

Original Article / 원저

Raw 264.7 세포에서 化毒丹의 항염증 효능에 대한 연구

신기석¹ · 황보민² · 지선영^{2*}

대구한의대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실(¹대학원생, ²교수)

Research of the Anti-inflammatory Effects of Hwadokdan on Raw 264.7 Cells

Ki Seok Shin¹ · Min Hwangbo² · Seon Young Jee^{2}*

Dep. of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, Daegu Hanny University

Abstract

Objectives : The purpose of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of Hwadokdan(HDD) extracted with water.

Methods : We pretreated LPS-activated Raw 264.7 cell with HDD and anti-inflammatory effect of HDD is investigated by measuring NO production, relative iNOS, and TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE₂ productions level, p-I κ B α , I κ B α , NF κ B.

Results : HDD reduced NO production and iNOS protein, TNF- α , IL-6 level at concentration of 100 μ g/ml and 300 μ g/ml in LPS-activated Raw 264.7 cell significantly. There wasn't a significant cytotoxicity in MTT assay. And HDD reduced IL-1 β level at concentration of 300 μ g/ml in LPS-activated Raw 264.7 cell significantly.

HDD reduced p-I κ B α and NF κ B protein level at concentration of 300 μ g/ml in LPS-activated Raw 264.7 cell significantly. And HDD enhanced I κ B α protein level at concentration of 100 μ g/ml and 300 μ g/ml in LPS-activated Raw 264.7 cell significantly.

Conclusions : These suggests that HDD can be used as a therapeutic drug for various inflammatory diseases.

Key words : Hwadokdan(HDD); *Lonicerae Flos*; *Prunellae Spica*; Inflammation; NF κ B.

I. 서 론

化毒丹은 《青囊秘傳》에 기록된 방제로 金銀花, 夏枯草로 구성되며 火熱邪毒이 맺혀 생긴 各種 瘡瘍에 응용할 수 있다고 기록되어 있다¹⁾.

清熱解毒藥에 속하는 金銀花와 夏枯草에 대한 연구로서 문 등²⁾은 金銀花의 flavonoid 성분이 항염증 효과를 가지는 기전에 대해 보고하였고, 서 등³⁾은 夏枯草가 면역 능력을 증강시켜 알레르기 반응에 대한 저감 효과가 있음을 보고하였다. 하지만 아직까지 두 약물이 함께 조합된 化毒丹의 효능에 관한 연구 보고는 없었다. 이에 저자는 化毒丹의 항염증 효능을 입증하고자 본 연구를 시행하였다.

본 실험에서는 LPS로 Raw 264.7 세포에 염증 반응을 유도하고, 化毒丹 열수추출물을 투여하여 세포내 염증반응의 활성화와 염증성 매개 인자들에 미치는 영향을 분석해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 化毒丹 열수추출물(Hwadokdan, HDD)의 제조

化毒丹을 구성하는 본초인 金銀花와 夏枯草는 대원약업사(대구, 대한민국)에서 구입하였다. 化毒丹 열수추출물(HDD)을 얻기 위하여 원방구성의 비율과 동일하게 夏枯草 60g과 金銀花 30g에 물 1.5L를 혼합하여 3시간 동안 대용약탕기로 탕전한 후, 거즈로 탕전액을 여과하고, 여과한 탕전액을 3,000×g에서 3분 동안 원심분리하였다. 원심분리가 된 1차 여과액에서 상층액을 취하여 다시 No.2 filter로 여과하고, 2차 여과액을 진공 회전 농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 이후 초저온 냉동기(Operon, Korea)에서 24시간 이상 동결

하였다. 이것을 동결건조기(LABCONCO, Kansas, MO, USA)에서 동결건조하여 최종적으로 동결건조물 18.05g을 얻었다. HDD의 수율은 20.06%였다. HDD는 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)에 농도별로 녹여 실험에 사용함으로써 세포 배양액 조성의 변화를 최소화하였다.

Table 1. The Composition of Hwadokdan

Herbal Name	Scientific Name	Amount(g)
金銀花	<i>Lonicera Japonica</i>	60
夏枯草	<i>Prunellae Spica</i>	30
Total		90

2. 시약 및 기구

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Griess reagent, LPS(*Escherichia coli* 055:B5)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. 10% Fetal bovine serum(FBS), penicillin, DMEM, streptomycin은 Gibco/BRL(Eggenstein, Germany)사에서 구입하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO)는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 항체는 BD Bioscience(San Jose, CA, USA)사에서 구입하였으며, inhibitory κ Ba($I\kappa$ Ba) 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다. Nuclear factor- κ B(NF κ B) 항체, phospho- $I\kappa$ Ba 항체, lamin A/C 항체, β -actin 항체, peroxidase-conjugated secondary antibody Cell은 Signaling(Danvers, MA, USA)사에서 구입하여 사용하였으며, Automatic ELISA microplate reader(Model Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland) 등의 기기를 실험에 사용하였다.

Corresponding author : Seon Young Jee, School of Oriental Medicine, Daegu Hanny University, 165, Sang-dong, Suseong-gu, Daegu, Korea.
(Tel : 054-271-8005, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr)

•Received 2022/6/30 •Revised 2022/7/22 •Accepted 2022/7/29

3. 세포 배양 및 처치

본 실험의 Raw 264.7 cell은 한국 세포주 은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Raw 264.7 cell은 배양을 위하여 10% FBS, penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml가 함유된 DMEM을 사용하였으며, 세포배양기에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 세포는 80-90% 이상 배양된 경우와 계대배양 횟수가 20회를 넘지 않은 경우만을 실험에 사용하였다.

