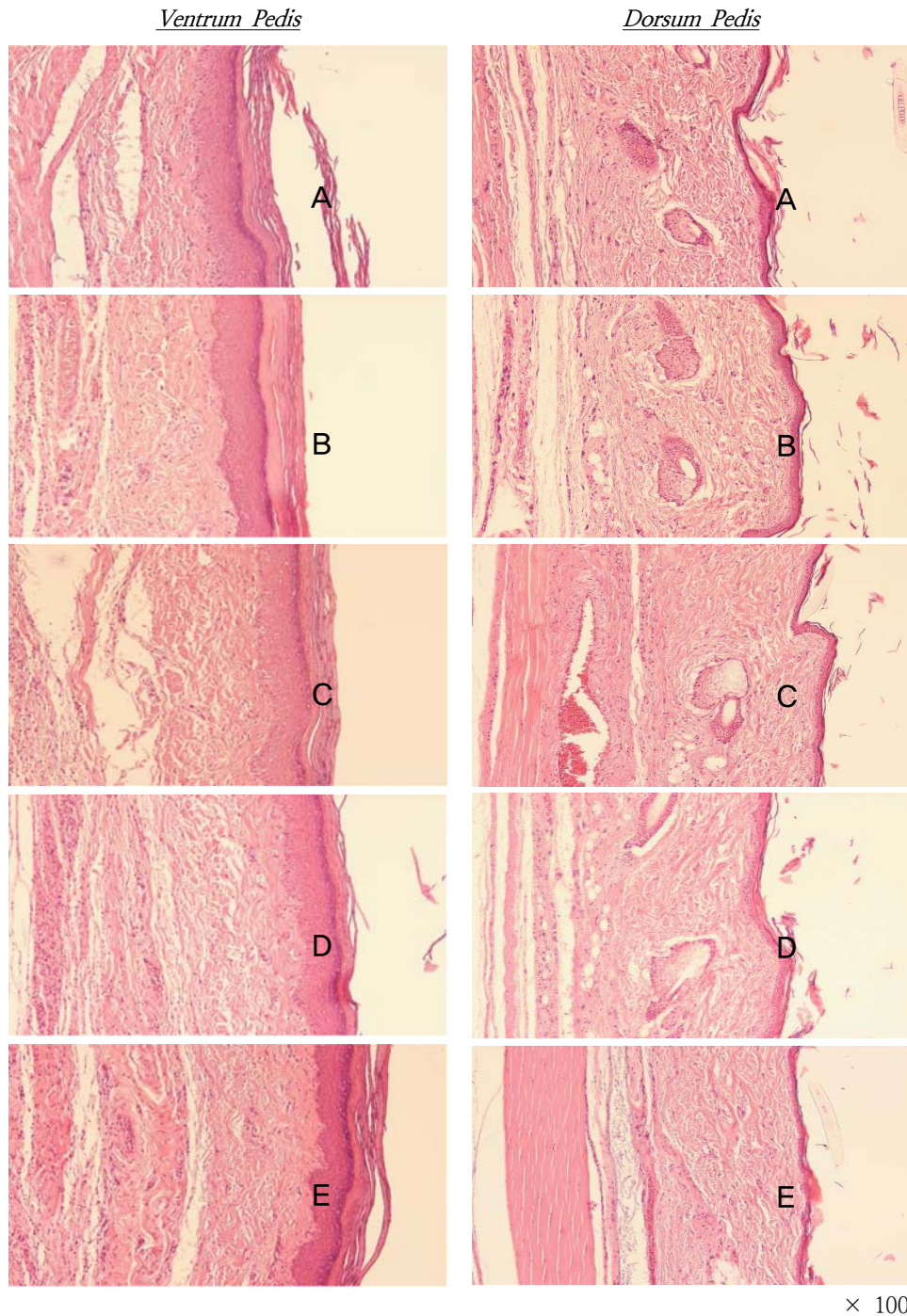


Fig. 10. Effects of JGS on the paw thickness in carrageenan-induced Rats.

JGS was administered to rats at p.o. dose of 0.3 and 1.0 g/kg/day for 4 days before the injection of CA (s.c. 1% solution of CA dissolved in saline, 0.1 mL per rat) into the right hind paw. DEXA (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. A-normal; B-carrageenan (CA); C-JGS 0.3 g/kg + CA; D-JGS 1.0 g/kg + CA; E-dexamethasone (DEXA) + CA.

