

# 當歸芍藥散이 마우스 대식세포주의 NO 생성 및 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

신상우 · 이영선 · 박종현 · 권택규<sup>1</sup> · 서성일<sup>1</sup> · 권영규<sup>2\*</sup>

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실,

1: 계명대학교 의과대학, 2: 대구한의대학교 한의과대학 생리학교실

## Effects of Dangguijakyak-san Extract on Nitric Oxide Production and Cytokine Gene Expression in RAW 264.7 Macrophages Cell

Sang Woo Shin, Young Sun Lee, Jong Hyun Park, Taeg Kyu Kwon<sup>1</sup>, Seong Il Suh<sup>1</sup>, Young Kyu Kwon<sup>2\*</sup>

*Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,*

*1: School of Medicine, Keimyung University, 2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University*

The present study was conducted to evaluate the immunomodulatory effects of Dangguijakyak-san(當歸芍藥散). We investigated the effects of cell proliferation in mouse spleen cell and RAW 264.7 macrophages cells. Dangguijakyak-san enhanced mitogenic activity in the dose-response manner in mouse spleen cells and RAW 264.7 macrophages cells. In nitric oxide (NO) synthesis and iNOS mRNA expression by Dangguijakyak-san, Dangguijakyak-san alone had an effect on NO synthesis and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. NO production and iNOS mRNA expression which is excessively induced by LPS decreased after treatment of Dangguijakyak-san. The expressions of cytokine gene by Dangguijakyak-san investigated using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In RT-PCR, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expressions induced in Dangguijakyak-san-treated RAW 264.7 cells. These data indicate that 1) Dangguijakyak-san can modulate various immune response and 2) the immunomodulatory effects of Dangguijakyak-san may be, in part, associated with the regulation of NO synthesis, the expressions of these cytokine as well as the mitogenic effect on spleen cells and macrophages cells.

Key words : Dangguijakyak-san(當歸芍藥散), cell proliferation, NO, iNOS, cytokine

### 서 론

當歸芍藥散은 張仲景<sup>1)</sup>의 “金匱要略”에 수재된 처방으로, 补血活血하는 當歸, 白芍藥, 川芎과 健脾利水하는 白朮, 茯苓, 漢防風로 구성되어 있으며, 養血疏肝, 健脾利濕의 효능으로 특히 부인과 질환에 광범위하게 활용되고 있다<sup>2-4)</sup>. 산화질소 (nitric oxide; NO)는 생체내 신호전달 물질로 수많은 생리적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 여러 조직과 세포에서 L-arginine으로부터 nitric oxide synthethase (NOS)에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 이러한 NO는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 종양세포

및 세포내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능 등에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데,  $Ca^{2+}$ /calmodulin 의존성으로 단시간 소량의 NO를 생성하여 정상적인 생리기능을 담당하는 constituent NOS (cNOS)로 여기에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constituent NOS (ecNOS)가 속한다.

이외는 달리 세포내  $Ca^{2+}$ 의 농도에 비의존성이며 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 등의 자극에 의해 활성화되어 장시간 다량의 NO를 생성하는 inducible NOS (iNOS)로 나눌 수 있다. 특히 대식세포는 생

\* 교신저자 : 권영규, 대구시 수성구 상동 165번지 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : ykkwon@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2242

· 접수 : 2004/08/04 · 수정 : 2004/09/09 · 채택 : 2004/10/07

체 내에서 감염, 염증 등의 자극에 의해 NO를 생성하여 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

그러나, NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 이렇듯 NO는 상황에 따라서 세포, 조직 혹은 개체에 이로울 수도 있고 해로울 수도 있어서 상황에 맞게 NO 분비를 촉진시키던가 억제시킴으로써 인체 생리현상을 조절 할 수 있으므로, NO 생성을 조절할 수 있는 물질을 찾고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>5-13)</sup>.

