

Original Article / 원저

湯火止痛散의 NF- κ B 및 MAPK 억제를 통한 항염증 효과

고민정¹ · 지선영² · 황보민²

우보한의원 창원점(¹원장)

대구한의대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실(²교수)

Anti-inflammatory Effects of Tanghwajitong-san through Inhibition of NF- κ B and MAPK

Min Jung Ko¹ · Seon Young Jee² · Min Hwangbo²

¹Woobo Korean Medical Clinic Changwon Branch

²Dep. of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, Daegu Hanny University

Abstract

Objectives : The purpose of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of Tanghwajitong-san (THJTS) through inhibition of NF- κ B and MAPK.

Methods : We evaluated cell survival rate by MTT assay, NO production by nitrite content in the culture medium. We quantified TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂ of the cultured supernatant by ELISA. And we evaluated the effect of THJTS on protein expression of NF- κ B, MAPK, iNOS and COX-2 by Western blot analysis. THJTS ameliorates LPS-activated alterations in protein expression of NF- κ B, p-38, iNOS and COX-2 and production of NO, pro-inflammatory cytokines and PGE₂. Also, THJTS ameliorates LOX, PGN and FLA-activated alterations in protein expression of NO, iNOS. THJTS ameliorates only PGN-activated alterations in protein expression of COX-2.

Results : THJTS ameliorates LPS-activated alterations in protein expression of NF- κ B, p-38, iNOS and COX-2 and production of NO, pro-inflammatory cytokines and PGE₂. Also, THJTS ameliorates LOX, PGN and FLA-activated alterations in protein expression of NO, iNOS. THJTS ameliorates only PGN-activated alterations in protein expression of COX-2.

Conclusions : This study can provide scientific evidence for the anti-inflammatory effects and underlying mechanisms of THJTS.

Key words : Tanghwajitong-san; *Angelicae Gigntis Radix*; *Rhei Rhizoma*; Inflammation; NF- κ B; MAPK

I. 서 론

화상은 오래전부터 발생률과 사망률이 굉장히 높은 질환으로, 상처나 후유증으로 개인의 사회생활에 치명적인 지장을 주고 있다¹⁾. 화상은 침범 깊이에 따라서 1, 2, 3도 화상으로 나누는데, 1도 화상은 피부의 손상이다. 2도 화상 중 표재성 화상은 상부진피까지 침범하고, 심재성 화상은 하부진피까지 손상된다. 3도 화상은 진피 및 피하지방까지 손상된 경우이다²⁾. 화상은 《肘後備急方》에서 “燙火灼傷 用年久石灰敷之, 或加油調.”라며 최초로 기재되었다³⁾. 화상의 증상은 가벼운 경우 皮膚臭爛, 成瘡 등 肌膚症狀이 나타나고, 심하면 煩燥 口乾, 昏憤而悶絕, 神昏氣喘, 死亡의 內傷症狀이 나타난다. 이 중 皮膚臭爛, 成瘡 등의 肌膚症狀은 피부에 생긴 염증에 의해서 나타나는 대표적인 증상들로, 화상의 분류상 표재성 2도 화상에 해당한다^{2,4)}.

湯火止痛散은 明代, 張介賓이 편찬한 《景岳全書》 卷六十四 출전의 방제로, 大黃(末, 微炒), 當歸(末) 各等分으로 구성되어 있으며, 大黃과 當歸를 가루내어 상처 부위에 발라서 사용하거나 참기름에 섞어서 화상에 사용한다⁵⁾. 湯火止痛散은 當歸와 大黃의 가루를 참기름에 섞어 첩부하는 방식으로 쓰이는 외용제이나, 當歸와 大黃은 散劑나 湯劑로 내복하여서도 湯火傷을 치료하는 다빈도 약제이다⁴⁾.

湯火止痛散의 구성 약물인 大黃에 대한 연구로는 항균 작용, 항염 작용, 항산화 작용, 항암 작용 등의 약리 작용에 대한 연구들이 있고⁶⁻⁹⁾, 當歸에 대한 연구로는 항염증 작용, 항균 작용, 항산화 작용, 항암 작용, 항당뇨 효과 등의 약리 작용에 대한 연구들이 있다¹⁰⁻⁴⁾. 이처럼 大黃, 當歸 단일 약제에 대한 연구들은 많이 있으나, 湯火止痛散에 대한 연구는 현재까지는 전무하다.

본 연구에서는 湯火止痛散은 외용제로 사용되는 처방

이나, 각 구성 약물의 기존 연구에 근거하여 내복약으로서의 가능성이 있다고 판단되어⁴⁾, 湯火止痛散 물 추출물(THJTS)을 Raw 264.7 cell에 처리하여, lipopolysaccharide(LPS)에 의해서 활성화된 염증 매개 물질의 발현 억제 여부를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 湯火止痛散 물 추출물(THJTS)의 제조

湯火止痛散을 구성하는 약재인 大黃, 當歸는 대원약품사(대구, 대한민국)에서 구매하여, 물 1.7L에 각각 100g씩 넣은 후, 3시간 동안 추출하였다(Table 1). 이후에 湯火止痛散 물 추출물을 거즈로 1차 여과한 후, 이 여과액을 3,000×g에서 3분간 원심분리하였다. 이후 상층액을 취하여 0.2µm 여과지(Nalgene, New York, USA)로 여과한 후, 여과액을 Rotary evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 湯火止痛散 농축액은 24시간 이상 초저온냉동기(Operon, Gimpo, Korea)에서 동결한 후, 그 동결액을 동결건조기(LABCONCO, Kansas, MO, USA)에 넣어 동결건조하였다. 최종적으로 건조물 71.82g을 얻었고, 사용할 때까지 냉동고에 보관하였다. THJTS의 수율은 35.91%였으며, in vitro 처치에서는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 녹여서 농도에 맞게 하였다.

Table 1. The Composition & Amount of Tanghwajitong-san

Herbal Name	Scientific Name	Amount (g)
當歸	<i>Angelicae Gigntis Radix</i>	100
大黃	<i>Rhei Rhizoma</i>	100
Total		200

2. 시약 및 기구

Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 LPS(Esc

Corresponding author : Min Hwangbo, School of Oriental Medicine, Daegu Hanny University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, Korea.
(Tel : 053-770-2101, E-mail : dubo97@dhu.ac.kr)
•Received 2023/1/16 •Revised 2023/1/31 •Accepted 2023/2/7

herichia coli 055:B5, Difco, Detroit, MI, USA)와 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)를 구입하였다. Invivogen사(Toulouse, France)에서 Loxoribine(LOX), Peptidoglycan(PGN), Flagellin(FLA)을 구입하였다. DMEM과 streptomycin, penicillin, Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco/BRL(Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. 그리고 (주)純粋化學(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 dimethylsulfoxide(DMSO)를 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 (p-I κ B α), anti-nuclear factor- κ B(NF- κ B), mitogen-activated protein kinase(MAPK)s(anti-phospho-c-Jun N-terminal kinase(JNK), anti-phospho-p38, anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase(ERK)), peroxidase-conjugated secondary antibody 및 anti- β -actin, anti-lamin A/C는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)으로부터 구입하였다. Griess reagent system은 Promega(Madison, WI, USA)로부터 구입하였고, Tumor Necrosis Factor(TNF)- α 와 interleukin(IL)-1 β 및 IL-6의 cytokine은 ELISA kit를 Pierce endogen(Rockford, IL, USA)에서 구입하여 사용하였고, nitrocellulose(NC) paper는 Schleicher & Schuell(Dassel, Germany)에서 구입하였다.

Ultra performance liquid chromatography(UPLC) column은 ACQUITYTM BEH C18 column(1.7 μ m, 2.1 \times 100, Waters사)을 사용하였으며, UPLC는 Waters사의 ACQUITYTM photodiode array detector(PDA)와 Waters사의 ACQUITYTM ultra performance LC system(USA)을 사용하였고 software는 Empower를 사용하였다.

또한, UPLC에 필요한 시료 추출에는 Branson사의 ultrasonic cleaner 8210R-DHT 추출기를 사용하였다. 분석에 사용된 3차 증류수와 아세토니트릴(UPLC

용)은 JT Baker(Phillipsburg, NJ, USA), methanol(UPLC용)은 Junsei Chemical Co., Ltd.(Tokyo, Japan)를 사용하였다. 실험에 사용된 표준품 중 Decursin은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, Decursinol, Ferulic acid, Sennoside A와 Rhein은 ChemFaces사(China)에서 구입하여 사용하였다.

3. Raw 264.7 cell 배양 및 처리

설치류의 대식세포주인 Raw 264.7 cell은 한국세포주연구재단(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 그리고 세포배양액은 DMEM에 10%의 FBS, 100 μ g/ml의 streptomycin, 100U/ml의 penicillin을 혼합한 배지를 사용하였다. 그리고 세포배양기(Sanyo, Japan)의 배양조건은 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C를 유지하였다. 모든 세포는 실험과정에서 세포배양 dish의 면적에 80-90% 이상 배양되었을 때 실험을 하였고, 계대배양 횟수는 20회를 넘지 않은 cell만 사용하였다.

4. 湯火止痛散 물 추출물(THJTS) 성분 분석

湯火止痛散 시료의 정량에 사용된 표준품은 탕제를 구성하는 약재인 當歸에서 Decursin, Decursinol, Ferulic acid와 大黃에서 Sennoside A와 Rhein을 지표로 선정한 후, 분석을 진행하였다.