4. Nitric Oxide 생성량 분석

DMEM 배지에서 HDD를 10-300 μ g/ml의 농도로 전처리한 후, 1시간 후에 LPS를 1 μ g/ml의 농도로 처리하여 18시간 배양하였다. 배양 상등액 50 μ l와 Griess 시약 50 μ l를 96 well transparent flat bottom plate에 함께 넣고 차광하여 10분간 상온에서 반응시킨 후, 이를 Automatic ELISA microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 대비 각 실험군의 NO의 양을 배수로 나타내었다.

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

5. 세포 생존율 분석

DMEM 배지에서 HDD를 10-300 μ g/ml의 농도로 전처리한 후, 1시간 후에 LPS를 1 μ g/ml의 농도로 처리하여 18시간 배양하였다. 각 well plate에 PBS(Phosphate buffered saline)와 0.1mg/ml 농도의 MTT를 혼합하여 50 μ l씩 넣고 4시간 더 배양시켰다. 배양 후에 배지를 조심스럽게 제거하고 생성된 crystal을 DMSO에 용해시켜 Automatic ELISA microplate reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군 세포에 대한 각 실험군의 흡광도를 백분율로 표시하였다.

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

6. Cytokine의 측정

DMEM 배지에서 HDD를 100, 300 μ g/ml의 농도로 전처리한 후 6 well plate에 Raw 264.7 cell을 각 plate 당 5×10^5 cell로 분주하고, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 18시간 후 상등액을 수집하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE₂ 생성량을 ELISA kit(Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 활용하여 측정하였다. 각 cytokine 표준품의 표준곡선에 대입하여 발현량을 pg/ml로 나타내었다.

8. 단백질 발현량 측정

전세포 추출액은 PBS로 cell을 세척하고, 단백질의 정량 변화를 확인하기 위해 첫 번째로 radioimmuno-precipitation(RIPA) buffer(25mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)와 Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)이 섞인 lysis buffer를 세척된 cell에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켰다. 그리고 15,000 \times g로 10분 동안 원심분리하고 상등액을 취한 뒤에 BCA protein assay kit을 사용하여 전세포 추출액의 단백질 함량을 정량하였다. 핵 분획 추출물은 PBS로 cell을 세척한 후 10mM Hepes(pH 7.9), 0.1mM EDTA, 10mM KCl, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% Noridet P-40, 1mM dithiothreitol이 포함된 buffer를 100 μ l 넣고 vortex mixer에 섞어 ice에 10분 동안 두고, 다시 4 $^{\circ}$ C에서 16,000 \times g로 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리가 된 추출액 중에서 세포질 성분이 포함된 상등액은 제거하고 핵이 포함된 침전물에 다시 20mM Hepes(pH 7.9), 1mM EDTA, 400mM NaCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10mM dithiothreitol이 포함된 buffer를 40 μ l 넣은 후 mix하여 ice에서 1시간 두고, 다시 4 $^{\circ}$ C에서 16,000 \times g로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 핵 분획 추출물로서 얻었다. BCA

protein assay kit를 이용하여 핵 분획 추출물의 단백질 함량을 정량하였으며, 실험 시까지 -70°C에 보관하였다. 두 가지 추출액의 단백질 함량을 측정한 이후 동일량의 단백질을 취하여 SDS-PAGE로 전기영동 시킨 후 NC membrane으로 단백질을 옮겼다. 단백질이 옮겨진 NC membrane에 p-IκBα, NFκB, iNOS, β-actin, lamin A/C의 1차 항체와 반응시킨 뒤, 코팅된 표면에 부착되는 것을 방지하기 위해 blocking buffer를 처리한 후, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시켜서 ECL detection reagents(Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)로 단백질의 발현량을 평가하였다. 각 단백질의 발현량은 Image analyzing system(Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 각 단백질의 발현량은 대조군 대비 각 실험군의 배수로 나타내었다.

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

8. 통계 분석

통계 분석은 one way analysis of variance (ANOVA)로 평가하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복한 후 데이터는 mean±S.D.로 나타내었으며, 각 그룹 간의 통계적 유의성은 ANOVA로 분석 후 Dunnett T3 test 또는 Tukey honestly significant difference test로 사후 검정하였다. 신뢰구간 p<0.05 또는 p<0.01을 기준으로 통계적 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. HDD가 NO 생성량에 미치는 영향

HDD의 항염증 효능을 평가하기 위해서 먼저 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 NO의 생성량을 관찰하였다. LPS 처리군에서는 대조군(1.00±0.009)과 비교하여 NO의 생성량이 4.36±0.09배 증가하여 유의한

NO 생성량의 증가를 나타내었다(p<0.01). 이후 HDD 100, 300μg/ml 투여군에서는 각각 1.59±0.10, 1.08±0.01배로 LPS 처리군과 비교하여 유의한 NO 생성량의 감소를 나타내었다(p<0.01)(Fig. 1).

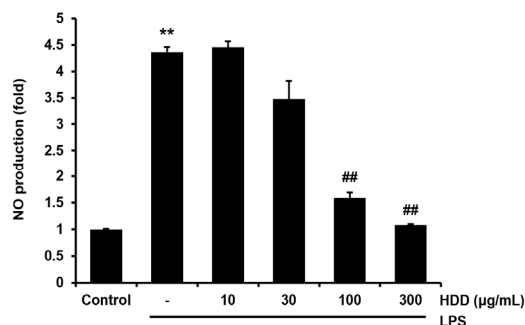


Fig. 1. Effects of HDD on NO Production in LPS-Activated Raw 264.7 Cells.