사이토카인은 자연 및 특이면역의 활성화 단계 및 실행 단계에서 생산되어 염증반응을 자극하거나 저해하는 자연면역의 조절 매개자의 역할을 하며, 특정항원을 인식하여 T 세포에 의해 분비되며, 염증반응을 강하게 하거나 특수화하는데 관여하는 특이면역의 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>14-17)</sup>.

따라서, 본 연구에서는 열수 추출된 당귀작약산의 생체조절 효과를 살펴보기 위하여 *in vitro* 실험으로는 마우스 비장세포와 RAW 264.7 대식세포의 세포 증식능, RAW 264.7 대식세포의 산화질소 (NO) 생성능, LPS에 의한 NO 생성의 억제능, iNOS 유전자 발현 및 염증관련 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 대상으로 이를 효과를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 검액의 준비

실험에 사용된 藥材는 대구한의대학교 附屬 韓方病院에서 良質의 것을 精選하여 使用하였으며, 처방은 「東醫寶鑑」<sup>4)</sup>에 수재된 當歸芍藥散(Dangguijakyak-san, DGJYS)으로서 그 내용 및 1貼 當分量은 다음과 같다.

Table 1. Composition of Dangguijakyak-san(DGJYS)

Oriental Crude Drug	Crude Drug	Scientific name	Dose(g)
白芍藥 芍	PALOMA RADIX ALBA	Paeonia 'actiflora' PALL.	10
澤瀉	CNID: RHIZOMA	Cnidium officinale MAKINO	6
當歸	ALISMATIS RHIZOMA	Alisma plantago-aquatica var. orientale SAMJELS	6
當歸	ANGELICA GIGANTIS RADIX	Angelica gigas NAKAI	3
茯苓	POPIA	Popa coccinea WOLF	3
白芍	ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE RHIZOMA	Atractylodes macrocephala KOIDZ	3
Total amount			31

상기 처방의 구성약물을 2첩 분량 62g을 증류수 1,200ml를 첨가하여 2시간 동안 증탕하여 검액 700ml를 추출하였다. 추출한 검액은 멀균 거어즈를 이용하여 1次 여과한 다음 3,000 rpm에서 15분간遠心分離를 실시하여 상층액만을 채취한 다음 이를 1.2μm와 0.45μm의 membrane filter(Milipore Co., USA)로 除菌하여 使用하였다.

### 2. 실험동물 및 처치

동물은 생후 6주령된 체중 28 g 정도의 융성 ICR 마우스를 (주)대한 바이오링크로부터 구입하여 대구한의대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건 (온도: 22±2°C, 습도: 50±5%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 전 기간 동안 물과 사료 (삼양유지사료(주), 강원도 원주시)는 제한 없이 공급하였다.

### 3. 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포주를 ATCC로부터 분양 받아 2 mM glutamine이 함유된 DMEM 배지에 5% FBS, 100 U/ml penicillin-streptomycin를 첨가한 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다.

### 4. 비장세포 분리

에테르 마취 후 심장에서 혈액을 채취 후 70% 알코올로 분무한 후 무균적으로 비장을 절출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 단일 비장 세포로 만든 후 4°C, HBSS (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 용액으로 2회 세척하였다. ACK lysis 용액을 가하여 적혈구를 완전히 용혈시킨 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 배지로 한 번 더 세척한 후 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유 시켰다. 일정액을 취하여 0.4% tryphan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 살아 있는 비장 세포 수를 측정하여 사용하였다.

### 5. 비장세포 및 RAW 264.7 대식세포 증식능 실험

마우스 비장세포와 RAW 264.7 대식세포를 2×10<sup>5</sup>/100 μl 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 놓고별로 가하여, 총량이 100 μl가 되게 조정하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 48시간 배양하였다. 임파구 증식 능을 측정하기 위한 방법으로는 Promega사의 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다. 간략하게 기술하면 배양액 100 μl에 시약을 20 μl첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 1시간 30분 배양한 후 ELISA reader 490 nm에서 측정하였다. 임파구 증식 결과는 실험군의 [(평균 O.D.) - (평균background O.D)±S.D] 값으로 표시하였다.