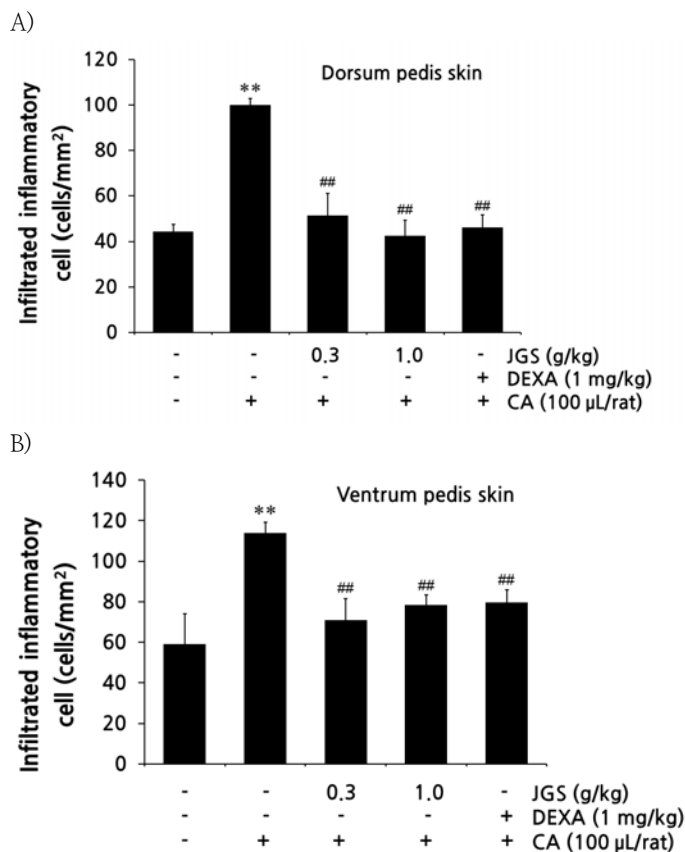


Fig. 11. Effects of JGS on the paw inflammation in carrageenan-induced Rats.

JGS was administered to rats at p.o. dose of 0.3 and 1.0 g/kg/day for 4 days before the injection of CA (s.c. 1% solution of CA dissolved in saline, 0.1 mL per rat) into the right hind paw. The infiltrated inflammatory cells of the rats was measured 4 h after CA injection. DEXA (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Values represent the mean \pm S.D. of five animals. *: vs normal group, ** $p < 0.01$, #: vs CA alone, ## $p < 0.01$.

IV. 고찰

止渴散은 金銀花 5錢, 蒲公英 5錢으로 구성되어 있으며, ‘乳癰膿已成, 乳房紅而且紫, 大渴煩躁者’를 치료한다.¹⁻³⁾

金銀花에는 항바이러스 효과²⁷⁾, 항균효과⁸⁾, 항산화효과^{9,10)}, 항염증효과^{11,12)}, 세포보호작용¹³⁻¹⁵⁾, 항암효과^{16,17)} 등이 알려져 있으며, 蒲公英에는 항산화효과¹⁸⁾, 항염증효과^{19,20)}, 항암효과^{21,22)}, 세포보호작용^{23,24)} 등이 밝혀져 있으나, 止渴散에 대한 연구는 전무하다.

止渴散은 또한 方劑의 基本方으로도 중요한 의미를

지닌다. 예를 들면, 止渴散에 當歸를 추가하면 乳癰, 乳吹初起를 치료하는 救乳化毒湯 『洞天奧旨』²⁶⁾이 되고, 여기에 다시 玄蓼를 추가하면, 癰疽發背, 肺癰, 腸癰을 치료하는 立消湯 『洞天奧旨』²⁷⁾이 된다. 또한 止渴散에 甘草를 추가하면, 口癰을 치료하는 三星湯 『辨證錄』²⁸⁾이 되고, 여기에 다시 玄蓼를 추가하면 陽疽를 치료하는 加味三星湯 『洞天奧旨』²⁷⁾이 되며, 여기에 다시 天花粉을 추가하면 頭面無故生瘡를 치료하는 化毒救生湯 『洞天奧旨』²⁾이 되고, 여기에 또 川芎을 추가하면 頭面疔毒, 癰瘡癰腫을 치료하는 回生至聖丹 『辨證錄』²⁹⁾이 된다. 그리고 止渴散에 野菊, 紫花地丁, 紫背

天葵子を 加하면, 疔瘡을 치료하는 五味消毒飲 『醫宗金鑑』³⁰⁾이 된다. 즉 止渴散은 다양한 癰疽의 열성 질환에

환에 배합되어 사용되었다.