위의 표준품들을 정밀하게 계량하여, 각각 Methanol에 녹여서 1mg/ml인 표준원액을 만들었다. 이후 위 표준원액 적정량을 취하고, Methanol로 ml당 12.5, 25, 50, 100 μ g의 함유되게 희석하여 표준액으로 하였다.

표준곡선의 결정계수(R²) 값은 위 표준물질 모두에서 0.999 이상이었다. 정량용 검액은 동결건조 시료를 균질하게 혼합하여 0.1g을 정밀히 칭량하고, 70% Methanol 10ml을 첨가한 후, 1시간 동안 초음파 추출한 후, 그 검액을 공경 0.22 μ m의 멤브레인 필터로 여과하여 검액으로 하였다.

고성능 액체크로마토그래피(UPLC)는 Waters ACQUITYTM ultra performance LC system(USA)과 Wat

ers ACQUITY™ BEH C18 column(1.7µm, 2.1×100)을 사용하였고, column의 온도는 실온에서 분석하였다. PDA의 분석 파장은 Decursin과 Decursinol은 330nm, Ferulic acid는 280nm, Sennoside A는 340nm, Rhein은 254nm에서 분석하였다. 이동상으로는 물과 0.1% Formic acid를 함유한 아세토니트릴의 혼합액을 사용하였고, 아래의 조건으로 분석하였다. 시료는 2µl를 주입하였고, 유속은 0.4ml/min이었다. 분석 결과로, 머무름 시간으로 정성확인을 하였으며, 피크면적법으로 정량하였다(Table 2).

5. NO의 생성량 측정

Griess 시약을 이용하여 Raw 264.7 cell에서 생성된 NO의 양을 측정하였다. Griess시약(1% α-naphthylamide in H₂O + 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) 50µl와 각 실험군의 세포배양 상등액 50µl를 96 well plate에 잘 혼합한 후, 암실에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 540nm에서 microplate reader (Model: Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 control군에 대한 각 실험군의 fold로 나타내었다.

$$\text{NO production(fold)} = \frac{\text{absorbance of experimental group}}{\text{absorbance of control group}}$$

6. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cell을 24 well plate에 5×10⁴cell/well로 분주한 다음 THJTS를 10-300µg/ml로 처치하였다, 그 후 LPS를 처치한 후 5% CO₂, 37°C의 조건을 유지시킨 배양기에서 18시간 배양하고 나서 세포 생존율을 구하였다. 즉, 배양 후 4시간 동안 24 well plate에 well 당 MTT(0.1mg/ml) 200µl를 넣고 추가 배양하였다. 생존세포의 미토콘드리아에 MTT가 작용하여 암자색의 formazan을 형성한다. 배양한 후 배지 well 바닥의 세포에 압력이 가해지지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. 생성된 보라색의 formazan crystal을 DMSO에 녹여 microplate reader(Model: Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control군에 대하여 각 실험군의 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell survival rate (\% control)} = 100 \times \frac{\text{absorbance of experimental group}}{\text{absorbance of control group}}$$

7. 단백질 발현 측정

THJTS와 LPS의 처치가 종료된 Raw 264.7 cell은 관찰하고자 하는 단백질에 따라 핵 분획 추출물(nuclear fraction)과 전세포 추출액(whole cell lysate)을 분리한 후, 다음의 방법으로 분리하였다.

Table 2. Solvent Grade Conditions for UPLC-PDA Analysis

Time(min)	0	1.0	2.0	4.0	6.0	9.0	13.0	14.0	15.0	16.0
0.1% FA/water (%)	98	98	90	70	50	30	10	1	98	98
0.1% FA/acetonitrile (%)	2	2	10	30	50	70	90	99	2	2
Flow rate (ml/min)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40

먼저, 전세포 추출액은 처치가 종료된 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 150mM NaCl 및 25mM Tris-HCl(pH 7.6), 1% NP-40, phosphatase inhibitor cocktail과 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate(SDS), Halt protease를 포함한 radioimmunoprecipitation(RIPA) buffer(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 첨가하고, 30분 동안 4°C에서 반응시키고 15,000×g에서 10분 동안 원심분리한 후, 상등액을 취하였다. 이 상등액을 전세포 추출액으로, 단백질 함량을 정량하기 위해 BCA protein assay kit를 이용하였다.

핵 분획은 세포를 ice-cold PBS로 세척하고, KCl 10mM 및 Hepes(pH 7.9) 10mM, dithiothreitol 1mM, EDTA 0.1mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.5mM과 0.5% Noridet P-40을 함유한 완충액을 100 μ l 넣어 vortex하고 10분 동안 ice에 방치한 후, 5분 동안 4°C에서 16,000×g로 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 제거하고 핵이 포함되어 있는 침전물에 Hepes(pH 7.9) 20mM, NaCl 400mM, dithiothreitol 10mM, EDTA 1mM과 phenylmethylsulfonyl fluoride 1mM로 구성된 완충액을 40 μ l 넣었다. 그다음 현탁시켜 ice에서 1시간 방치한 후 10분 동안 4°C에서 16,000×g로 원심분리하여 상등액을 핵 분획물로 얻었다. 핵 분획은 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질 함량을 정량하고, 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

핵 분획 및 전세포 추출액의 단백질 함량을 측정하고 동일량의 단백질을 취하여 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법(SDS-PAGE; sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)으로 전기영동시킨 후에 nitrocellulose(NC) membrane으로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 NC membrane에 iNOS, NF- κ B, I- κ B α , p-I- κ B α , Lamin A/C 및 β -actin의 1차 antibody와 반응시키고, blocking, washing 과정을 거친 후, 단백질의 발현을 가시화하기 위하여 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시켜서

Amersham Biosciences사(Piscataway, NJ, USA)의 ECL detection reagents로 발색하였다. 각 단백질의 발현량은 Image analyzing system(Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용해서 계량화하였고, 각 단백질의 발현량은 control군 대비 각 실험군의 fold로 나타내었다.

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

8. Cytokine 및 PGE₂ 측정

Raw 264.7 cell을 6 well plate에 5×10⁵cell/ml를 분주하고 배양한 후, THJTS를 100, 300 μ g/ml의 농도로 처치하였다. 그리고 1시간 후에 LPS 1 μ g/ml를 처치하였으며, 그 후 18시간 만에 배지를 회수하여 cytokine을 측정하였다.

TNF- α , IL-1 β , IL-6는 Pierce endogen의 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. PGE₂ 함량은 PGE₂ assay kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 분석하였다. cytokine 및 PGE₂의 표준품마다 7개의 농도를 측정하여 표준곡선을 얻었고, 발현량은 표준곡선에 대입하여 pg/ml로 나타내었다.

9. 실험동물 및 처치

실험동물은 동물환경제어사육장치(ECRS; Environment Controlled Rearing System)에서 사육하였다. 오리엔트바이오(Seongnam, Republic of Korea)로부터 Sprague-Dawley계 수컷 rat(4주령 130-160g)을 구입하였고, 1주일간 사육장치에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. ECRS의 습도는 60%, 온도는 20-23°C, 명암주기는 12시간이 유지되게 설정하였고, 사료(Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험은 대구한의대학교 산학협력단 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인(승

인번호 : DHU 2021-0103)을 획득한 후에 실험을 진행하였다.

무처치 control군을 normal군으로 설정하였고, CA (100 μ l/rat) 피하주사로 염증을 유도한 군을 CA군으로 설정하였다. CA와 THJTS(0.3g/kg)를 투여한 군을 THJTS 0.3g/kg + CA군, CA와 THJTS(1.0g/kg)를 투여한 군을 THJTS 1.0g/kg + CA군, CA와 dexamethasone (1mg/kg, p.o.)을 투여한 군을 DEXA + CA군으로 설정하였다(Table 3). 각 실험군당 rat의 마릿수는 5마리로 하였다. Dexamethasone과 THJTS는 1회/일로 5일 연속 투여하였으며, 5일째 마지막 약물 투여 후 1시간이 지난 뒤에 rat의 오른쪽 발바닥에 CA를 100 μ l/rat로 주사하였다.

10. Paw edema의 유도 및 측정

5일 동안 매일 1회 약물을 투여하고, 마지막 투여 1시간 후에 CA를 주사하여 paw edema를 유발시켰다. paw edema의 부종 정도는 CA를 주사한 후, 0-4시간 마다 plethysmometer로 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. 동물조직에서 iNOS 발현 측정

실험 rat을 희생시킨 후 발바닥 조직을 채취하여 radioimmunoprecipitation(RIPA) buffer 1ml를 넣고

조직파쇄기(Taco™Prep Bead Beater; GeneReach, Taichung, Taiwan)를 이용하여 발바닥 조직을 균질화 시켰다. 균질화된 액을 15,000 \times g에서 10분 동안 원심 분리하여 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 vitro의 방법과 동일하게 진행하였다.

12. 통계적 검증

모든 실험 결과는 mean \pm SD로 표기하였다. 처치군 간의 유의성은 먼저 one way analysis of variance(A NOVA)로 검정한 후 Newman-Keuls test로 검정하였고, 검정의 유의성은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

III. 결 과

1. THJTS의 UPLC 분석

THJTS의 지표물질로 當歸에서 Decursin, Decursinol, Ferulic acid를, 大黃에서 Sennoside A와 Rhein을 선정하여 분석을 진행하였다.

분석 결과 본 연구에 사용된 THJTS에는 Decursin은 0.89 \pm 0.066ppm, Decursinol은 5.47 \pm 0.267ppm, Ferulic acid는 14.50 \pm 0.120ppm이 함유되어 있었고, Sennoside A는 1.24 \pm 0.009ppm, Rhein은 4.62 \pm 0.033ppm이 함유되어 있었다(Fig. 1).