Raw 264.7 cells were pre-treated with 10-300μg/ml of HDD dissolved in DMEM for 1 hour before the LPS(1μg/ml) treatment, and then the cells were cultivated for 18 hours. The concentration of nitric oxide in medium was assessed as delineated in materials and methods part. Values represent the mean±SD with four separate experiments for each condition. *: vs. control, ** p<0.01, #: vs. LPS alone, ## p<0.01

2. HDD가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell의 세포 생존율에 미치는 영향

NO 생성량 감소가 세포 생존율 저하에 의한 것인지를 확인하기 위하여, HDD와 LPS를 처리하고 18시간 반응시킨 후에 MTT assay로 세포 생존율을 관찰하였다. LPS 처리군에서는 대조군(100.00±2.11%)과 비교하여 68.45±2.38%의 세포 생존율을 나타내었으나 (p<0.01), LPS와 HDD 10-300μg/ml를 처리한 군에서는 각각 69.68±4.34, 73.13±1.34, 81.96±2.74, 82.29±0.64%로 LPS 처리군과 비교하여 유의한 세포 생존율의 저하는 나타나지 않았음을 확인할 수 있었다. HDD의 항염증 효능에 대한 이후의 연구는 NO 생성량 억제 결과와 세포 생존율 결과에 근거하여 HDD 100, 300μg/ml의 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 2).

3. HDD가 iNOS의 발현에 미치는 영향

NO의 생성은 NOS(nitric oxide synthase)에 의거한다. 따라서 대식세포의 iNOS 단백질의 발현에 HDD가 영향이 미치는 것을 확인하기 위하여 전세포 추출액에서 iNOS 단백질의 발현을 관찰하였다. LPS 처리군에서는 iNOS의 발현이 대조군(1.00±1.12)과 비교하여 13.92±0.78배로 유의하게 증가되었으나, HDD

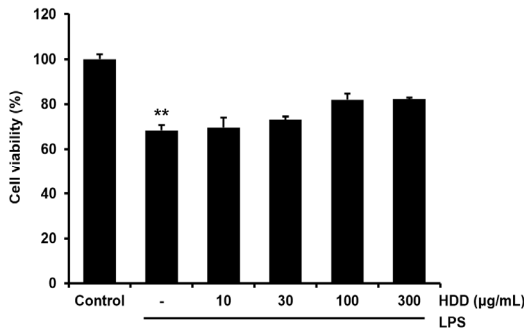


Fig. 2. Effects of HDD on Cell Viability in LPS-Activated Raw 264.7 Cells.

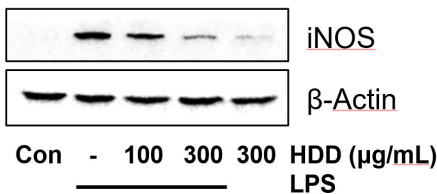
Raw 264.7 cells were pre-treated with 10-300µg/ml of HDD dissolved in DMEM for 1 hour before the LPS(1µg/ml) treatment, and then the cells were cultivated for 18 hours. And MTT solution was treated to the cultivated cells. Values represent the mean±SD with four separate experiments for each condition. *: vs. control, ** p<0.01

100, 300µg/ml 투여군에서는 각각 10.35±0.46배, 3.92±0.49배로 LPS 처리군과 대비하여 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 3).

4. HDD가 전염증성 cytokine의 생성량에 미치는 영향

HDD의 항염증 효능을 확인하기 위해 HDD의 전염증성 cytokine의 생성 억제능을 평가하였다. 본 연구에서는 TNF-α가 무처리 대조군(18.85±7.68pg/ml)에 비해 LPS 처리군에서는 2034.593±89.18pg/ml로 유의하게 증가하였으나, HDD 100, 300µg/ml 투여군에서 1282.03±42.5pg/ml, 511.74±18.68pg/ml로 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 4A). IL-1β는 무처리 대조군(0.98±0.97pg/ml)에 비해 LPS 처리군에서는 218.37±22.03pg/ml로 유의하게 증가하였으나 HDD 300µg/ml 투여군에서는 46.34±3.73pg/ml로 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 4B). IL-6는 무처리 대조군(7.29±0.62pg/ml)에 비해 LPS 처리군에서는 1767.02±26.98pg/ml로 유의하게 증가하였으나, HDD 100µg/ml, 300µg/ml 투여군에서 1099.89±9.31pg/ml, 818.08±24.91pg/ml로 유의하게 감소하

A)



B)

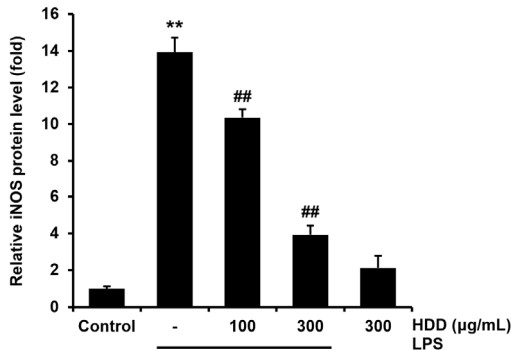


Fig. 3. Effects of HDD on iNOS Expression in LPS-Activated Raw 264.7 Cells.