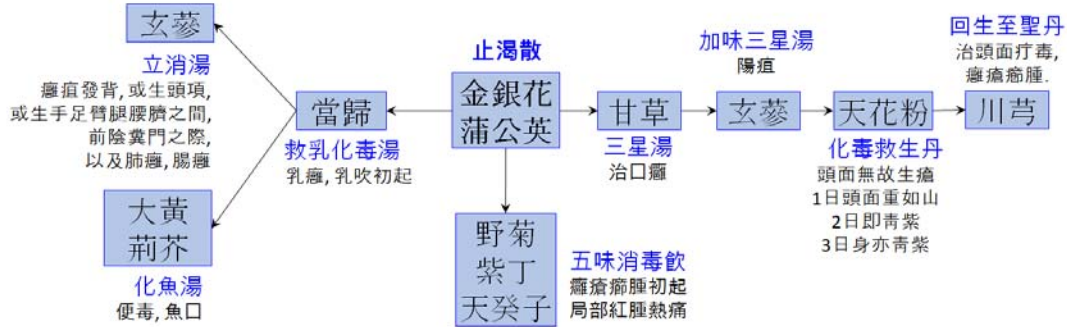


Fig. 12. The JGS can be changed into many herbal formulas with the addition of appropriate Herbs.

본 연구에서는 止渴散 물추출물이 *in vitro* 모델로 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서의 염증매개물질의 발현 및 NF- κ B, MAPK의 신호전달체계, *in vivo* 모델로 carrageenan으로 유도한 급성염증 동물모델을 이용하여 止渴散의 항염증효과를 평가하였다.

염증(inflammation)은 ‘균의 감염, 열, 외상, 항원항체 반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전’이라고 정의되지만, 현재에는 염증이 상해에 대한 생체조직의 정상적인 방어반응으로 인식되고 있다. 즉, 각종 유해한 자극에 대하여, 자극에 대한 손상을 제거하고 원래의 상태로 회복하려는 생체방어반응이다. 염증 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능상실과 같은 징후가 발생된다^{42,43)}.

염증반응에서 유해자극은 직접적으로 국소에 손상을 유발하기도 하지만, 대부분의 경우는 내인성 화학전달 물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 염증반응의 주요 화학 전달 매개물질로는 amine류(histamine, serotonin 등), kinin류(bradykinin 등), cytokine류, 프로스타글란딘 및 인터킨류가 있다.⁴⁴⁾ 본 연구에서는 止渴散의 항염증효과 및 그 기전을 연구하고자 *in vitro* 모델로 LPS로 활성화된 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cells 모델을 사용하였다.

Macrophage는 선천(내재)면역과 후천(획득)면역에서 중요한 역할을 한다. Macrophage는 endotoxin과 같은 microbial products 또는 IFN- γ 와 같은 T세포의 cytokine 등에 의해서 활성화되며, 활성화된 macrophage는 phagocytosis (식균작용) 및 microorganism의 살해, 전

염증성 cytokine의 분비, helper T cell로의 항원제시 역할을 한다. Macrophage는 혈관 내에서는 monocyte (단핵구)의 형태로 존재하나, 혈관벽을 통과하여 조직에 들어가서는 macrophage가 된다. 조직 내 macrophage는 활성화된 macrophage가 되기도 하고, 또한 분화하기도 하는데, 중추신경계에서는 microglial cell이 되며, 간에서는 kupffer cell, 폐에서는 alveolar macrophage가 되며, 뼈에서는 osteoclast가 된다.³⁷⁾

한편, LPS는 gram negative bacteria의 외벽 절편 복합물로서, lipid와 polysaccharide로 구성되어 있다.³⁷⁾ LPS는 혈액이나 세포외액에 존재하는 可溶性의 LPS 결합단백질(LBP; LPS-binding protein)과 결합하고, 이 LPS-LBP 복합체가 macrophage 표면의 CD14에 결합하면 LBP는 분리된다. LPS-CD14 복합체가 macrophage 표면의 TLR4에 결합하면 LPS/CD14/TLR4 복합체를 이루어 IRK (IL-1 receptor associate kinase)의 인산화를 유도하고, 다시 TRAF6 (TNF-R-associate factor 6)의 활성화를 유도하여, NF- κ B cascade, MAPK cascade를 활성화하여 염증매개반응을 활성화한다.³⁷⁾

한약재는 단일물질로 이루어진 것이 아니고, 다양한 물질로 이루어진 복합체이다. 또한 성분의 함량도 일정하지 않고, 비율도 일정하지 않으며, 산지, 품종, 채취시기, 시비(施肥), 기상조건, 저장 기간에 따라 유효성분의 함량이 달라지는 경우가 많다.⁴⁵⁾ 이러한 제한점을 조금이라도 극복하기 위하여 본 연구에 사용된 止渴散 물추출물의 4가지 성분을 평가하였다. 물추출물에서 金銀花성분인 Luteolin 7-O-B-D glucoside는 4.146 ±

0.024 ppm, Chlorogenic acid는 4.630 ± 0.019 ppm 이 함유되어 있었으며, 蒲公英성분은 Cichoric acid는 20.476 ± 0.068 ppm, (E)-6-O-(p-coumaroyl)scandoside methyl ester는 0.703 ± 0.010 ppm이 함유되어 있었다.