Table 3. Experimental Groups in This Study

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

2. THJTS가 NO 생성 및 세포 생존율에 미치는 영향

THJTS의 항염증 효과를 평가하기 위하여 먼저 LPS 단독 처리군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 4.08 ± 0.07 배로 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$). THJTS $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 3.39 ± 0.12 배, $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서

는 3.23 ± 0.13 배, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 2.71 ± 0.03 배, $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 1.83 ± 0.15 배로 모두 유의하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 2A).

THJTS가 LPS 처리 후 증가된 NO를 감소시킨 것이 THJTS+LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)의 세포독성에 의한 것인지를 관찰하기 위하여, THJTS+LPS를 처리하고 18시간 후, MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 구하였다.

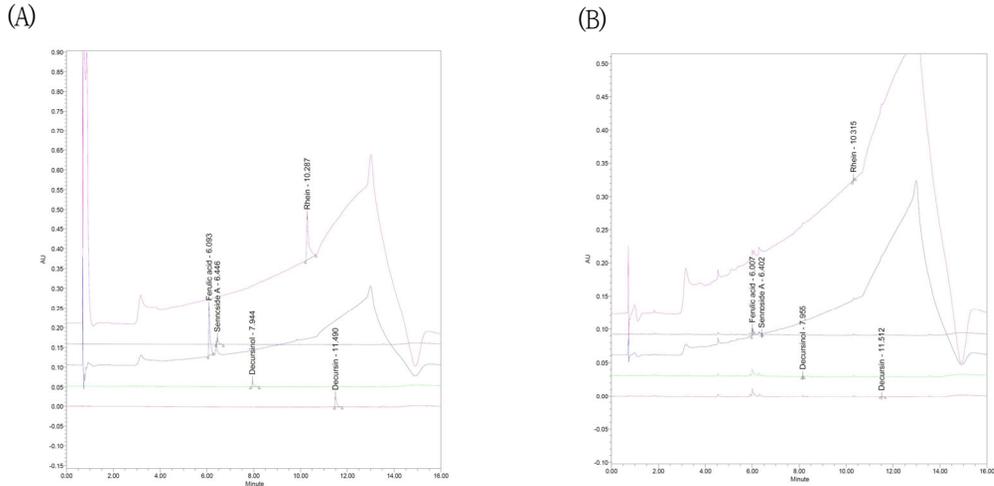


Fig. 1. Analysis of 5 Standard Compounds in THJTS by UPLC-PDA

(A) UPLC chromatograms of 5 standard compounds, Decursin, Decursinol, Ferulic acid, Sennoside A & Rhein
 (B) UPLC chromatograms of Decursin, Decursinol, Ferulic acid, Sennoside A & Rhein in THJTS(Decursin: 330nm, Decursinol: 330nm, Ferulic acid: 280nm, Sennoside A: 340nm, Rhein: 254nm)

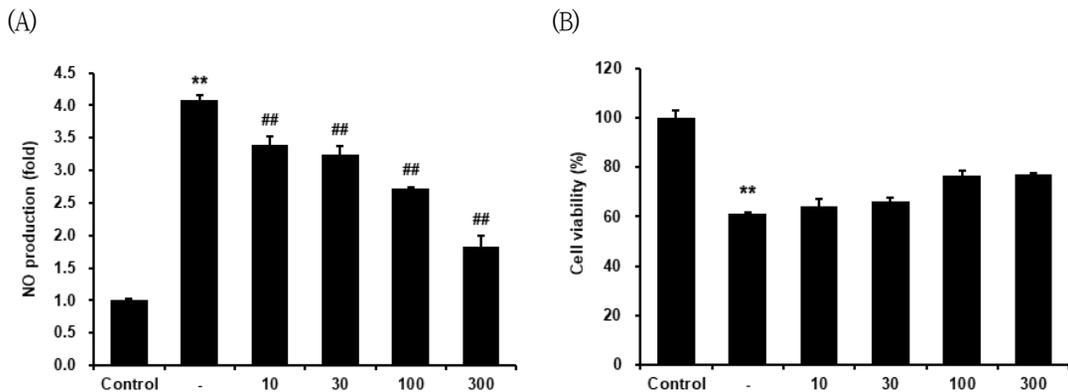


Fig. 2. Effect of THJTS on NO Production and Cell Survival Rate in LPS-stimulated Raw 264.7 Cell
 Raw 264.7 cells were treated with 10, 30, 100 and $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ of THJTS for 1 hour and then treated with $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS for 18 hours. (A) Relative NO production(fold) was determined by using Griess reagent and (B) relative cell survival rate(%) was measured by MTT assay. Data represent the mean \pm SD of 3 separate experiments. *: significant as compared to control, ** $p < 0.01$, #: significant as compared to LPS-stimulated cells, ## $p < 0.01$

LPS군에서는 control군에 비교하여 $61.04 \pm 0.67\%$ 의 세포 생존율을 보였지만($p < 0.01$), LPS와 THJTS $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 군에서 $64.18 \pm 2.84\%$, LPS와 THJTS $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 군에서 $66.19 \pm 1.45\%$, LPS와 THJTS $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 군에서 $76.66 \pm 1.69\%$, LPS와 THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 군에서 $76.95 \pm 0.76\%$ 로 LPS 단독 처치군에 비교하여 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2B). 이러한 NO 생성 억제 결과와 세포 생존율의 결과를 바탕으로 이후의 기전 연구는 THJTS $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 와 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 실험을 하였다.

3. THJTS가 LPG, LOX, PGN, FLA로 유도된 NO 생성 및 세포 생존율에 미치는 영향

THJTS가 TLR4의 ligand인 LPS 외에 다른 TLR의 1 ligand로 유도된 염증 반응도 억제할 수 있는지 확인하였다. LPS로 활성화시킨 Raw 264.7 cell에서 NO의 생성 억제 및 세포 생존율 연구 방법과 유사한 방법으로 LPS 대신 TLR2, 5, 7의 ligand인 peptidoglycan (PGN), flagellin(FLA) 및 loxoribine(LOX) $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 후에 NO의 생성량과 세포 생존율을 평가하

였다.

먼저 NO는 LPS 단독 처치군에서 control군(1.00 ± 0.007) 대비 4.44 ± 0.06 배 NO 생성량이 증가하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리하였을 때 2.29 ± 0.09 배로 NO의 생성을 유의하게 억제하였다($p < 0.01$). LOX 단독 처치군에서 control군(1.00 ± 0.007) 대비 2.71 ± 0.07 배 NO 생성량이 증가하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리하였을 때 1.11 ± 0.02 배로 NO의 생성을 유의하게 억제하였다($p < 0.01$). PGN 단독 처치군에서 control군(1.00 ± 0.007) 대비 2.43 ± 0.01 배 NO 생성량이 증가하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리하였을 때 1.52 ± 0.10 배로 NO의 생성을 유의하게 억제하였다($p < 0.05$). FLA 단독 처치군에서 control군(1.00 ± 0.007) 대비 3.24 ± 0.03 배 NO 생성량이 증가하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리하였을 때 1.08 ± 0.009 배로 NO의 생성을 유의하게 억제하였다($p < 0.01$)(Fig. 3A).

세포 생존율에 있어서 LPS 단독 처치군은 control군(100.00 ± 3.22) 대비 $77.83 \pm 2.81\%$, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리한 군은 $75.54 \pm 1.20\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. LOX 단독 처치군은 control군(100.00 ± 3.22) 대비 $68.62 \pm 3.57\%$, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리한

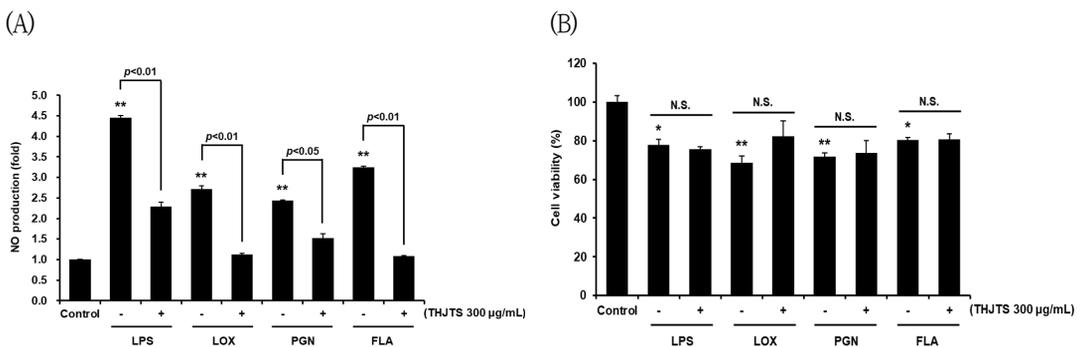


Fig. 3. Inhibitory Effect of THJTS on LPS, LOX, PGN and FLA-induced NO Production and Cell Survival Rate in Raw 264.7 Cell

Raw 264.7 cell were pretreated with $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ of THJTS for 1 hour, before cultured with $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS, LOX, PGN and FLA for 18 hours. (A) The relative levels of NO production were analyzed by measuring the absorbance and (B) the relative cell viability were examined by MMT assay. Data represent as mean \pm SD of 3 independent experiments. *: significant as compared to control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

군에서는 $82.14 \pm 8.00\%$ 로 나타났다. PGN 단독 처치군은 control군(100.00 ± 3.22) 대비 $71.89 \pm 1.88\%$, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리한 군은 $73.62 \pm 6.55\%$ 로 나타났다. FLA 단독 처치군은 control군(100.00 ± 3.22) 대비 $80.24 \pm 1.40\%$, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리한 군은 $80.77 \pm 2.94\%$ 로 나타났다(Fig. 3B).