### 6. Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>-의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 μl 와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100 μl를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub>-의 농도는 sodium nitrate를 회석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

## 7. RT-PCR (역전사 중합효소 연쇄반응)

RNA분리는 TRIzol을 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 TRIzol 900  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 균질화 시켰다. 여기에 클로로포름 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 15분간 얼음에 정지 시켰다. 그 후 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 45분 정지한 후 원침하고, 70% DEPC-에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer에서 농도를 결정하였다. 5x RT buffer 2  $\mu\text{l}$ , 10 mM dATP 0.25  $\mu\text{l}$ , 10 mM dGTP 0.25  $\mu\text{l}$ , 10 mM dTTP 0.25  $\mu\text{l}$ , 10 mM dCTP 0.25  $\mu\text{l}$ , MMLV reverse transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , RNase inhibitor (28 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{M}$  oligo dT primer 0.5  $\mu\text{l}$ , DEPC-DW 4  $\mu\text{l}$ 를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들고 여기에 total RNA를 첨가하였다. 이 시험관을 PCR machine (PTC-100TM Programmable Thermal Controller; MJResearch, Inc.)에 넣어 42°C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다.

PCR은 먼저 10x PCR buffer 3  $\mu\text{l}$ , 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8  $\mu\text{l}$ , 10 mM dATP 0.3  $\mu\text{l}$ , 10 mM dGTP 0.3  $\mu\text{l}$ , 10 mM dTTP 0.3  $\mu\text{l}$ , 10 mM dCTP 0.3  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{M}$  sense 및 antisense primer 0.25  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ , Promega Co.) 0.25  $\mu\text{l}$ 를 혼합하고, 여기에 D.W.를 넣어 최종 용액량이 20  $\mu\text{l}$ 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 5  $\mu\text{l}$ 를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94°C에 3분간 1 cycle 반응 후, 94°C 45초, 57°C 45초, 72°C 45초간 35 cycles 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동 하여 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오나아사 (Bioneer Co. Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

Table 2. Primer sequence used for detection of cytokine and inflammatory related gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3' 5'-CAT GTC GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
L-1 $\alpha$	5'-CAC TAT CTC ACC ACC ACT TG-3' 5'-CTG GAA GTC TGT CAT AGA GG-3'
L-1 $\beta$	5'-CCG TGG ACC TTC CAG GAT GA-3' 5'-GAT CCA CAC TCT CCA GCT GC-3'
IL-6	5'-AGA GGA GAC TTC ACA GAG GA-3' 5'-ATC TCT CTG AAC GAC TCT GG-3'
GM-CSF	5'-CGA TGT GGC TGC AGA ATT TAC TT-3' 5'-TCA TTT TTG GAC TGG TTT TTT GCA-3'
INOS	5'-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3' 5'-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

## 8. 통계 처리법

실험 결과는 mean $\pm$ S.D 또는 mean $\pm$ S.E로 나타내었으며, ANOVA test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

## 결과

### 1. 당귀작약산의 비장세포증식 및 RAW 264.7 대식세포 증식능에 미치는 영향

당귀작약산의 정상 면역관련 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포의 증식능을 관찰하였다. 마우스 비장 세포를 분리 후 in vitro 상에서 여러 가지 농도 (0, 10, 100, 1000, 2000  $\mu\text{l}/\text{ml}$ )의 당귀작약산을 처리하여 이에 대한 비장 세포 증식능을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 당귀작약산의 처리 시 비장세포의 증식능이 대조군에 비해 각각 94, 97, 196 및 236% 용량 의존적으로(p<0.05) 증가됨이 관찰되었다(Fig. 1). 양성대조군으로 사용된 LPS (6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 자극시 비장 세포증식능은 대조군에 비해 193% 증가되었다. 당귀작약산의 RAW 264.7 대식세포 증식능에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 당귀작약산을 각 용량별 (0, 10, 100, 1000, 2000  $\mu\text{l}/\text{ml}$ )로 48시간 배양하여 당귀작약산의 대식세포증식에 미치는 영향을 관찰하였다. RAW 264.7 대식세포의 증식능은 양성대조군으로 사용한 LPS자극에 의해서 유의성 있게 증가되었으며, 당귀작약산의 농도별 처리에 의해 대조군에 비해 유의성 있게 세포증식이 증가되었다(Fig. 2).