JGS의 항염증효과를 평가하기 위하여, 먼저 NO의 생성정도를 관찰하였다. NO는 L-arginine으로부터 생성되며, NOS (nitric oxide synthase)에 의하여 L-arginine 이 NO와 L-citrulline으로 생성된다. NO는 강력한 내인성 혈관확장인자로서 혈소판의 부착이나, 응고를 억제하며, 또한 혈관평활근의 증식을 억제하나, 지속적인 고농도의 NO는 숙주에 불리하게 작용하며, 염증반응 유발에 의한 조직의 손상을 초래할 수 있다.⁴⁶⁻⁵⁰⁾

LPS군에서는 NO의 생성량이 유의성 있게 증가하였으며, 이러한 NO의 증가는 JGS 100과 300 $\mu\text{g/mL}$ 에 의해 유의하게 감소하였다. 세포생존율을 평가한 결과, LPS + JGS 100과 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 LPS단독 처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않아, JGS의 NO 감소는 세포독성에 의한 것이 아니라 JGS 자체의 항염증효과에서 비롯됨을 추론할 수 있다.

NOS는 neuronal NOS (nNOS; type I), inducible NOS (iNOS; type II), endothelial NOS (eNOS; type III)의 형태가 있다. nNOS는 주로 신경전달에 관여하며, 신경, 뇌의 손상에서는 증가하고, iNOS는 면역세포 독성에 관여하며 cytokine이나, endotoxin에 의하여 활성화된다. eNOS는 주로 혈관평활근의 이완에 관여하며, 성호르몬이나 shear (剪斷) stress에서 증가한다.^{51,52)} 그러므로 본 연구에서는 NO의 결과와 관련하여 iNOS의 발현을 평가하였다. JGS는 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS에 의해 발현이 증가된 iNOS를 유의성 있게 감소시켰다. 이러한 결과는 JGS가 iNOS의 발현을 억제하고 이에 따라 NO가 억제됨을 의미한다.

한편, LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells 모델에서는 TNF- α 및 IL-1 β , IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF 등의 염증병리반응을 매개하는 cytokine이 다량으로 생성되는 것으로 알려져 있다.^{36,53-57)}

이 중 TNF- α 는 monocyte, macrophage, mast cell 등으로부터 분비되는 전염증성 cytokine으로, 근래에는 TNF- α 가 자가면역질환에 있어서 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있으며³⁵⁾, 또한 COVID-19 감염자의 다양한 염증매개물질 중 TNF- α 를 포함한 IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, MIP1A, MCP1이 특징적으로 높게 나

타남이 보고되었다.³²⁾ IL-1은 IL-1 α 와 IL-1 β 의 2가지가 있으며, TNF와 유사하게 염증반응에 관여한다. IL-1 α 와 IL-1 β 중, 체내에 풍부하게 존재하는 것은 대부분이 IL-1 β 이다. IL-6는 주로 B cell을 성숙시켜 항체의 생성을 촉진한다.³⁷⁾

본 연구에서도 RAW 264.7 cells은 LPS에 의해 TNF- α 및 IL-1 β , IL-6를 유의하게 증가시켰으며, JGS 100 $\mu\text{g/mL}$ 과 300 $\mu\text{g/mL}$ 은 증가된 TNF- α 및 IL-1 β 를 유의하게 감소시켰으며, JGS 300 $\mu\text{g/mL}$ 은 LPS에 의해 증가된 IL-6를 유의하게 억제시켰다.

한편, LPS에 의해 활성화된 macrophage는 TLR (Toll-like receptor)를 통하여 염증반응을 매개하는데, 이의 신호전달 경로로는 NF- κ B pathway가 잘 알려져 있다.³⁹⁾ NF- κ B pathway는 염증반응뿐만 아니라, 류마티드 관절염, 염증성 장질환, 다발성경화증, 천식, 건선 등에서도 발현이 항진되어 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁸⁾

일반적인 상황에서 NF- κ B는 macrophage의 세포질 내에서 NF- κ B의 억제단백질인 I κ B와 결합하여 안정 형태로 존재하지만, LPS의 자극에 의해 macrophage가 활성화되어 염증반응이 활성화되면 NF- κ B 신호전달계가 활성화되어 I κ B가 인산화되고, NF- κ B가 핵내로 이동하여 iNOS, TNF, IL, COX 등의 전사를 유도한다. I κ B는 α , β , ϵ 등의 여러 가지가 형태가 있지만, 세포내에서 가장 많이 존재하는 것은 I κ B α 이다.³⁴⁾