Raw 264.7 cells were pre-treated with 100, 300µg/ml of HDD dissolved in DMEM for 1 hour before the LPS(1µg/ml) treatment, and then the cells were cultivated for 18 hours. The levels of iNOS protein was assessed as delineated in materials and methods part. (A) β-actin was used as an equal loading control. (B) The relative density level of the protein was measured by scanning densitometry. Values represent the mean±SD with four separate experiments for each condition. *: vs. control, ** p<0.01, #: vs. LPS alone, ## p<0.01

였다($p < 0.01$)(Fig. 4C). PGE_2 는 무처리 대조군 ($791.25 \pm 446.20 \text{ pg/ml}$)에 비해 LPS 처리군에서는 $4423.93 \pm 348.44 \text{ pg/ml}$ 로 유의하게 증가하였으나, $300 \mu\text{g/ml}$ 투여군에서 $3460.68 \pm 146.83 \text{ pg/ml}$ 로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 4D).

5. HDD가 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향

NF κ B는 iNOS, COX-2 및 전염증성 매개 물질을 합성하는 전사 인자로서, 일반적으로 NF κ B inhibitory protein(I κ B α)과 세포질에서 결합되어 있어서 NF κ B의 작용이 억제된다⁴⁾. LPS에 의해서 염증 신호가 활성화되면 I κ B α 가 인산화되고, NF κ B는 핵으로 전위(translocation)되어 다양한 염증 매개 물질의 RNA를 전사한다. HDD의 염증 억제능이 NF κ B 신호 회로의 조절에 의한 것인지 확인하기 위하여 세포질에서 I κ B α

의 발현 수준과 세포핵 안에서의 NF κ B 단백질 발현 및 p-I κ B α 의 발현 수준을 측정하였다. 본 연구의 결과 I κ B α 의 발현은 무처리 대조군(1.00 ± 0.04)에 비해 LPS 처리군에서는 0.23 ± 0.01 배로 유의하게 감소되었으나, HDD 100, $300 \mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 0.71 ± 0.14 , 0.89 ± 0.04 배로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$)(Fig. 5A, B). p-I κ B α 의 발현은 무처리 대조군(1.00 ± 0.42)에 비해 LPS 처리군에서는 2.69 ± 0.28 배로 유의하게 증가되었으나, HDD $300 \mu\text{g/ml}$ 투여군에서 1.40 ± 0.30 배로 유의하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 5C). 핵내에서의 NF κ B의 발현은 무처리 대조군(1.00 ± 0.25)에 비해 LPS 처리군에서는 4.69 ± 0.56 배로 유의하게 증가되었으나, HDD $300 \mu\text{g/ml}$ 투여군에서 3.14 ± 0.39 배로 유의하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 5D, E).

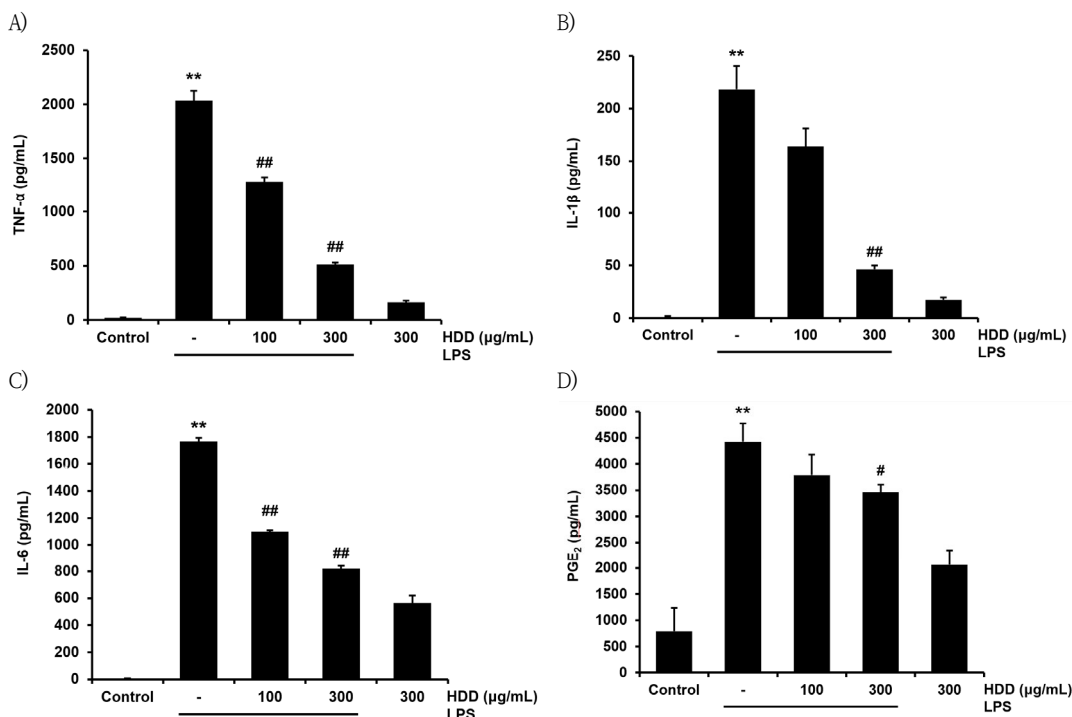


Fig. 4. Effects of HDD on Cytokine Production in LPS-Activated Raw 264.7 Cells.