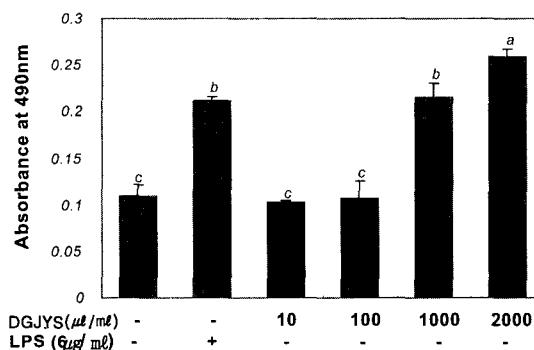


Fig. 1. Dose response of Dangguijakyak-san(DGJYS) on the proliferation of mouse spleen cell. Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured with several concentration (0, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) of Dangguijakyak-san for 48hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates significant difference (p<0.05).

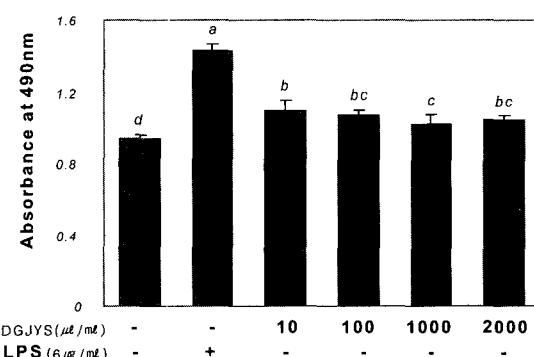


Fig. 2. Dose response of Dangguijakyak-san(DGJYS) on the proliferation of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured with several concentration of Dangguijakyak-san for 48 hr. Control group was incubated with DMEM only. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. in triplicate cultures.

## 2. 당귀작약산의 NO 생성에 미치는 효과

당귀작약산 자체의 NO 생성능을 살펴보기 위해서 당귀작약산을 농도별로 RAW 264.7 대식세포에 처리하여 생성되는 NO 양을 측정하였다. 대조군에서는  $4.33 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며, 당귀작약산 농도별( $10 \mu\text{l}$ ,  $100 \mu\text{l}$ ,  $1000 \mu\text{l}$  및  $2000 \mu\text{l}/\text{ml}$ )에서는 각각  $4.24 \pm 0.09$ (98%),  $4.44 \pm 0.08$ (103%),  $4.78 \pm 0.11$ (110%) 및  $5.22 \pm 0.11$ (121%) $\mu\text{M}$ 로 당귀작약산의 농도 의존적으로 NO 생성이 증가됨이 관찰되었다(Fig. 4).

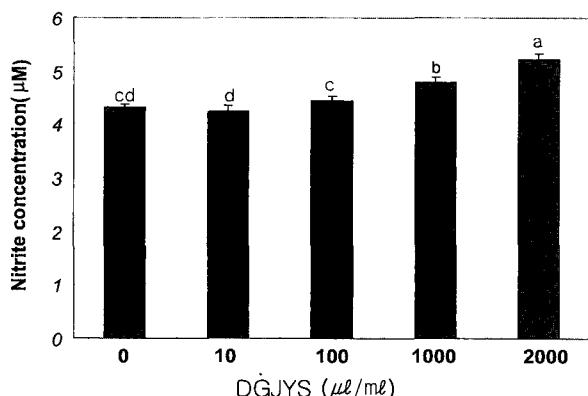


Fig. 3. Dose-dependent effect of Danggijakyak-san(DGJYS) on NO synthesis in RAW 264.7 cells. The cells were incubated with  $1 \mu\text{l}/\text{ml}$  to  $100 \mu\text{l}/\text{ml}$  HSD for 24 h. NO synthesis was determined by measuring accumulation of nitrite in the incubation medium. The data present the means for triplicate, and the bars represent the standard deviation. \* $p<0.05$  compared with untreated samples.