따라서 본 연구에서는 세포질에서는 I κ B α , p-I κ B α 의 발현량을 평가하였고, 핵분획에서는 NF- κ B의 발현량을 평가하였다. LPS는 I κ B α 의 인산화를 촉진시켜 I κ B α 의 발현은 감소시켰고, p-I κ B α 의 발현량은 증가시켰다. 그러나 이러한 변화는, JGS에 의해 유의성 있게 회복되었다. 또한 핵내에서의 NF- κ B역시 LPS에 의해 증가하였고, JGS에 의해 유의성 있게 감소되었다. 이러한 결과는 JGS가 I κ B α 의 인산화를 억제하고, 또한 NF- κ B가 핵으로 전위되는 과정을 억제하여 염증을 억제할 수 있음을 나타낸다.

LPS는 LBP/CD14/TLR4를 통하여 염증매개반응의 또 다른 경로인 MAPK (mitogen-activated protein kinase) cascade를 활성화하여 염증반응을 유도한다.^{37,40)} LPS에 의한 MAPK의 인산화는 microglial cell (BV2 cell)^{40,41)} 및 macrophage (RAW 264.7 cell)⁵⁹⁾, 랫드로부터 분리한 Kupffer cell⁶⁰⁾ 등 다양한 대식세포에서 보고되었다.

LPS는 c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 그리고

extracellular signal regulated kinase (ERK)의 인산화를 유도하여, 염증관련효소, cytokine 및 chemokine 등의 생성을 촉진한다.^{40,61)} 이런 까닭에 MAPK는 NF- κ B와 더불어 LPS로 유도되는 염증물질의 탐색연구에 빈용된다. 그러므로 본 연구에서는 NF- κ B pathway외에 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서 MAPK의 활성을 평가하였다.

본 연구에서도 LPS는 다른 연구결과와^{63,63)} 같이 JNK, p38, ERK의 인산화를 유의성 있게 증가시켰다. 그러나

JGS는 JNK의 인산화를 유의하게 억제하였으나, p-38과 ERK의 인산화는 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 JGS가 부분적으로 MAPK의 인산화를 조절하여 염증억제에 관여함을 나타낸다.

위의 *in vitro*의 연구결과를 종합하면 JGS는 NF- κ B의 억제단백질인 I κ B α 의 인산화를 억제하고 NF- κ B의 핵으로 전위를 억제하며, 또한 MAPK 중 JNK의 인산화를 억제하여 항염증효과를 나타냄을 의미한다.

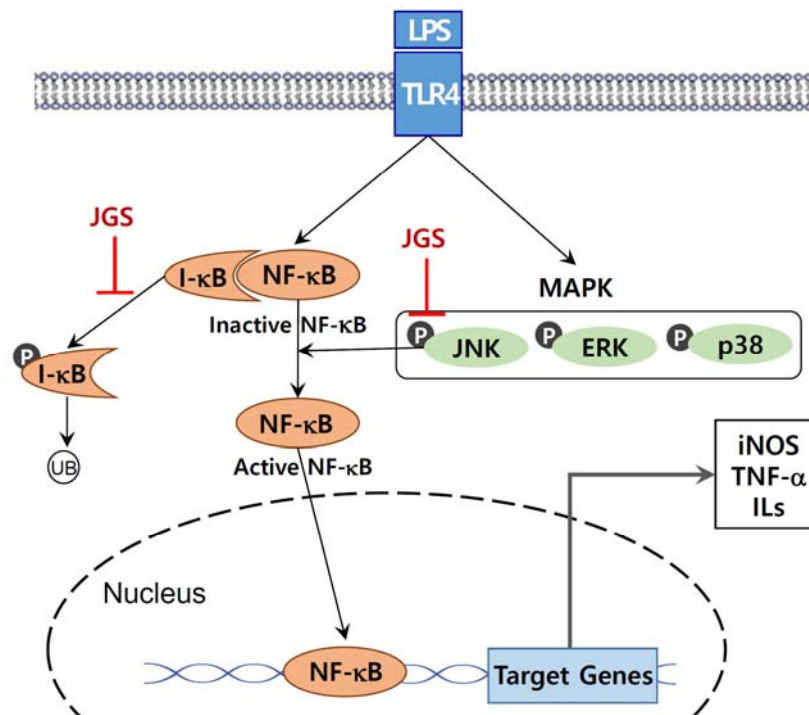


Fig. 13. Proposed mechanism of the anti-inflammatory effect of JGS.

JGS pretreatment inhibited the phosphorylation of I κ B and JNK, subsequently suppressing translocation of NF- κ B into the nucleus, resulting in inhibition of the inflammatory response in LPS-stimulated in RAW 264.7 cells.