이러한 결과는 THJTS가 TLR4의 ligand에 의한 염증 반응뿐만 아니라, TLR2, 5, 7의 ligand에 의한 염증 매개 물질을 억제할 수 있으며, 세포독성은 없음을 나타낸다.

4. THJTS가 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

THJTS 100, $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 NO를 억제한 것이 NO를 합성하는 핵심 효소인 iNOS 단백질 발현의 조절과 연관성을 평가하기 위해 세포질에서 iNOS 단백질 발현을 평가하였으며, 또한 PGE_2 와 관련된 COX-2 단백질의 발현을 평가하였다.

LPS군에는 iNOS의 발현이 control군 대비 19.31 ± 0.67 배로 유의하게 증가되었으나, THJTS $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 18.38 ± 0.93 배로 LPS군과 유사하였으나,

THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 13.56 ± 1.45 배로 LPS군에 대비하여 유의미한 감소를 보였다($p < 0.01$)(Fig. 4B).

LPS군에는 COX-2의 발현이 control군 대비 70.11 ± 1.59 배로 유의하게 증가되었으나, THJTS $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 72.66 ± 3.09 배로 LPS군과 유사하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 51.47 ± 4.30 배로 LPS군에 대비하여 유의미하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 4C).

5. THJTS가 LPS, LOX, PGN, FLA로 유도된 iNOS 및 COX-2 생성에 미치는 영향

iNOS는 LPS 단독 처치군에서 control군(1.00 ± 0.73) 대비 23.58 ± 0.77 배 iNOS 생성량이 증가하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리하였을 때 16.86 ± 0.73 배로 iNO의 생성을 유의하게 억제하였다($p < 0.01$). LOX 단독 처치군에서 control군(1.00 ± 0.73) 대비 18.79 ± 1.88 배 iNOS 생성량이 증가하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리하였을 때 6.66 ± 2.59 배로 유의하게 억제하였다($p < 0.05$). PGN 단독 처치군에서 control군(1.00 ± 0.73) 대비 8.01 ± 1.35 배 iNOS 생성량이 증가하였으나, THJTS $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전처리한 경우 1.38 ± 0.99 배로 유의하게 억제하였다($p < 0.05$). FLA 단독 처치군에

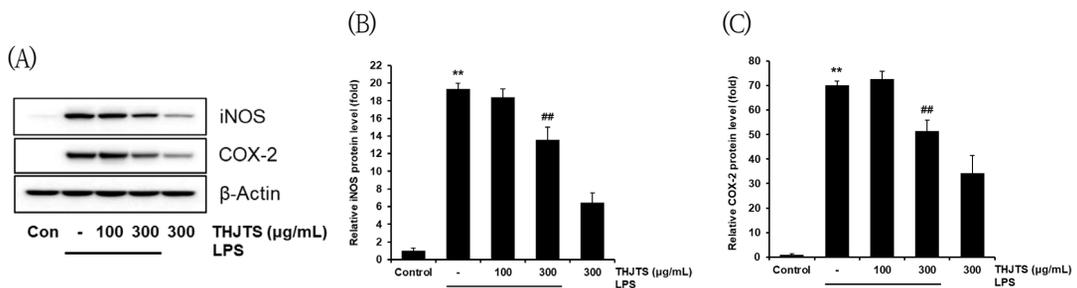


Fig. 4. Effect of THJTS on the iNOS and COX-2 in LPS-stimulated Raw 264.7 Cell

The expressions of iNOS and COX-2 proteins were monitored 18 hours after treatment of LPS $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ with or without THJTS 100, $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ pretreatment (i. e. 1 hour before LPS). Same amounts of protein were separated by SDS-PAGE. The expressions of iNOS and COX-2 proteins were analyzed by immunoblot analysis using specific iNOS and COX-2 antibody. (A) The expression of iNOS and COX-2 confirmed same loading of the total lysates. (B) The relative iNOS density was measured by scanning densitometer. (C) The relative COX-2 density was measured by scanning densitometer. Data represent the mean \pm SD of 3 separate experiments for each condition. *: significant as compared to control, **: $p < 0.01$, #: compared to LPS alone, ##: $p < 0.01$

서 control군(1.00±0.73) 대비 10.54±1.43배 iNOS 생성량이 증가하였으나, THJTS 300µg/ml를 전처리하였을 때 0.73±0.33배로 유의성 있게 억제하였다(p<0.05)(Fig. 5B).

COX-2는 LPS 단독 처치군에서 control군(1.00±0.39) 대비 43.28±1.91배 COX-2 생성량이 증가하였으나, THJTS 300µg/ml를 전처리하였을 때 27.44±3.84배로 COX-2의 생성을 유의성 있게 억제하였다(p<0.01). PGN 단독 처치군에서 control군(1.00±0.39) 대비 21.29±1.32배 COX-2 생성량이 증가하였으나, THJTS 300µg/ml를 전처리하였을 때 10.02±2.47배로 유의하게 억제하였다(p<0.05). 하지만, LOX 처치군과 FLA 처치군에서는 유의한 결과를 보여주지 못했다(Fig. 5C).

6. THJTS가 cytokine 생성에 미치는 영향

본 연구에서는 macrophage에서 생성되는 TNF-α, IL-1(α, β), IL-6, IL-10 등의 cytokine 중²¹⁾, TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성량을 평가하였다.

무처리 control군에서 TNF-α가 214.22±18.78pg/ml 이었으나, LPS군에서는 7,921.77±132.26pg/ml로서 control군에 비교하여 유의미하게 증가하였다(p<0.01). 이러한 LPS에 의한 TNF-α의 증가는 THJTS 100µg/ml와 300µg/ml에서 각각 3,946±88.30, 2,262.33±91.03(pg/ml)으로 유의성 있게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 6A).

Control군에서는 IL-1β가 2.50±0.75pg/ml이었으나, LPS군에서는 140.27±11.07pg/ml로서 control군에 비교하여 유의미하게 증가하였다(p<0.01). 이러한 LPS에 의

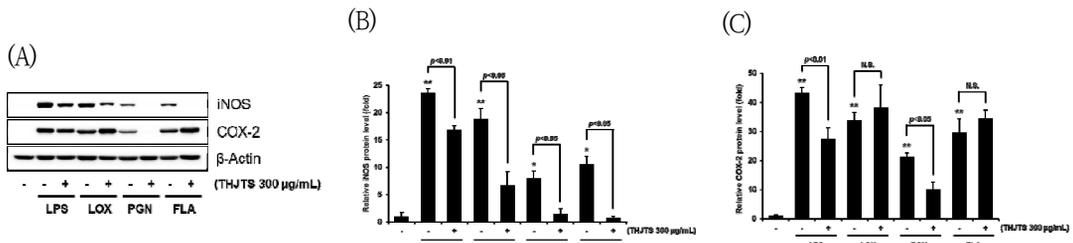


Fig. 5. Inhibitory Effect of THJTS on LPS, LOX, PGN and FLA-induced iNOS and COX-2 Production in Raw 264.7 Cell

(A) Raw 264.7 cell were pretreated with 300µg/ml of THJTS for 1 hour, and then, further cultured with 30µg/ml of LPS, LOX, PGN and FLA for 18 hours. (B) Relative levels of iNOS production were assayed by measuring the absorbance and (C) relative levels of COX-2 production were assayed by measuring the absorbance. Data were expressed as mean ±SD of 3 independent experiments. *: significant as compared to control, *p<0.05, **p<0.01

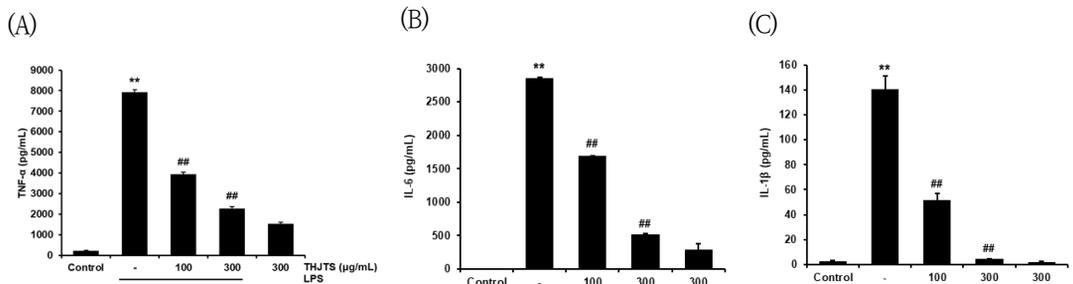


Fig. 6. Effect of THJTS on the Cytokine Production in LPS-induced Raw 264.7 Cell

Pro-inflammatory cytokines were assayed in the medium of Raw 264.7 cells treated with LPS 1µg/ml for 18 hours in the presence or absence of THJTS. The amounts of (A)TNF-α, (B)IL-1β and (C)IL-6 were measured by ELISA kit as described in materials and methods section. Data represent the mean±SD of 3 separate experiments for each condition. *: vs control group, **p<0.01, #: LPS alone, ##p<0.01

한 IL-1 β 의 증가는 THJTS 100 μ g/ml와 300 μ g/ml에서 각각 51.87 \pm 4.85, 4.37 \pm 0.17(pg/ml)로 유의성 있는 감소를 보였다(p<0.01)(Fig. 6B).