Raw 264.7 cells were pre-treated with 100, $300 \mu\text{g/ml}$ of HDD for 1 hour before the LPS($1 \mu\text{g/ml}$) treatment, and then the cells were cultivated for 18 hours. The amount of (A)TNF- α , (B)IL-1 β , (C)IL-6, (D)PGE $_2$ was measured by ELISA kit. Values represent the mean \pm SD with three separate experiments for each condition. * vs. control, ** $p < 0.01$, # vs. LPS alone, ## $p < 0.01$

IV. 고찰

化毒丹은 金銀花, 夏枯草로 구성된 방제로 《青囊祕傳》에 기록되어 있다. 金銀花 二兩과 夏枯草 四兩을 곱게

가루 내어 꿀로 반죽하고 환을 만들어서 매번 3錢씩 복용하며, 清熱解毒의 효능이 있어 熱毒을 풀기 때문에 각종 창양에 사용된다고 기록되어 있다¹⁾.

化毒丹의 구성 약물 중 金銀花(*Lonicerae Flos*)는 주

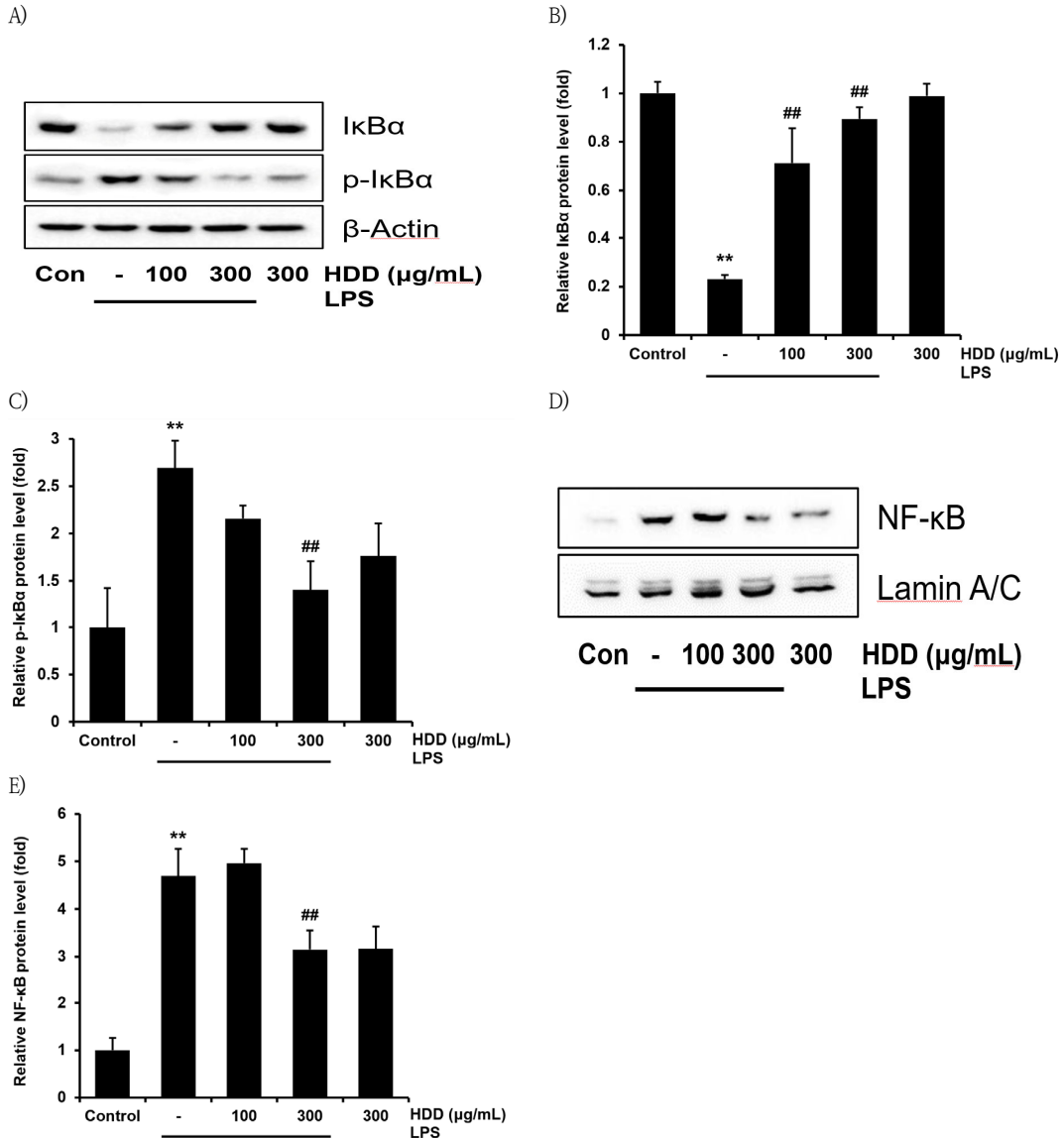


Fig. 5. Effects of HDD on $I\kappa B\alpha$, $p-I\kappa B\alpha$ and $NF\kappa B$ Expression in LPS-Activated Raw 264.7 Cells. Raw 264.7 cells were pre-treated with 100, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HDD dissolved in DMEM for 1 hour before the LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment, and then cultivated for 30($I\kappa B\alpha$) or 60($p-I\kappa B\alpha$, $NF\kappa B$) minutes. (A, D) β -actin and Lamin A/C were used as an equal loading control. (B, C, E) The relative density level of the $I\kappa B\alpha$, $p-I\kappa B\alpha$ and $NF\kappa B$ was measured by scanning densitometry. Values represent the mean \pm SD with four separate experiments for each condition. *: vs. control, ** $p < 0.01$, #: vs. LPS alone, ## $p < 0.01$

로 涼散風熱의 효능을 가지기 때문에 丹毒과 같은 화농성 피부 염증에 활용된다⁵⁾. 金銀花의 생화학적 성분으로는 saponin과 더불어 luteolin, tannin 등이 있으며, flavonoid 계통인 luteolin이나 saponin같은 성분들이 항염 작용과 항균 작용이 있다고 알려져 있다⁶⁾.