*In vitro*에서 JGS의 항염증작용 및 그 기전을 확인하고, *in vivo*에서도 JGS가 항염증효과를 나타내는지 확인하기 위하여 carrageenan으로 유도된 랫드의 급성 발부종모델을 사용하여 평가하였다. Carrageenan은 염증세포의 침윤을 동반한 급성부종을 초래하고, 투여부위에 염증세포의 침윤을 동반한 피부 조직의 부종을 유발하므로 급성 염증에 대한 항염증 물질의 탐색에 빈용되고 있다.^{64,65)}

본 실험의 결과에서도 carrageenan은 주사후 1~4시간에 유의한 족부종을 유발하였고, JGS는 1~4시간에 유의한 족부종의 억제를 나타내었다. 특히 JGS를 1.0 g/kg를 투여한 군에서는 양성대조군으로 사용된 dexamethasone 투여군과 동등한 부종억제효과를 나타내었다. 또한 *in vitro*에서 JGS가 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였듯이 부종조직에서도 JGS의 투여가 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였다. 조직학적인 평가결과에서도 carrageenan

으로 급성염증성 부종을 유발군에서는 침윤 염증세포의 수가 유의하게 증가되었으며, JGS 0.3 및 1.0 g/kg의 투여에 의해 유의성 있게 억제되었다. 이상의 연구결과는 止渴散 물추출물(JGS)에는 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 유의한 항염증작용이 있음을 의미한다.

본 연구는 ‘乳癰膿已成, 乳房紅而且紫, 大渴煩躁者’를 치료하는 止渴散의 항염증효과를 확인하고, 항염증효과의 기전 및 *in vivo*에서의 항염증효과를 평가하였다. 그러나 본 연구에서는 ① 止渴散의 구성약물인 金銀花와 蒲公英이 항염증효과에서 배합에 따른 상승효과가 있는지, ② 항염증효과에서 金銀花와 蒲公英의 최적 배합비율은 어떠한지, ③ 金銀花와 蒲公英의 성분 중 어떠한 성분이 핵심적으로 작용하는지 ④ 止渴散(金銀花, 蒲公英 等分)이 포함된 다수의 方劑에서는 항염증효과와 관련되어 止渴散이 어떠한 영향을 미치는지에 대하여서는 연구가 되지 않았고, ⑤ 또한 본 연구는 일반적 항염증연구를 시행한 것으로 止渴散의 乳癰膿已成, 乳房紅而且紫 등 유발염 관련사항에 대하여서는 직접적 증거로 보기 어려우므로 향후 이와 관련하여 진보된 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

V. 결론

止渴散은 金銀花, 蒲公英으로 구성되어 있으며, 乳癰에膿이 있거나, 乳房이 紅紫하고, 갈증이 있으며 煩躁한 者를 치료한다. 본 연구에서는 止渴散 물추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells에서의 염증매개물질의 발현 및 NF- κ B, MAPK의 신호전달체계, carrageenan 유도 급성염증 동물모델에서 항염증효과를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. JGS는 LPS에 의해 증가된 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였으며, 이에 따라 NO의 생성 역시 유의하게 억제시켰다. JGS와 LPS의 처치는 LPS단독 처치에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.
2. JGS는 LPS에 의해 증가된 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 염증성 cytokine을 유의하게 억제하였다.
3. JGS는 I κ B α 의 인산화를 유의하게 억제하여 NF- κ B경로의 활성화를 억제하고, 또한 부분적으로 MAPK, 특히 JNK의 인산화를 억제하여 항염증효과를 나타내었다.
4. JGS는 발부종이 유도된 paw edema를 유의하게 억

제하고, 또한 조직에서의 iNOS발현 및 침윤 염증세포의 수를 유의하게 감소시켰다.

이러한 연구결과는 止渴散의 항염증효과에 대한 객관적인 근거를 부분적으로 제시할 수 있으며, 또한 止渴散이 포함된 관련 方劑의 활용에도 보조적 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgement

This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No.2018R1A5A2025272).

References

1. Tian DH. Practical Chinese medicine prescriptions. Beijing:Renminweisheng publisher. 1999:730
2. Peng HR. Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 2). Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:523
3. <http://ypk.39.net/f20376.html>
4. Lee SI. Herbology. Seoul:Suseowon. 1981:520-23.
5. Shin MK. Clinical Herbology. Seoul:Younglimsa. 1997:411-2, 445-7.
6. Professor of Herbology at College of Oriental Medicine. Herbology. Seoul:Younglimsa. 1992:198-202.
7. Suhr SS, Jung SK. Antiviral Effects of Fermented Lonicerae Flos on A Type Influenza Virus. Korean J. Orient. Int. Med. 2009;30(3):465-80.
8. Bae JH, Kim MS, Kang EH. Antimicrobial Effect of Lonicerae Flos Extracts on Food-borne Pathogens. Korean J. Food Sci. Technol. 2005; 37(4):642-7.
9. Cho WJ, Yoon HS, Kim YH, Kim JM, Yoo IJ, Han MD, Bang IS. Cytoprotective Effects and Gene Expression Patterns Observed Based on the Antioxidant Activity of Lonicera japonica Extract. Journal of Life Science. 2013;23(8):989-97.
10. Seo SH, Bae GS, Choi SB, Jo IJ, Kim DG, Shin JY, Song HJ, Park SJ, Choi MO. The antioxidative and cytoprotective effect of Lonicerae japonicae