또한, IL-6는 control군에서는 0.54 \pm 0.98pg/ml이었으나, LPS군에서는 2,861.09 \pm 13.27pg/ml로서 control군에 비교하여 유의미하게 증가하였다(p<0.01). 이러한 LPS에 의한 IL-6의 증가는 THJTS 100 μ g/ml와 300 μ g/ml에서 각각 1,699.06 \pm 0.60, 518.21 \pm 7.87(pg/ml)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.01)(Fig. 6C).

7. THJTS가 PGE₂ 생성에 미치는 영향

본 연구에서 THJTS에 의해서 COX-2 생성을 억제하는 것은 확인되었으므로, 이것에 기인하여 PGE₂ 생성 역시 억제하여 염증 반응을 억제하는지 알아보기 위해 PGE₂의 생성량을 평가하였다.

PGE₂는 control군에서는 30.98 \pm 25.08pg/ml였으나, LPS군에서는 2,641.55 \pm 175.08pg/ml로 control군에 비교해 유의하게 증가하였다(p<0.01). 이러한 LPS에 의한 PGE₂의 증가는 THJTS 100 μ g/ml에서는 1,020.60 \pm 120.04pg/ml, 300 μ g/ml에서는 202.66 \pm 71.59pg/ml로 모두 유의한 감소를 보였다(p<0.01)(Fig. 7).

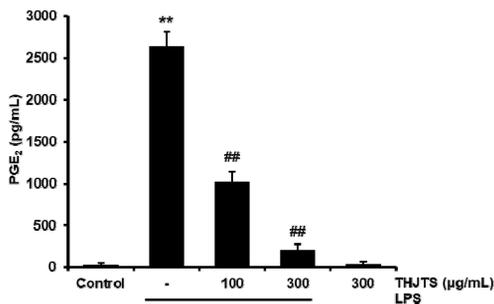


Fig. 7. Effect of THJTS on PGE₂ Production in LPS-stimulated Raw 264.7 Cell

Raw 264.7 were assayed in the medium of Raw 264.7 cells treated with LPS 1 μ g/ml for 18 hours in the presence or absence of THJTS. Production of PGE₂ was measured by the PGE₂ assay kit. Data represent as mean \pm SD of 3 separate experiments. *: significant as compared to control, **p<0.01, #: significant as compared to LPS-stimulated cells, ##p<0.01

8. THJTS가 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

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

I κ B α 는 LPS 처치군에서 control군 대비 0.27 \pm 0.05배로서 control군에 비교하여 유의하게 감소하였다(p<0.01). 그러나 이러한 LPS에 의한 I κ B α 의 감소는 THJTS 100 μ g/ml와 300 μ g/ml에서 각각 0.44 \pm 0.03, 0.42 \pm 0.03배로 유의성 있게 증가하였다(p<0.05)(Fig. 8A, B).

I κ B α 의 감소에 따라 p-I κ B α 는 LPS 처치군에서 control군 대비 4.55 \pm 0.20배로 유의하게 증가하였으나(p<0.01), THJTS 300 μ g/ml에서는 증가된 p-I κ B α 가 2.03 \pm 0.41배로 LPS 처치군에 비교하여 유의성 있게 감소되었다(p<0.01)(Fig. 8A, C).

NF- κ B는 핵 분획에서 LPS 처치로 의해 control군 대비 2.94 \pm 0.13배로 유의하게 증가하였으나(p<0.01), THJTS 300 μ g/ml에서는 NF- κ B가 1.94 \pm 0.09배로 LPS 처치군에 비교하여 유의성 있게 감소되었다(p<0.01)(Fig. 8D, E).

9. THJTS가 MAPK 발현에 미치는 영향

본 연구에서는 NF- κ B pathway 외에 THJTS가 MAPK pathway에 미치는 영향을 평가하였다.

p38의 인산화는 LPS군에서는 control군에 비교하여 5.35 \pm 0.20배로 유의성 있게 증가하였다(p<0.01). p38의 인산화는 THJTS 100 μ g/ml에서 유의미한 결과를 보여주지 못했으나, THJTS 300 μ g/ml에서는 2.71 \pm 0.32배로 유의하게 억제되었다(p<0.01)(Fig. 9A, B).

반면, ERK의 인산화는 control군에 비교하여 THJTS 100, 300 μ g/ml 모두에서 유의미한 결과를 보여주지 못하였으며(Fig. 9A, C), JNK의 인산화 역시 control군에 비교하여 THJTS 100, 300 μ g/ml 모두에서 유의미한 결과를 보여주지 못했다(Fig. 9A, D).

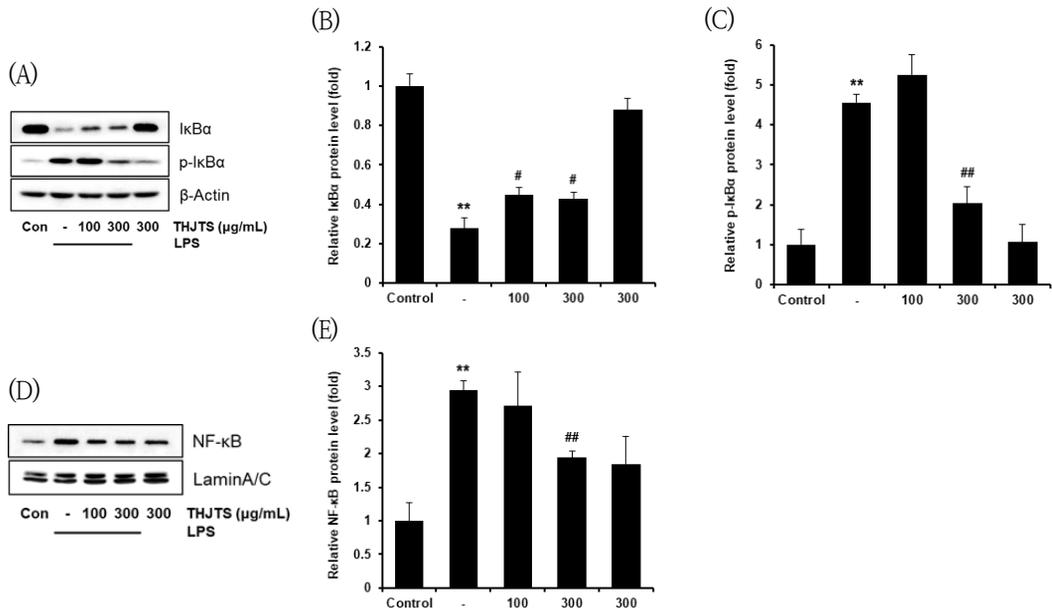


Fig. 8. Effect of THJTS on the NF-κB Signaling Pathway in Raw 264.7 Cell Stimulated with LPS
 The levels of IκBα proteins were monitored 30 minutes, p-IκBα and NF-κB proteins were 60 minutes after treatment of LPS 1 μg/ml with or without THJTS pretreatment (i.e. 1 hour before LPS). (A) The β-actin confirmed same loading of the whole cell lysate, and (D) Lamin A/C confirmed same loading of the nuclear fraction. (B, C, E) The relative density levels of the bands were measured with scanning densitometer. Data represent the mean ± SD with 3 separate experiments. *: vs control group, **p<0.01, #: vs LPS alone, ##p<0.01

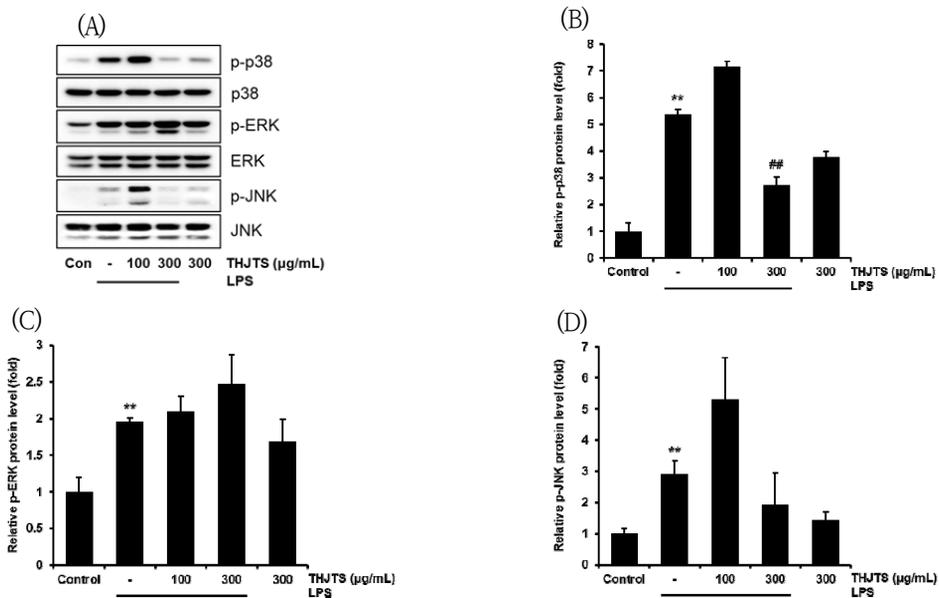


Fig. 9. Effect of THJTS on the Phosphorylation of MAPKs
 (A) The phosphorylated forms and total levels of MAPK proteins (p38, ERK and JNK). The proteins were measured 60 minutes after LPS (1 μg/ml) treatment with or without THJTS pretreatment (i.e. 1 hour before LPS). (B, C, D) The relative density levels of the bands were measured with a scanning densitometer. Values represent the mean ± SD of 3 separate experiments for each condition. *: vs control group, **p<0.01, #: vs LPS alone, ##p<0.01

10. THJTS가 rat의 paw edema에 미치는 영향

THJTS의 in vivo에서의 염증 제어 효과를 평가하기 위해 rat의 우측 하지에 CA를 피하주사하여 급성 염증성 부종 모델을 사용하였다.

paw edema를 측정된 결과, CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4시간에 각각 0.99 ± 0.03 , 1.46 ± 0.05 , 1.71 ± 0.07 , 1.86 ± 0.10 , 1.76 ± 0.12 (배)를 나타내어 1, 2, 3, 4시간에 유의미한 paw edema가 유발되었다($p < 0.01$).