최근까지 金銀花에 대한 연구로 이 등⁷⁾은 金銀花 전초의 열수추출물이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 사이토카인을 감소시키고, iNOS, NO 생성량 및 NF κ B 발현의 억제에 유의한 효과를 나타냄을 보고하였으며, 윤 등⁸⁾은 金銀花 전초의 열수추출물과 에탄올추출물이 LPS로 유도된 NO 생성량과 PGE₂ 생성량을 유의하게 감소시켰다는 것을 비교 분석하였고, 정 등⁹⁾은 대뇌 신경세포인 C6 glioma cell에 金銀花 추출물을 투여한 결과, 치매를 유발하는 염화알루미늄의 세포독성을 감소시켰으며, DPPH-라디칼 소거능과 같은 항산화 효과를 가지는 것을 보고하였고, 임 등¹⁰⁾은 金銀花 약침을 쥐와 사람의 암성 세포에 처리하여 세포수가 감소되는 것을 *in vitro*에서 확인하였고, mouse에게 金銀花 약침을 처리하여 GOT, ALP-S 등의 활성도가 감소함을 확인하여 金銀花 약침이 간과 골세포, 심폐 기관의 기능 향상에 영향을 주었다고 *in vivo*에서 확인하였다.

化毒丹을 구성하는 다른 약재인 夏枯草(*Prunellae Spica*)는 清熱瀉火하는 효능이 있어 清火, 消腫하기 때문에 화농성 피부 질환 및 癰癤, 癰瘤 등의 腫瘍疾患을 치료한다¹¹⁾. 夏枯草의 생화학적 구성 성분으로는 ursolic acid, saponin, rutin, 그리고 tannin 등의 생리활성 물질이 존재하며, 항염증 효능을 가지고 있다고 알려져 있다^{12,13)}.

최근까지 夏枯草에 대한 연구로 차 등¹⁴⁾은 夏枯草 열수추출물을 쥐의 대식세포에 처리했을 때 NO 및 염증 매개 인자들의 증가를 촉진해서 면역 능력 향상에 영향을 주는 것을 보고하였으며, 허 등¹⁵⁾은 夏枯草 추출물 처리가 대식세포에서 염증 매개 인자의 분비 증가를 촉진시켜 항염증 효능이 대장암 세포에서 종양 전이 억제 효과를 유도하는 것을 보고하였고, 김 등¹⁶⁾은 夏枯草 추출물이 3T3-L1, HepG2 세포에서 지방세포 분화를 억

제하여 항비만 효과를 가지며, 에탄올로 인한 세포독성을 보호하여 항산화 효과를 가지는 것을 확인하였다.

위와 같이 化毒丹을 구성하는 金銀花와 夏枯草의 효능에 대한 연구는 각각 다양하게 진행되고 있으나, 化毒丹에 대한 연구는 여태까지 없었기에 이에 본 연구에서는 化毒丹 열수추출물이 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 염증 매개 물질들의 생성량 변화를 조사하여 化毒丹의 항염증 효능을 살펴보고자 하였다.

염증 반응은 정상 범위에서 벗어나는 손상이나 감염 등의 자극이 발생할 때 손상 부위를 복구하려는 방어 기전이다¹⁷⁾. LPS는 그람 음성균 세포막의 구성 성분으로 대식세포에 자극이 가해지면 전염증성 매개 물질인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 등을 분비시킨다¹⁸⁾. 이러한 염증 촉진성 매개 물질의 자극으로 대식세포는 활성화되고¹⁹⁾, 염증 반응의 전사 인자인 NF κ B를 활성화하여 그 결과 발현된 iNOS에 의해 NO가 생성되고, COX-2에 의해 PGE₂가 생성되어 염증반응이 유발된다²⁰⁾.

정상적인 염증은 시간이 지나면 염증 촉진성 매개 물질의 생성은 줄고, 항염증성 매개 물질은 늘어나서 스스로 염증 반응이 제한된다²¹⁾. 그렇지만 염증 매개 물질이 과량 생산되면 염증 반응은 끝나지 않고 이것은 염증성 질환을 악화시킨다. 따라서 염증 매개 물질을 억제하는 본초 및 방제를 발견한다면 여러 가지 염증성 질환의 치료에 도움이 될 것이며, 본 연구에서는 항염증 효능이 있을 것으로 생각되는 HDD를 다음의 기준에 준하여 평가하였다.

HDD의 항염증 효과를 확인하기 위해 첫 번째로 NO 생성량 억제 효과를 관찰하였다. NO는 NOS에 의해서 L-arginine으로부터 생성되며, NOS는 inducible NOS(iNOS)와 constitutive NOS(cNOS)로 나누어진다. 특히 iNOS는 LPS와 같은 외부 자극이나 전염증성 매개 물질 등을 통해 NO를 생산한다. 과량의 NO는 혈관 투과성을 증가시키고 부종 등의 염증 반응을 유발한다고 보고되고 있다²²⁾.