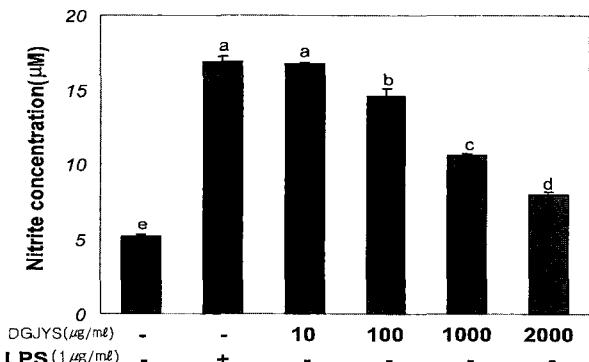


Fig. 4. Effect of Danggijakyak-san(DGJYS) on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with or without lipopolysaccharide (LPS;  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hr in the presence or absence of HSD at indicated doses. The amount of NO released by cells was measured by the method of Gress. Data are mean $\pm$ S.D. of three independent experiments.

## 3. 당귀작약산의 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제효과

LPS 자극에 의해 과다하게 생성되는 NO 양에 당귀작약산이 미치는 효과를 관찰하기 위하여 LPS 자극시 당귀작약산을 첨가하여 NO생성에 미치는 효과를 조사하였다. LPS를 단독으로 처리하였을 경우  $16.92 \pm 0.35 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으나, LPS와 당귀작약산을 혼합하여 배양된 세포에서 NO 생성량은 당귀작약산의 농도별 ( $10 \mu\text{l}$ ,  $100 \mu\text{l}$ ,  $1000 \mu\text{l}$  및  $2000 \mu\text{l}/\text{ml}$ )에 따라 각각  $16.76 \pm 0.11$  (1%),  $14.63 \pm 0.41$  (14%),  $10.59 \pm 0.14$  (27%) 및  $8.03 \pm 0.14$

(53%)로 당귀작약산의 용량 의존적으로 LPS자극에 의한 NO 생성량이 억제됨이 관찰되었다. 또한 당귀작약산  $1000 \mu\text{l}/\text{ml}$ 을 LPS와 함께 처리하여 시간별에 따른 NO 생성에 관하여 실험한 결과, 그림 4에서와 같이 LPS 단독 처리군에서는 다른 실험군에 비해 8 시간부터 NO 생성량이 증가되었으나, 당귀작약산과 함께 처리함으로 인하여 NO 양의 증가가 억제됨이 관찰되었다(Fig. 5).

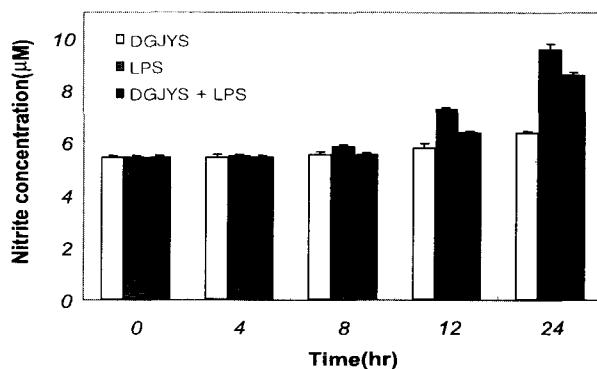


Fig. 5. Time kinetics of Danggijakyak-san(DGJYS) on NO synthesis in RAW 264.7 cells. The cells were incubated with  $100 \mu\text{l}/\text{ml}$  HSD for various time points (1, 4, 8, 12, 24 hr) in the presence or absence of  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS. NO synthesis was determined by measuring accumulation of nitrite in the incubation medium. The data present the means for triplicate.