THJTS 0.3g/kg + CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4시간에 각각 1.009 ± 0.02 , 1.36 ± 0.10 , 1.42 ± 0.06 , 1.48 ± 0.06 , 1.46 ± 0.14 (배)를 나타내어 2, 3, 4시간에 유의하게 paw edema가 억제되었다($p < 0.01$). THJTS 1.0g/kg + CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4시간에 각각 1.01 ± 0.01 , 1.43 ± 0.08 , 1.55 ± 0.10 , 1.57 ± 0.09 , 1.48 ± 0.09 (배)를 나타내어 2, 4시간($p < 0.05$), 3시간($p < 0.01$)에 유의성 있게 paw edema가 억제되었다.

DEXA + CA군에서는 0, 1, 2, 3, 4시간에 각각 1.03 ± 0.04 , 1.28 ± 0.03 , 1.42 ± 0.10 , 1.47 ± 0.10 , 1.43 ± 0.13 (배)를 나타내어 1, 2, 3, 4시간에 유의하게 paw edema가 억제되었다($p < 0.01$)(Fig. 10).

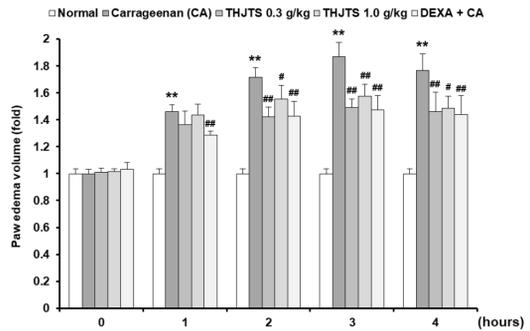


Fig. 10. Effect of THJTS on the Paw Edema in CA-stimulated Rat

THJTS was administered orally to rats at dose of 0.3 and 1.0g/kg/day for 5 days prior to occurrence of paw edema. Paw edema was occurred by subcutaneous shot of CA (s.c. 1% solution of CA dissolved in saline, 0.1ml/rat) into the right hind paw. The paw edema volume was measured at 0, 1, 2, 3, 4 hours after CA subcutaneous shot. DEXA (1mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean \pm SD of 5 animals. *: vs normal group, ** $p < 0.01$, #: vs CA alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

11. THJTS가 rat의 paw edema에서 iNOS에 미치는 영향

THJTS가 in vitro에서 $300 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 iNOS를 유의성 있게 억제하였으므로, paw edema 모델의

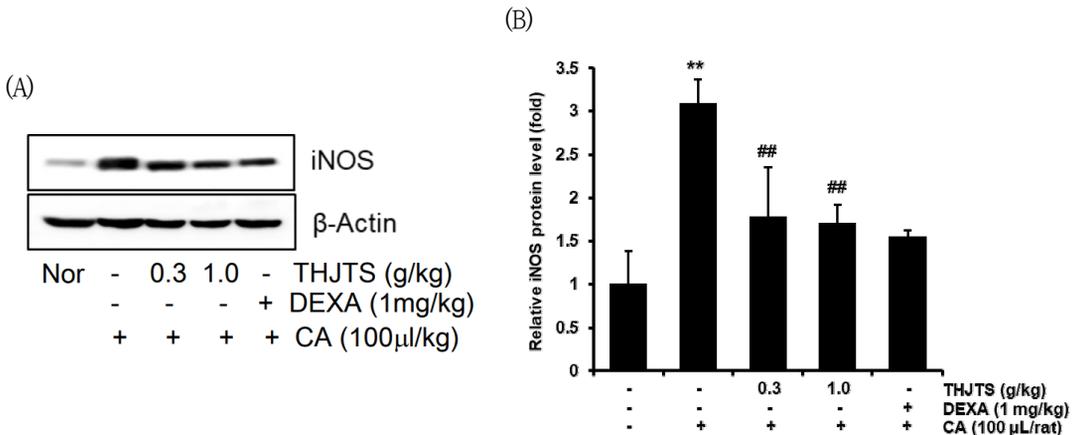


Fig. 11. Effect of THJTS on the iNOS in CA-induced Rat

THJTS was administered orally to rats at dose of 0.3 and 1.0g/kg/day for 5 days before the induction of paw edema. (A) The level of iNOS protein was determined by immunoblot analysis using an iNOS specific primary antibody. Same amounts of total protein were separated by SDS-PAGE. The expression of β -actin confirmed same loading of the lysate. (B) The relative density levels of the bands were measured with a scanning densitometer. Data represent mean \pm SD of 3 independent experiments. *: vs normal group, ** $p < 0.01$, #: vs CA alone, ## $p < 0.01$

부종을 측정한 후 염증조직을 적출하여 조직 내에서의 iNOS의 발현을 평가하였다.

iNOS 단백질의 발현에서 CA군에서는 normal군(1.00±0.38) 대비 3.09±0.27배로 유의하게 증가되었다(p<0.01). THJTS 0.3g/kg + CA군에서는 1.77±0.57배, THJTS 1.0g/kg + CA군에서는 1.70±0.21배로 CA군과 비교하여 유의미하게 감소되었고(p<0.01), 이것은 양성대조군으로 사용된 DEXA군(1.55±0.07)과 유사한 수준을 나타내었다(Fig. 11).

IV. 고 찰

湯火止痛散은 明代, 張介賓이 편찬한 《景岳全書》 卷六十四 출전의 방제로, 大黃(末, 微炒), 當歸(末) 各等分으로 구성되어 있으며, 大黃과 當歸를 가루내어 상처 부위에 발라서 사용하거나 참기름에 섞어서 화상에 사용한다⁵⁾. 湯火止痛散의 구성 약물 중, 大黃은性は寒하고, 味는苦하여 涼血解毒하는 효능으로, 癰腫, 跌打損傷, 上消化道出血, 外治水火湯傷을 치료한다. 또한 當歸는性は溫하고, 味는甘辛하여 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸하는 효능으로 癰疽創傷을 치료한다¹⁵⁾.

湯火止痛散은 當歸와 大黃의 가루를 참기름에 섞어 첨부하는 방식으로 쓰이는 외용제이나, 當歸와 大黃은散劑나 湯劑로 내복하여서도 湯火傷을 치료하는 다빈도 약재이다⁴⁾. 이에 저지는 湯火止痛散이 화상에 의해 유발된 피부의 염증성 증상을 치료한다는 점에 근거하여 湯火止痛散의 물 추출물에 대한 항염증 효과와 기전을 알아보았다.

염증은 균의 감염, 항원항체 반응, 열, 외상 등 생체 조직의 기질 변화를 유발하는 침습에 대한 생체의 방어 기전으로 정의되며, 그 발생 부위에 발적, 종창, 발열, 동통, 기능 상실 등의 증후가 발생된다^{3,16)}.

macrophage는 염증 반응을 통해 감염체를 제거하고 항원제시를 통해 적응 면역 반응을 유도한다. 그로 인해 인체의 항상성을 유지하는 핵심 면역세포 중 하나이다^{17,18)}. macrophage는 병원체로부터 기인한 병원

체-연관 분자양식(pathogen-associated molecular pattern)과 세포로부터 기인한 손상-연관 분자양식(damage-associated molecular pattern)을 인식하여 NF-κB와 MAPK 등을 활성화시키며, 이를 통하여 IL-6, IL-1β, TNF-α 등을 포함한 다양한 전염증성 cytokine 분비를 통해 염증 반응을 개시한다^{18,19)}.

본 연구에서는 湯火止痛散 물 추출물이 in vitro 모델로 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 염증 매개 물질의 발현, NF-κB, MAPK의 신호전달체계, in vivo 모델로 CA로 유도된 급성 염증 동물모델을 이용하여 湯火止痛散의 항염증 효과를 평가하였다.

본 연구에서는 湯火止痛散의 염증 억제 기전과 항염증 효과를 연구하고자 in vitro 모델로 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell 모델을 사용하였다.

LPS는 그람음성균의 외벽 질편 복합물로, polysaccharide와 lipid로 구성되어 있다²⁰⁾. LPS는 세포외액이나 혈액에 존재하는 가용성 LPS 결합단백질(LBP; LPS-binding protein)과 결합한다. 그리고 이 LPS-LBP 복합체가 macrophage 표면의 CD14와 결합하면 LBP는 분리된다. LPS-CD14 복합체가 macrophage 표면의 TLR4와 결합하면 LPS/CD14/TLR4 복합체를 이루고 IL-1 receptor associate kinase(IRK)의 인산화를 유도한다. 그리고 TNF-R-associate factor 6(TRAF6)의 활성화를 유도하여 MAPK cascade와 NF-κB cascade를 활성화시켜 염증 매개 반응을 활성화한다²⁰⁾.