LPS를 처리한 Raw 264.7 cell에서 NO의 생성량은 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였으나, HDD의 투

여는 100, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 LPS로 인한 NO 생성량 증가를 유의하게 감소시켰으며, HDD를 전처리하고 LPS를 처치한 대식세포에서 유의한 세포독성은 나타나지 않았다.

또한 NOS가 NO를 생성하기 때문에, LPS로 인한 iNOS의 발현에 HDD가 미치는 영향을 평가하였다. 본 연구에서 LPS 처치를 한 군에서는 iNOS의 발현이 유의하게 증가되었으나, HDD 투여군에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의하게 감소하였다. 이러한 연구결과는 HDD가 iNOS의 발현을 억제하여 NO의 생성을 억제함을 나타낸다.

LPS는 대식세포의 TLR(Toll like receptor)와 결합하여 전염증성 매개 물질인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등을 분비하게 하며 이것은 염증 반응을 유발해 인체에 악영향을 미칠 수 있다^{23,24}. 그중 TNF- α 는 호중구를 활성화시키고, 시상하부에서 체온 조절 중추에 작용하여 체온을 올리고, 여러 세포에서 세포사멸을 유도한다. 체내에 순환하는 IL-1의 대부분인 IL-1 β 는 염증 자극이 발생했을 때 숙주의 염증 반응과 관련된 염증성 매개체로 작용하며, 활성화된 단핵 식세포에서 다량 분비된다. 대식세포, T 세포, 내피세포에서 주로 분비되는 IL-6는 B cell을 활성화하여 항체의 생성을 촉진한다²⁵.

본 연구에서 LPS 처치 시 TNF- α , IL-1 β , IL-6가 유의하게 증가하였으나, HDD 투여군에서는 100, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 증가된 TNF- α 와 IL-6가 유의하게 감소하였으며, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 증가된 IL-1 β 가 유의하게 감소하였다.

세포막 인지질의 구성 성분인 arachidonic acid는 세포질 내로 유리되어 leukotriene이 된 후 cyclooxygenase(COX)에 의해서 산화되어 prostaglandin이 생성된다. COX에는 두 종류의 동종효소가 존재하는데, 그중 COX-2는 염증 자극이 있을 때 생성되고 PGE₂를 생성하여 염증 반응을 유도한다²⁶. 본 연구에서 LPS에 의해 유도된 PGE₂의 생성량을 HDD 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 투여군에서 유의하게 감소시켰다.

염증 반응의 전사 인자인 NF κ B는 세포질에서

inhibitory kappa B 단백질과 결합하여 불활성 상태로 되어 있다. LPS에 의한 자극 등이 대식세포에 가해지면 NF κ B가 I κ B α 로부터 분리되고, I κ B α 가 인산화되면서 NF κ B는 핵으로 전위되어 염증성 매개체의 유전자를 발현시킨다²⁷.

본 연구에서는 I κ B α 와 p-I κ B α 의 발현 및 NF κ B의 발현을 평가하였다. LPS 처치 시에 전세포 추출액에서 I κ B α 는 유의하게 감소하였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 HDD 투여군에서는 유의하게 증가하였고, LPS 처치 시에 p-I κ B α 는 유의하게 증가하였으나, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 HDD 투여군에서는 유의하게 감소하였다. 그리고 LPS 처치 시에 핵 분획에서 NF κ B가 유의하게 증가하였으나, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 HDD 투여군에서는 유의하게 감소하였다. 이러한 연구 결과는 HDD가 I κ B α 의 인산화를 억제하며, NF κ B가 I κ B α 와 분리되어 활성화되는 것을 막고, 따라서 NO, cytokine 등 염증 매개 물질의 발생을 억제함을 나타낸다.

본 연구는 化毒丹이 임상적으로 염증성 질환에 활용될 수 있음에 대하여 *in vitro* 수준에서 항염증 효과와 그 기전을 제시하였다. 그러나, 化毒丹이 清熱解毒藥인 金銀花와 夏枯草의 배합이므로, 化毒丹이 金銀花 또는 夏枯草 단독 약물의 항염증 작용에 비하여 상승효과가 존재하는지, 최적의 배합 비율은 어떻게 되는지 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 NF κ B 염증 전달 경로 외에 다른 염증 매개 인자의 영향에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 Raw 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 HDD의 항염증 효능을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HDD는 유의한 NO 생성 저해능을 보였다. 유의한 세포독성은 나타나지 않았다.
2. HDD는 iNOS 발현을 유의하게 감소시켰다.

3. 100, 300 μ g/ml 농도의 투여군에서 증가된 TNF- α , IL-6가 유의하게 감소하였으며, 300 μ g/ml 농도의 투여군에서 증가된 IL-1 β , PGE₂가 유의하게 감소하였다.
4. 100, 300 μ g/ml의 농도의 투여군에서 감소된 I κ B α 단백질의 발현이 유의하게 증가되었으며, 300 μ g/ml의 농도의 투여군에서 증가된 p-I κ B α 와 NF κ B 단백질의 발현이 유의하게 감소되었다.

이러한 결과로 보아 HDD는 Raw 264.7 세포에 작용하여 I κ B α 의 인산화를 억제하고 NF κ B의 활성을 억제하여 NO와 TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE₂의 발생을 억제하고 LPS로 유발되는 Raw 264.7 세포의 염증성 작용들을 저해하여 항염증 효능을 나타냄을 확인할 수 있다.