## 4. 당귀작약산에 의한 RAW 264.7 세포에서 iNOS 유전자 발현효과

NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 당귀작약산 단독 처리시  $2000 \mu\text{l}$ 에서는 iNOS 유전자 발현이 약하게 관찰되었다. 그리고, LPS 자극에 의해 iNOS 유전자 발현이 강하게 유도되었으나, LPS와 당귀작약산을 동시에 처리시 당귀작약산 농도 의존적으로 iNOS 유전자 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 6).

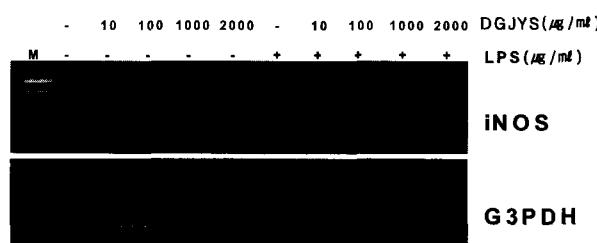


Fig. 6. Inhibition of iNOS mRNA expression by Danggijakyak-san(DGJYS) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS in the presence or absence of various concentrations of HSD for 24 hr. Total RNA was prepared, and iNOS mRNA was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes.

## 5. 당귀작약산의 염증관련 사이토카인 유전자 발현에 미치는 효과

대식세포에서 당귀작약산의 염증관련 cytokine 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하기 위하여 당귀작약산을 농도별로 대식세포에 처리 후 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 GM-CSF 유전자 발현을 RT-PCR로 조사하였다. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 경우 당귀작약산  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$

/mℓ과 2000μg/mℓ에서 이들 유전자 발현이 관찰되었으며, IL-6의 경우 2000μg/mℓ에서 유전자 발현이 약하게 관찰되었다. GM-CSF의 경우 당귀작약산 농도 1000μg/mℓ에서 강하게 발현이 유도되었다가 2000μg/mℓ에서 발현이 다소 감소되었다(Fig. 7).

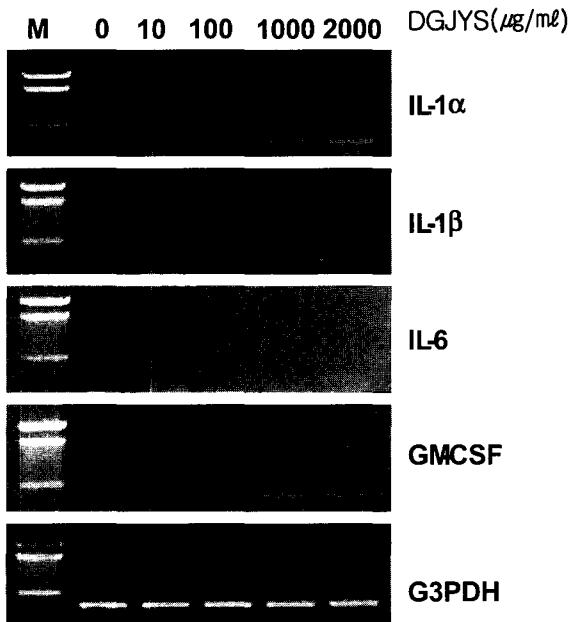


Fig. 7. Cytokine gene expression in RAW 264.7 cells by Dangguijakyak-san(DGJYS). RAW 264.7 cells were stimulated with various amount of HSD for 24 hr. Total RNA was prepared from each sample and RT-PCR were performed as described in materials and methods. G3PDH was used as control genes.

## 고 찰

當歸芍藥散은 張仲景<sup>1)</sup>의 「金匱要略」에 수재된 처방으로, 补血活血하는 当歸, 白芍藥, 川芎과 健脾利水의 白朮, 茯苓, 潤瀉로 구성되어 있다. 补血의 대표적인 처방인 四物湯에서 熟地黃이 빠진 白芍藥, 当歸, 川芎은 滋養強壯作用을 가져서 全身을 營養滋潤하고 內分泌機能을 조정하여 血虛를 개선하고 또한 血行을 촉진한다. 白朮, 茯苓, 潤瀉는 組織속이나 소화관내의 잉여수분을 血中으로 끌어들이고 利尿作用을 통하여 排泄하므로 浮腫을 消退시키며 下痢를 멎게 한다. 따라서, 当歸芍藥散은 이상 6종의 약물이 배합되어 養血疏肝, 健脾利濕의 효능으로 產後泄痢, 妊娠通治 등 부인과질환 전반에 多用되고 있다<sup>24)</sup>.