- Flos water extracts on the ultraviolet(UV)B-induced human HaCaT keratinocytes. *Kor. J. Herbology*. 2014;29(6):63-71.
11. Moon TC, Park JO, Chung KW, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW, Chung KC. Anti-inflammatory Activity of the Flavonoid components of *Lonicera japonica*. *Yakhak Hoeji*. 1999;43(1):117-23.
 12. Yun KJ, Lee EY. Effects of Hot Aqueous and Ethanol Extract from *Lonicera japonica* Flos on NO and PGE2 in Macrophage. *The Journal of Acupuncture Research & Moxibustion Society*. 2012;29(1):67-74.
 13. Park SK, Choi BG, Lee EB. Effect of *Lonicera Japonica* Flower on CCl₄ - induced Hepatotoxicity. *The Journal of Applied Pharmacology*. 2002;10(4):32-6.
 14. Seo SH, Choi MO. Protective effects of *Lonicerae Japonicae* Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on Human keratinocyte, HaCaT cells. *Kor. J. Herbology*. 2013;28(4):57-62.
 15. Son Y, Ma CJ. Neuroprotective Activity of Caffeic Acid Isolated from *Lonicera japonica*. *Kor. J. Pharmacogn*. 2020;51(1):30-5.
 16. Han DS, Baek KH, Kim YO, Choi KE, Kwag JS, Baek SH. Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal Plants. Part 6. Cytotoxic Activity of the Ethyl Acetate Soluble Fraction of *Lonicerae* flos against Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells. *Kor. J. Pharmacogn*. 1998;29(1):22-7.
 17. Kim JW, Lim JK. Antitumor Activity and Chemopreventive Potential of *Lonicerae* flos Aqua-Acupuncture Solution. *Journal of Acupuncture Research*. 1999;16(2):261-84.
 18. Kim HW, Kim BJ, Lim SH, Kim HY, Lee SY, Cho SI, Kim YK. Anti-oxidative Effects of *Taraxaci* Herba and Protective Effects on Human HaCaT Keratinocyte. *Kor. J. Herbology*. 2009;24(3):103-8.
 19. Lee MH, Song SH, Ham IH, Bu YM, Kim HC, Choi HY. Anti-inflammatory effect and contents from the aerial part and root of the various *Taraxacum* spp. distributed in Korea. *Kor. J. Herbology*. 2010;25(4):77-84.
 20. Hahm DH, Sur BJ, Han DO, Park JH, Jung ET, Lee HJ, Koh YJ, Choi HD. Anti-inflammatory Activity of Dandelion in Mice. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2008;22(4):810-4.
 21. Kim DH, Kim SH. Synergistic action of Anticancer activity and Anticancer drug on Hepatocarcinoma Cell of *Taraxaci* Herba. *K.O.M.S.* 1995;16(2):386-413.
 22. Han DS, Chu KM, Kim YI, Lee JS, You IS, Oh IK, Kang KU, Baek SH. Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal Plants(Part 10). The Growth-inhibitory Effect of *Taraxaci* Herba Extract Against Human Skin Melanoma Cells. *J. Toxicol. Pub. Health*. 1998;14(4):489-94.
 23. Baek HY. In Vitro Free Radical Scavenging and Hepatoprotective Activities of *Taraxacum mongolicum*. *Kor. J. Pharmacogn*. 2003;34(4):324-6.
 24. Lee HW, Ma CJ. Neuroprotective Effect of *Taraxacum platycarpum* Extract Against Glutamate-induced Oxidative Stress in HT22 Cells. *Kor. J. Pharmacogn*. 2019;50(2):118-23.
 25. Hong SJ, Choi YJ, Lim HS, Son JB, Jung SS. Effect of herbal dentifrice on dental plaque and gingivitis. *J Korean Acad Dent Health*. 2001;25(4):347-55.
 26. Peng HR. Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 9). Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:433.
 27. Peng HR. Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 3). Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:918, 1055-6.
 28. Peng HR. Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 1). Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:565.
 29. Peng HR. Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 4). Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:447-8.
 30. Herbal Formula Textbook Compilation Committee.