한약재는 복합체이고, 성분의 함량이나 비율이 일정하지 않고, 산지, 채취 시기 등 여러 환경적 요소에 의해서도 유효성분의 함량이 달라지는 경우들이 있다²¹⁾. 그래서 이런 변수의 극복을 위하여 본 연구에 사용된 湯火止痛散 물 추출물의 5가지 성분을 평가하였다. 본 연구에 사용된 THJTS의 當歸 성분인 Decursin은 0.89±0.066ppm, Decursinol은 5.47±0.267ppm이 함유되어 있었고, 大黃 성분인 Ferulic acid는 14.50±0.120ppm, Sennoside A는 1.24±0.009ppm, Rhein은 4.62±0.033ppm이 함유되어 있었다.

THJTS의 항염증 효과를 알아보기 위해, 우선 NO의

발현량을 관찰하였다. NO는 L-arginine으로부터 생성되는데, nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine은 L-citrulline과 NO로 생성된다. NO는 강력한 내인성 혈관확장인자로 혈관평활근의 증식을 억제하고 혈소판의 부착이나 응고를 억제한다. 하지만, 지속적인 고농도의 NO는 숙주에 불리하게 작용하여, 염증 반응을 유발하여 조직의 손상을 초래할 수 있다²²⁻⁶⁾.

LPS군에서는 NO의 생성량이 유의미하게 증가하였으며, 이러한 NO의 증가는 THJTS 10 μ g/ml에 의해 유의하게 감소하였고, THJTS 100, 300 μ g/ml에 의해서 더욱 유의하게 감소하였다. 세포 생존율을 평가한 결과, LPS + THJTS 10, 100, 300 μ g/ml 농도에서는 LPS 단독 처리군과 비교 시, 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 그러므로 THJTS 10, 100, 300 μ g/ml 첨가 후 세포독성에 의해 NO가 감소한 것이 아니라, THJTS의 항염증 효과로 추론할 수 있다.

Toll-like receptor(TLR)는 바이러스나 박테리아 등의 병원균이 숙주 안에 들어왔을 때, 병원균들이 가지고 있는 독특한 구조를 인식하여 선천성 면역 반응과 후천성 면역 반응을 유도하는 역할을 한다²⁷⁻³⁰⁾. 각각의 TLRs는 미생물들이 가지고 있는 각자의 독특한 구조를 인식한다²⁷⁾. TLR2는 lipoproteins, lipoteichoic acid(그람 양성 세균), lipoarabinomannan(myco bacteria), glycosylphosphatidylinositol anchor(*T. cruzi*), glycolipids(*Treponema maltophilum*) 및 폐놀 용해성 modulin(*S. epidermis*), zymo-san(fungi) 등 다양한 병원균의 구조물을 인식하는데 관여한다³¹⁾. TLR4는 그람음성세균의 LPS에 대한 수용체로서 TLR 중에서 연구가 가장 잘되어 있다^{32,33)}. TLR5는 세균편모의 주 구조물질인 세균 flagellin을 인식하고, 편모를 가진 세균들만 TLR5를 활성화시킬 수 있다³⁴⁾. TLR7은 imidazoquinolines를 인식하여 면역 반응을 일으키는데, imidazoquinolines는 인간 papillomavirus 감염 치료에 사용되는 합성물질이다³⁵⁾.

NO는 LPS, LOX, PGN 및 FLA 각 단독 처리군에서 유의성 있게 증가하고 THJTS 300 μ g/ml를 전처리하였

을 때, 전부 NO가 유의성 있게 감소하였다. 하지만 세포 생존율에서는 LPS, LOX, PGN 및 FLA 각 단독 처리군과 LPS, LOX, PGN, FLA에 THJTS 300 μ g/ml를 전처리를 한 군을 비교하였을 때 세포독성을 보이지 않아, THJTS 300 μ g/ml는 TLR4의 ligand뿐만 아니라 TLR 2, 5, 7의 ligand에도 세포독성에 의한 것이 아닌 NO 감소로 인한 항염증 효과가 있음을 추론할 수 있다.

NOS는 type I, II, III가 있는데, 그중 type II는 inducible NOS이다. 그중 iNOS, COX-2는 면역세포 독성에 관여하고, cytokine이나 endotoxin에 의하여 활성화되므로^{36,37)}, 본 연구에서 NO와 iNOS의 연관성을 알아보기 위해 세포질에서 iNOS의 발현을 평가하였다. LPS에 의해 iNOS가 유의성 있게 증가된 상태를 THJTS는 300 μ g/ml의 농도에서 iNOS를 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 THJTS가 iNOS의 발현을 억제함에 따라 NO가 억제됨을 의미한다.

COX-2 효소에 의해 유도된 PGE₂는 아라키돈산에서 유래한 지질 매개체이다. 혈관의 투과성을 증가시키고 혈소판의 응집을 억제시키며 평활근의 수축을 유도하여 염증 반응을 매개한다³⁸⁻⁴⁰⁾. 그러므로 본 연구에서 COX-2와 PGE₂의 연관성을 알아보기 위해 PGE₂의 생성량을 분석한 결과 THJTS 100, 300 μ g/ml의 농도 모두에서 생성을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 THJTS가 COX-2의 생성을 억제함에 따라 PGE₂의 생성까지 억제하여 항염증 효과를 보임을 의미한다.

iNOS는 LPS, LOX, PGN 및 FLA에 THJTS 300 μ g/ml를 전처리하였을 때, 모두에서 유의하게 감소되는 결과를 보였으나, LPS, LOX, PGN 및 FLA에 의해서 유의하게 증가된 iNOS는 THJTS 300 μ g/ml를 전처리하였을 때, LPS, LOX, PGN 및 FLA 모두에서 유의미하게 감소하였으나, LPS, LOX, PGN 및 FLA 처리 후 유의하게 증가된 COX-2는 THJTS 300 μ g/ml를 전처리하였을 때, LPS, PGN에서만 유의미하게 줄어드는 결과를 보였다. PGN은 TLR2의 ligand로 기도 상피, 폐포, 신세뇨관 및 신소체의 보우만낭, 장 상피세포와 위장관의 점막고유층 등에서 발견되는데 특히, 피부의 각질세포

와 피지선에서도 발견된다는 점에서 THJTS의 효능과 연관 지어 생각해볼 수 있을 것이다⁴¹⁾.

TNF- α 는 monocyte, mast cell, macrophage 등으로부터 분비되는 전염증성 cytokine이다. 최근에 TNF- α 가 자가면역질환에 중추적 역할을 한다고 알려져 있으며⁴²⁾, IL-1은 IL-1 α , IL-1 β 의 2종류가 있고, 염증 반응에 있어서 TNF와 유사하게 관여한다. IL-6는 B cell을 성숙시켜서 항체의 생성을 촉진한다²⁰⁾.

본 연구에서 Raw 264.7 cell은 LPS에 의해 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 모두 유의하게 증가시켰으며, THJTS 100 μ g/ml와 300 μ g/ml는 증가된 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 모두 유의성 있게 감소시켰다.

한편, LPS에 의해 활성화된 macrophage는 TLR을 통해 염증 반응을 매개한다. 이에 잘 알려진 신호전달 경로로는 NF- κ B pathway가 있다⁴³⁾. NF- κ B는 일반적인 상황에서는 macrophage의 세포질 내에서 I κ B와 결합하여 안정형으로 존재한다⁴⁴⁾. macrophage에서 LPS 자극은 I κ B α 의 인산화를 통한 분해를 촉진하여 NF- κ B를 핵으로 이동시켜, COX, TNF, iNOS, ILs 등의 전사를 유도한다. I κ B는 α , β , ϵ 와 같이 여러 가지 형태가 있으나, 세포 내에서 가장 많이 있는 것은 I κ B α 이다^{19,44)}.

따라서 본 연구에서는 세포질에서는 p-I κ B α 와 I κ B α 의 발현량과, 핵 분획에서는 NF- κ B의 발현량을 평가하였다. LPS는 I κ B α 의 인산화를 촉진시켜 I κ B α 의 발현은 유의하게 감소시켰고, p-I κ B α 의 발현량은 유의하게 증가시켰다. 이러한 변화는 I κ B α 는 THJTS 100, 300 μ g/ml에 의해 유의성 있게 회복되었고, p-I κ B α 는 THJTS 300 μ g/ml에 의해서만 유의성 있게 회복되었다. 또한 핵 내에서의 NF- κ B의 발현량 역시 LPS에 의해 유의하게 증가하였고, THJTS 300 μ g/ml에 의해 유의성 있게 감소되었다. 이것은 THJTS가 I κ B α 의 인산화를 억제하여 염증을 억제할 수 있음을 알 수 있고, NF- κ B 역시 핵으로 전위를 억제하여 염증 억제가 가능함을 추론할 수 있다.

LPS는 염증 매개 반응의 또 다른 경로인 MAPK cas

cade를 LBP/CD14/TLR4를 통해 활성화하여 염증 반응을 유도한다^{20,45)}. LPS에 의한 MAPK의 인산화는 microglial cell(BV2 cell)^{45,46)} 및 macrophage(Raw 264.7 cell)⁴⁷⁾, rat으로부터 분리한 Kupffer cell⁴⁸⁾ 등 다양한 macrophage에서 보고되었다.