임파구 증식능의 측정은 세포활성의 지표로 각종 마이토겐, 항원, 사이토카인, 성장인자 등 여러 종류의 자극에 의하여 초래된 새로운 DNA합성과 더불어 세포분열의 결과로 나타나는 하나의 과정으로 알려져 있다<sup>18-20)</sup>. 이번 실험 결과 당귀작약산의 농도의존적으로 비장세포 증식능이 증가되었는데, 이는 당귀작약산이 직접 mitogen으로 작용될 수 있음을 간접적으로 제시하는 결과라 할 수 있다.

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체내에서 감염, 염증등의 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>21-23)</sup>. 당귀작약산 첨가 시 대식세포에 관한 증

식능이 고농도에서 관찰되었다. 이러한 결과는 당귀작약산 자체가 대식세포 증식능에도 직접 mitogen으로 작용 할 수 있음을 제시해주는 결과라 할 수 있다. 대식세포에서 생성되는 NO는 작고 불안정한 무기ガ스로 신경전달, 혈액응고, 혈압조절 및 종양 세포나 세포 내 기생 생물에 대한 숙주의 방어기능 등에 관여하는 것으로 보고되고 있으며<sup>25)</sup>, 낮은 농도에서의 NO는 신경전달 물질들과 같은 작용을 하나, 고 농도에서는 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래 할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근에는 이러한 NO의 조절을 유도함으로 숙주의 생리작용을 조절할 수 있는 천연물에 관한 다양한 연구가 수행되고 있다<sup>20-23)</sup>. 이번 실험에서 당귀작약산의 NO 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과 당귀작약산의 농도의존적으로 NO생성이 증가하였으며, 또한 LPS로 처리 시 과도하게 증가된 NO 생성을 농도의존적으로 감소 시켰다. NO 생성에 iNOS 유전자 발현의 관련성이 관하여 많은 보고가 있으므로 당귀작약산의 NOTod성에 iNOS 유전자 발현의 관련성을 살펴본 결과 당귀작약산의 고농도에서 iNOS 유전자 발현이 관찰되었으며, LPS에 의한 iNOS 유전자 발현이 당귀작약산의 농도의존적으로 감소됨이 관찰되었다. 이는 당귀작약산의 NO 생성의 조절에 iNOS 유전자 발현이 관여하고 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

대식세포는 LPS와 IFN-γ와 같은 물질에 의해 T 세포와 B 세포의 증식, 식균작용을 위한 대식세포의 활성, 미생물 감염에 대한 방어와 같은 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 그리고 TNF와 같은 사이토카인의 분비를 정확하게 조절함으로 생리, 면역반응에 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>24-27)</sup>. 당귀작약산 처리에 의한 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포주에서 IL-1α, IL-1β 및 IL-6의 유전자 발현이 관찰되었으며, GM-CSF의 경우 당귀작약산 농도 1000μg/mℓ에서 강하게 발현이 유도되었다가 2000μg/mℓ에서 발현이 다소 감소되었다. 이러한 실험 결과는 당귀작약산의 생리현상 조절에 이를 생리활성작용에 관여하는 인자들이 관여함을 나타내 주는 것이라 할 수 있다.

이러한 조절기능을 볼 때 당귀작약산은 생체의 적절한 면역반응을 유도하여 생체의 면역반응을 증대시킴과 동시에 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 생물 활성 조절자 (BMR)로 작용할 수 있음을 시사한다고 할 수 있다.