- Herbal Formula Science in Korean Medicine. Paju:Koonja Publisher. 2020:1507-11.
31. Park SM, Lee TH, Zhao R, Kim YS, Jung JY, Park CA, Jegal KH, Ku SK, Kim JK, Lee CW, Kim YW, Cho IJ, An WG, Kim SC. Amelioration of inflammatory responses by Socheongryong-Tang, a traditional herbal medicine, in RAW 264.7 cells and rats. *Int J Mol Med*. 2018;41(5):2771-83.
 32. Upadhyay J, Tiwari N, Ansari MN. Role of inflammatory markers in corona virus disease (COVID-19) patients: A review. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020;245(15):1368-75.
 33. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):6008.
 34. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 2001;159(2):387-97.
 35. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 2003;37(6):355-61.
 36. Ramadan DE, Hariyani N, Indrawati R, Ridwan RD, Diyatri I. Cytokines and Chemokines in Periodontitis. *Eur J Dent*. 2020;14(3):483-95.
 37. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman. Cellular and Molecular Immunology (5th Ed). Philadelphia: Saunders. 2003:25, 282-8, 493, 507.
 38. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989;142(1):144-7.
 39. Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I. Physiology, Acute Phase Reactants. [Updated 2020 May 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570/>
 40. Alam MB, Ju MK, Kwon YG, Lee SH. Protopine attenuates inflammation stimulated by carrageenan and LPS via the MAPK/NF- κ B pathway. *Food Chem Toxicol*. 2019;131:110583.
 41. Wang H, Huang W, Liang M, Shi Y, Zhang C, Li Q, Liu M, Shou Y, Yin H, Zhu X, Sun X, Hu Y, Shen Z. (+)-JQ1 attenuated LPS-induced microglial inflammation via MAPK/NF κ B signaling. *Cell Biosci*. 2018;8:60.
 42. The Korean Society of Pathology. Pathology. Seoul:Koomonsa. 1995:71-104.
 43. Cho YH. Concepts of Human Physiology. Seoul: Bummoon Education. 2011:202.
 44. Park KK. Oral Biochemistry. Seoul:Koonja publishers. 1999:318-25.
 45. Lee SI. Cheonjin Prescription explanation. Seoul: Seongbosa. 1995:23.
 46. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2001;76:119-23.
 47. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69:625-35.
 48. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 2000;28:217-26.
 49. Jeremy S Paige, Samie R Jaffrey. Pharmacologic manipulation of nitric oxide signaling: targeting NOS dimerization and protein-protein interactions. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(1):97-114.
 50. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-6.
 51. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002-12.
 52. Assumpção CR, Brunini TMC, Matsuura C, Resende AC, Mendes-Ribeiro AC. Impact of the L-arginine-Nitric Oxide Pathway and



- Oxidative Stress on the Pathogenesis of the Metabolic Syndrome. *Open Biochem J.* 2008; 2:108-15.
53. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* 1990;144:1425-31.
54. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996;211:24-32.
55. Corbett JA, Mac Daniel ML. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J Exp Med.* 1995;181:559-68.
56. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine.* 1994;6:399-406.
57. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001;13(2):85-94.
58. Williams AJ, Dave JR, Tortella FC. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration. *Neurochem Int.* 2006; 49(2):106-12.
59. Kim MK, Kim DY. Anti-inflammatory Effect of an *Ecklonia cava* Ethanol Extract in Macrophage via Inhibition of the NF- κ B/MAPK Signal Pathways. *J Chitin Chitosan.* 2016;21(4):236-41.
60. Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci.* 2005;77(13):1502-15.
61. Park HY, Han MH, Park C, Jin CY, Kim GY, Choi IW, Kim ND, Nam TJ, Kwon TG, Choi YH. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- κ B, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food and Chemical Toxicology.* 2011;49:1745-52.
62. Kim SM, Park EJ, Kim JY, Choi JH, Lee HJ. Anti-Inflammatory Effects of Fermented Lotus Root and Linoleic Acid in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Cells. *Life (Basel).* 2020; 10(11):E293.
63. Wang C, La L, Feng H, Yang Q, Wu F, Wang C, Wu J, Hou L, Hou C, Liu W. Aldose Reductase Inhibitor Engeletin Suppresses Pelvic Inflammatory Disease by Blocking the Phospholipase C/Protein Kinase C-Dependent/NF-kappaB and MAPK Cascades. *J Agric Food Chem.* 2020; 68(42):11747-57.
64. Rao CV, Verma AR, Gupta PK, Vijayakumar M. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Fumaria indica* whole plant extract in experimental animals. *Acta Pharm.* 2007;57:491-8.
65. Lee JH, Choi YH, Choi BT. The anti-inflammatory effects of 2 Hz electroacupuncture with different intensities on acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Int J Mol Med.* 2005;16:99-102.