ORCID

Ki Seok Shin

(<https://orcid.org/0000-0003-1360-7592>)

Seon Young Jee

(<https://orcid.org/0000-0002-3240-9949>)

Min Hwangbo

(<https://orcid.org/0000-0003-0890-5157>)

References

1. Jeon DH. Silyongjunguidaeyakbang. Beijing: People's Medical Publishing House. 1999: 699,700.
2. Moon TC, Park JO, Chung KW, Son KH, Kim HP, Kang SS, et al. Anti-inflammatory Activity of the Flavonoid Components of Lonicera japonica. Yakhak Hoeji. 1999;43(1):117-23.
3. Seo BI, Kim SH. The effects of Prunellae Spica on immune response and anti-allergic

reaction. The Korea Journal of Herbology. 1997;12(1):7-18.

4. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga Ecklonia Kurome. J Antimicrob Chemother. 2002;50:889-93.
5. Ahn SH, Kim HH. Lonicera Japonica Inhibits Atopy Dermatitis in NC/Nga Mouse through Regulation of iNOS by NF- κ B Suppression. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2010;24(2):278-83.
6. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Hung YP, et al. A flavonoid glycoside isolated from Smilax china L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. J Ethnopharmacol. 2007;113(1):115-24.
7. Lee DE, Lee JR, Kim YW, Kwon YK, Byun SH, Shin SW, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Inducible Nitric Oxide Synthase, TNF- α , IL-1 β and COX-2 Expression by Flower and Whole Plant of Lonicera japonica. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2005; 19(2):481-9.
8. Yun KJ, Lee EY. Effects of Hot Aqueous and Ethanol Extract from Lonicera japonica Flos on NO and PGE₂ in Macrophage. Journal of Korean acupuncture & moxibustion medicine society. 2012;29(1):67-74.
9. Jung JY, Jung IJ, Jekal SJ. The Protective Effect of Lonicerae flos Extract on Cultured C6 Glioma Cells Damaged by Aluminum of Dementia Inducer. Korean Journal of Clinical Laboratory Science. 2017;49(3):

- 271-8.
10. Kim JW, Lim JK. Antitumor Activity and Organ-Toxicity of Lonicerae flos Aqua-Acupuncture Solution. Journal of Korean acupuncture & moxibustion medicine society. 1999;16(1):255-67.
 11. The Whole Korean medicine Bonchohak professor Coedition. Bonchohak. Seoul: Yeonglimsa. 2004:211,212.
 12. Kim JS, Lee JY, Park KT, An BJ, Lee SH, Cho YJ. The Biological Activity from *Prunella vulgaris* Extracts. Korean Journal of Food Preservation. 2013;20(2):234-41.
 13. Ko IJ, Yoo SJ, Lee EB. Pharmacological Studies on *Prunellae Herba* and *Thesii Herba* (I) -On Antiinflammatory Activity-. Kor J Pharmacogn. 1986;17(3):232-41.
 14. Cha JH, Kim YS, Lee EM. Effects of *Prunellae Spica* Water Extract on Immune Response in Macrophage Cells. The Journal Of Oriental Gynecology. 2010;23(3):91-100.
 15. Heo JK, Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Effect of *Prunellae Spica* Extracts on Anti-tumor Metastasis by Immune Activity. The Journal Of Oriental Gynecology. 2009;22(1):41-52.
 16. Kim NS, Shon MS, Kim GN, Hwang YI. Anti-obese and Antioxidant activities of *Spica prunellae* Extract in 3T3-L1 and HepG2 cells. Food engineering progress. 2014;18(4):413-8.
 17. Park MJ, Kim JS, Lee AR, Roh SS, Kwon OJ, Seo YB. Inhibition of Inflammation by Kyeongok-go with Black ginseng in LPS-induced Raw 264.7 Macrophages. The Korea Journal of Herbology. 2017; 32(3):19-27.
 18. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, et al. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in Raw 264.7 cells. The Korea Journal of Herbology. 2013;28(2):67-73.
 19. Seo SW. The anti-inflammatory effect of *Portulaca oleracea* 70% EtOH Extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in Raw 264.7 cells. The Korea Journal of Herbology. 2015;30(6):33-8.
 20. Jang JY, Park GH. Anti-inflammatory effect of seed oil of *Schisandra chinensis* in the LPS-treated Raw 264.7 macrophages. The Korea Journal of Herbology. 2015;30(6): 77-82.
 21. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2002;2(10):787-95.
 22. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. Curr Med Chem. 2010;17(28): 3262-88.
 23. Posadas I, Terencio MC, Guillen I, Ferrandiz ML, Coloma J, Paya M, et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000;361: 98-106.
 24. Cetkovic-Cvrlje M, 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.
25. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th Ed. Philadelphia: Saunders. 2003;25,243-55,282-8,493,507.
 26. Jang SI, Jun CS, Kwak KC, Bae MS, Lee JH, Kim KY, et al. Evaluation of Korean Phytomedicinal Plants on inhibition of Prostaglandin E₂(PGE₂) Production and Cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated U937 Cells. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2006;20(2):455-9.
 27. Kim MS, Jeong JS, Lee HY, Ju YS, Bae GS, Seo SW, et al. The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on Lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages. The Korea Journal of Herbology. 2011;26(2):51-7.