## 결 론

열수추출된 당귀작약산의 생체조절 효과를 실험적으로 평가하고자 마우스 비장세포에 거의 증식능에 미치는 효과, 대식세포에서의 세포증식능, NO 생성능, iNOS 유전자 발현 및 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

당귀작약산은 비장세포의 증식능을 당귀작약산 농도의존적으로 증가시켰으며, RAW 264.7 대식세포의 증식능 또한 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가 시켰다. 당귀작약산은 RAW 264.7 대식세포에서 당귀작약산의 농도의존적으로 NO생

성을 증가시켰으며, LPS로 처리에 의해 과도하게 증가된 NO 생성을 농도 의존적으로 감소 시켰다. 이러한 당귀작약산의 NO 생성 및 억제에는 iNOS 유전자 발현이 관여함이 관찰되었다. 당귀작약산에 의한 RAW 264.7 대식세포에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 GM-CSF 유전자 발현이 관찰되었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 당귀작약산은 생체에 면역반응 조절과 같은 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 생물 활성 조절자 (BMR)로 작용할 수 있으리라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원 (02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

## 참고문헌

- 張仲景. 仲景全書. 서울; 大星文化社, 1984:428,438.
- 金匱要略. 金匱要略辨釋. 제천; 한의문화사, 2001:548,603.
- 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울; 隋聖堂, 1998:506-7.
- 許浚. 東醫寶鑑. 서울; 南山堂, 1994:624.
- 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화 질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39, 52-63, 1999.
- Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol 35, 21-28, 2000.
- Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci 69, 625-635, 2001.
- Ishihara T, Okura T, Kohno K, Tanimoto T, Ikegami H, Kurimoto M. Polygonum tinctorium extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. J Ethnopharmacol 72, 141-150, 2000.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol 406, 301-309, 2000.
- 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 76, 119-123, 2001.
- Kim NY, Kang TH, Song EK, Pae HO, Chung HT, Kim YC. Inhibitory effects of butanol fraction of the aqueous extract of Forsythia koreana on the nitric oxide production by murine macrophage-like RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 73, 323-327, 2000.
- 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 28, 217-226, 2000.
- Gow-Chin Yen, Hsi-Huai Lai, Hsin-Yi Chou. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of Uraria crinita root. Food Chemistry 74, 471-478, 2001.
- Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to Candida albicans. J Microbiol Biotechnol. 10, 8-15, 2000.
- Okamura S, Shimoda K, Yu LX, Omori F, Niho Y. A traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-yoei-to) augments the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Int J Immunopharmacol. 13, 595-598, 1991.
- 김종수, 신상습, 김철호, 박선동, 박원환. 신수혈의 침자극과 황기약침이 실험용 생쥐의 면역활성물질인 cytokine의 IL-6 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지 15, 147-155, 1998.
- 송봉근, 이언정, 김형균, 진선우, 김성재, 김동혁. 황기가 면역세포의 기능에 미치는 영향. 대한본초학회지(본초분과학회지) 13, 115-128, 1998.
- Mizuno M, Yamada J, Terai H, Kozukue N, Lee YS, Tsuchida H. Differences in immunomodulating effects between wild and cultured Panax ginseng. Biochem Biophys Res Commun 200, 1672-1678, 1994.
- 박종욱, 한인숙, 서성일, 백원기, 서민호, 배지현, 최병길. 인삼 사포닌이 인간면역계 사이토카인 유전자의 발현에 미치는 영향. 고려인삼학회지 20, 15-22, 1996.
- 정태준, 김정목, 조양자, 정용훈, 임대철. 마이토젠 및 립포카인이 마우스 비장 세포 임파구 및 사람 말초 혈액 임파구 증식 반응에 미치는 영향. 대한면역학회지 11, 89-96, 1989.
- 박재승, 이정호, 하대유. Capsaicin 전처치가 마우스 대식세포의 기능에 미치는 영향. 대한면역학회지 22, 39-49, 2000.
- Haslberger A, Romanin C, Koerber R. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. Mol Biol Cell 3, 451-460, 1992.
- Shacter E, Arzadon GK, Williams JA. Stimulation of interleukin-6 and prostaglandin E2 secretion from peritoneal macrophages by polymers of albumin. Blood 82, 2853-2864, 1993.