LPS는 p38, ERK 그리고 JNK의 인산화를 유도하여 chemokine 및 cytokine, 염증 관련 효소 등의 생성을 촉진한다^{45,49)}. 이런 이유로 MAPK는 NF- κ B와 더불어 LPS로 유도된 염증물질의 연구에 자주 사용된다. 그래서 본 연구에서는 NF- κ B pathway 외에 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 MAPK의 활성을 평가하였다.

본 연구에서도 LPS는 p38, ERK 그리고 JNK의 인산화를 유의미하게 증가시켰으나, THJTS은 p-38의 인산화만 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 THJTS가 MAPK 일부의 인산화의 조절을 통해서만 염증을 억제할 수 있음을 보여준다.

위의 in vitro의 연구 결과를 종합하면 THJTS는 I κ B α 의 인산화 억제와 NF- κ B의 핵으로 전위 억제를 통해 항염증 효과를 나타내지만, MAPK 일부의 인산화 억제를 통한 항염증 효과만 있음을 의미한다.

in vitro에서 THJTS의 염증을 억제하는 기전과 그 효과를 확인하고, in vivo에서도 THJTS가 항염증 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 CA로 유도된 rat의 급성 paw edema 모델을 사용하여 평가하였다. CA는 투여 부위에 급성 부종을 유발하는데, 염증세포의 침윤과 피부 조직의 부종을 유발하기 때문에, 급성 염증에 대한 항염증 실험에 빈용되고 있다^{50,51)}.

본 실험의 결과에서도 CA는 주사 후, 2-4시간에 유의한 paw edema를 유발하였고, THJTS는 1-4시간에 유의한 paw edema의 억제를 나타내었다. 특히, THJTS 1.0g/kg를 투여한 군에서 양성대조군인 dexamethasone을 투여한 군과 동등한 부종 억제 효과를 나타내었다. 또한 in vitro에서 THJTS가 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였듯이 부종 조직에서도 THJTS의 투여가 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였다.

이상의 연구 결과는 湯火止痛散 물 추출물(THJTS)에

는 in vitro, in vivo 모두에서 유의미한 항염증 작용이 있음을 의미한다.

본 연구는 湯火止痛散의 항염증 효과와 기전을 평가하였다. 그러나 본 연구에서는 湯火止痛散의 구성 약물인 當歸와 大黃의 배합에 따른 상승 효과가 있는지, 當歸와 大黃의 항염증 효과에서 최적 배합 비율은 어떠한지, 當歸와 大黃의 어떠한 성분이 항염증 효과에 있어서 핵심적으로 작용하는지, 湯火止痛散을 실제 외용 시와 내복 시 항염증 효과의 차이에 대해서 연구가 진행되지 않아, 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

in vitro에서 THJTS의 항염증 효과와 그 기전을 알아본 바, 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. THJTS는 LPS에 의해 증가된 iNOS의 생성과 NO의 생성을 유의하게 억제하였으나 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.
2. THJTS는 LPS뿐 아니라, LOX, PGN, FLA에 의해 증가된 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였으나 유의미한 세포독성은 나타내지 않았다.
3. THJTS는 LPS뿐 아니라, LOX, PGN, FLA에 의해 증가된 iNOS의 발현을 유의하게 억제하였으나 증가된 COX-2의 발현은 LPS, PGN 처치군에서만 유의하게 감소시켰다.
4. THJTS는 LPS에 의해 증가된 염증성 cytokine(TNF- α , IL-1 β , IL-6 등)을 유의하게 억제하였다.
5. THJTS는 LPS에 의해 증가된 COX-2와 PGE₂의 생성을 유의하게 억제하였다.
6. THJTS는 유도된 paw edema를 유의하게 억제하여 항염증 효과를 보였다.

이러한 연구 결과는 湯火止痛散의 항염증 효과에 대해 부분적이거나 객관적인 근거를 제시할 수 있으며, 또 湯火止痛散의 약물이 포함된 方劑의 활용에도 보조적 자료로 활용될 수 있을 것이다.

ORCID

Min Jung Ko
(<https://orcid.org/0000-0003-4187-2019>)

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

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

References

1. Jo SJ, Seo HS, Jee SY, Hwangbo M, Kim CY, Kwon K. Efficacy of Herbal Medicines for the Treatment Burns : A Systematic Review and Meta-analysis. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2021;34(4):90-116.
2. Kang WH. Diseases of Skin Atlas. Seoul: Hanmiuihak. 2006:61.
3. The Korean Society of Pathology. Pathology. Seoul:Koomosa. 1995:71-104.
4. Yu MK, Jeong DH, Sim SH, Park SY, Choi JH, Kim JH. A Literature Study on the External Treatment of a Burn. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2003;16(3):38-67.
5. Jeon DH. Silyoung Junguidaeyakgang. Beijing:People's Medical Publishing House Co. 2000:774.
6. Lee SA, Kong R, Kang OH, Seo YS, Zhou T, Kim SA, et al. The antimicrobial activity of Daehwanggo against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Kor J Herbology. 2017;32(2):87-95.
7. Jeon DJ, Cha YY, Lee E. Inflammatory Effect of Rheum undulatum L. J Oriental Rehab Med.

- 2011;21(1):35-46.
8. Park SM, Lee KW, Jo YH. Effect of Rheum undulatum Extract on Antioxidant Activity and Activity of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts. *Journal of Life Science*. 2008;18(12):1700-4.
 9. Yun HJ, Hwang SG, Yun HJ, Kim CH, Seo GS, Park WH, et al. Original Articles : Anticancer effect of Rheum Rhizoma on human Liver cancer HepG2 cells. *Kor J Herbology*. 2006;21(4):27-36.
 10. Jang SI, Kim JH, Hwang KM, Pae HO, Yun YG, Chung HT, et al. Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract of Angelica uchiyamana in Activated Murine RAW 264.7 macrophages. *The Korean Journal of medical Prescription*. 2002;10(2):189-97.
 11. Park H, Jung CR, Eom AH. Species Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Isolated from Angelica gigas Nakai. *The Korean Journal of Mycology*. 2021;49(4): 497-505.
 12. Kim MY, Kwon OJ, Choo BK, Lee CW, Park EH, Kim HJ. The Effect of Angelicae gigantis radix according to Heat-process on Anti-Oxidant and Anti-Thrombotic. *Kor J Herbology*. 2015;31(3):13-22.
 13. Park KW, Choi SR, Shon MY, Jeong IY, Kang KS, Lee ST, et al. Cytotoxic Effects of Decursin from Angelica gigas Nakai in Human Cancer Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2007;36(11):1385-90.
 14. Jeong HJ, Hong SY, Lee KY, Lee JH, Lim SH, Heo NK, et al. Diabetic Effect Of Angelica gigas Nakai Leaf Extracts in Diabetes Mellitus Type II Model Mice by High Fat-fed and Streptozotocin-treated Rats. *Journal of Agricultura, Life and Environmental Sciences*. 2015;27(1):6-14.
 15. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YG, Park JH, et al. *Bonchohak*. 3rd ed. Seoul: Younglimsa. 1992;285,286,632,633.
 16. Cho YH. *Concepts of Human Physiology*. Seoul:Bummoon Education. 2011:202.
 17. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol*. 2017;66: 1300-12.
 18. Abbas AK, Lichtman AH, Phillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia:Saunders. 2012:41-88.
 19. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines*. 2017;5:34.
 20. Abbas AK, Andrew H. Lichman. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders. 2003:25,282-8,493,507.
 21. Lee SI. *Cheonjincheobangheaseol*. Seoul: Younglimsa. 1995:23.
 22. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, et al. 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.
 23. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69:625-35.
 24. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in

- LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 2000;28:217-26.
25. Paige JS, Jaffrey SR. Pharmacologic manipulation of nitric oxide signaling: targeting NOS dimerization and protein-protein interactions. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(1):97-114.
 26. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
 27. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17:1-14.
 28. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:135-45.
 29. O'Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol.* 2004;25:687-93.
 30. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv.* 2003;3:466-77.
 31. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:135-45.
 32. Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide(LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med.* 1989;170:1231-41.
 33. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide(LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990;249:1431-3.
 34. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature.* 2001;410:1099-103.
 35. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo S, Hoshino K, et al. Small antiviral compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2002;3:196-200.
 36. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.
 37. 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.
 38. Parham P. *Immune System.* 4th ed. Seoul: Lifescience Publishing. 2016:31-85.
 39. Coico R, Sunshine G. *Immunology A Short Course.* 6th ed. Seoul:Worldscience. 2012:11-9,167-72.
 40. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387-437.
 41. Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunology.* 2008;1:S61-6.
 42. 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.
 43. Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I. *Physiology, Acute Phase Reactants.* 2020[updated 2020 MAY 4]. Available from: URL:<https://www>.

- ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570/
44. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 2001; 159(2):387-97.
 45. Alam MB, Ju MK, Kwon YG, Lee SH. Protopine attenuates inflammation stimulated by carrageenan and LPS via the MAPK/NF-kappaB pathway. *Food Chem Toxicol.* 2019;131:110583.
 46. Wang H, Huang W, Liang M, Shi Y, Zhang C, Li Q, et al. (+)-JQ1 attenuated LPS-induced microglial inflammation via MAPK/NF κ B signaling. *Cell Biosci.* 2018;8:60.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Park HY, Han MH, Park C, Jin CY, Kim GY, Choi IW, et al. 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.
 50. 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.
 51. Lee JH, Choi YH, Choi BT. The anti-inflammatory effects of 2 Hz electroacupuncture w

ith different intensities on acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Int J Mol Med.* 2005;16:99-102.