

荊芥蓮翹湯이 lipopolysaccharide로 유도된 nitric oxide의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현, cytokine에 미치는 영향

김민지¹ · 이종록¹ · 김상찬^{1,2} · 지선영^{1*}

1: 대구한의대학교 한의과대학, 2: 한방신약개발연구팀(BK21)

Inhibitory Effect of Hyeonggaeyeongyo-tang Water Extract on production of Nitric Oxide, IL-6 and Expression of iNOS, COX-2 in LPS - Activated Raw 264.7 Cells

Min Ji Kim¹, Jong Rok Lee¹, Sang Chan Kim^{1,2}, Seon Young Jee^{1*}

1: College of Oriental Medicine, 2: Development Team for The New Drug of Oriental Medicine (BK21 program), Daegu Haany University

Hyeonggaeyeongyo-tang (HYT; Jingjelianqiao-tang), is known to be effective in lowering wind-heat blended as a pathogen of kidney. HYT has been traditionally used for the treatment of a syndrome in kidney meridian, due to invasion of pathogenic wind and heat. Nowadays, this prescription is used to treat diseases marked by excessive wind and heat in the kidney meridian, such as acute otitis media, empyema, hypertrophic rhinitis, nasal bleeding, nasal obstruction, acne and tonsillitis. The present study was conducted to evaluate the effect of HYT on the regulatory mechanism of cytokines and nitric oxide (NO) for the immunological activities in Raw 264.7 cells. After the treatment of HYT water extract, cell viability was measured by MTT assay, NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were determined by immunoblot analysis, and levels of cytokine were analyzed by sandwich immunoassays. The production of NO was significantly inhibited by pre-treatment (1h) with HYT(0.1-3.0 mg/ml) on LPS-activated Raw264.7 cells. The expression of iNOS and COX-2 protein were up-regulated by LPS, but the increased levels of iNOS and COX-2 were inhibited by pre-treatment of HYT (0.3-1.0 mg/ml), respectively. And the level of interleukin-6 (IL-6), cytokine released from macrophage, was reduced by HYT pre-treatment (0.3-1.0 mg/ml). Thus, the present data suggest that HYT may play an important role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

Key words : Hyeonggaeyeongyo-tang, LPS, macrophage, iNOS, cytokine

서론

荊芥蓮翹湯은 萬病回春에 처음 수록된 方으로, 荊芥 連翹 防風 當歸 川芎 白芍 柴胡 枳殼 黃芩 山梔 白芷 桔梗 甘草로 구성되어, 腎經風熱로 인한 兩耳腫痛을 치료하는 方劑이다¹⁾.

荊芥蓮翹湯에 대한 연구로는 신²⁾등이 알레르기성 비염환자의 치료에 荊芥蓮翹湯加味가 유효함을 보고하였고, 오³⁾등이 荊

芥蓮翹湯 및 그 구성약물은 Klebsiella pneumoniae에 대한 항균 효과가 있음을 보고하였으며, 이⁴⁾, 박⁵⁾과 양⁶⁾등이 소아 재발성 삼출성 중이염에 加味荊芥蓮翹湯이 유효함을 보고하였으며, 박⁷⁾등이 荊芥蓮翹湯과 加味荊芥蓮翹湯은 자연성과민성반응, 혈관투과성반응, 국소부종에 유효함을 보고하였다.

그러나, 아직 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 매개로 하는 염증반응에 대한 荊芥蓮翹湯에 대한 연구는 아직 밝혀져 있지 않으므로, 본 연구에서는 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 Raw cell에 荊芥蓮翹湯을 처치하여 이와 관련된 단백질 및 cytokine을 연구하였다.

LPS는 endotoxin으로서, septic shock syndrome을 유발시키

* 교신저자 : 지선영, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : jeesy@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2130

· 접수 : 2007/03/23 · 채택 : 2007/04/09

기도 하고, 또한 NO, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins, prostanoids, leukotrien과 같은 염증 매개물들을 생산을 유도하므로^{8,9)}, 일반적인 염증의 *in vitro* 연구에 활용된다.

일반적으로, 대식세포는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 reactive oxygen species(ROS) 와 TNF- α 및 IL-6와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 TNF- α 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고 되고 있다¹⁰⁻¹⁵⁾. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 靑黛¹⁶⁾, 苦楝皮¹⁷⁾, 香附子^{18,19)}, 當歸²⁰⁾, 款冬花²¹⁾ 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서, 본 연구는 열수추출된 荊芥蓮翹湯(HYT)이 NO production, iNOS, cyclooxygenase - 2 (COX-2)발현 및 IL-6, TNF- α 등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

荊芥蓮翹湯의 처방구성은 萬病回春²⁾에 기재되어 있다. 그러나, 약물의 용량은 “荊芥 連翹 防風 當歸 川芎 白芍 柴胡 枳殼 黃芩 山梔 白芷 桔梗 各等分 甘草 半減”¹⁾으로만 되어 있어, 본 연구에서는 方藥合編²²⁾의 용량에 준하여 실험하였다. 荊芥蓮翹湯 (Youngnam pharm, Daegu, Korea) 5첩분량인 167.2g을 물 2.5 L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거여조로 1차 여과하고 3000 \times g에서 3분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 荊芥蓮翹湯 (HYT)의 수율은 19.72%였으며 실험에서 荊芥蓮翹湯추출물을 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 녹여 사용하였다.

Table 1. The composition of Hyeonggaeyeongyo-tang used in this study.

藥材名	생약명	용량
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	2.63
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	2.63
防風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	2.63
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2.63
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2.63
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	2.63
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	2.63
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	2.63
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2.63
山梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2.63
白芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	2.63
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	2.63
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.88
總量		33.44

2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (서울)에서 구입하였으며, DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cell은 80~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

3. 시약

LPS (*Escherichia coli* 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (USA), Cayman (USA), Zymed (USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (USA)에서 구입하였다. TNF- α 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well로 분주한 다음 荊芥蓮翹湯을 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.3~1.0 mg/ml의 농도로 荊芥蓮翹湯을 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100 \times (absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 μ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO₂의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell

lysates를 10,000×g로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였다. iNOS와 COX-2 protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

7. Cytokine의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cells (1×10^6 /ml)을 분주하고 HYT을 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리후 6-12시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70°C 에서 보관하였다. TNF- α 와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

8. 통계적 검증

실험 결과는 mean±S.D로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. HYT가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 NO의 생성은, LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS농도 의존적으로 증가하였으며, HYT를 0.1과 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 6h, 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, HYT 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 실험 전시간에 걸쳐 유의한 NO생성억제를 나타내었으며, HYT 3.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 18h, 24h에서 유의한 억제를 나타내었다 (Fig. 1).

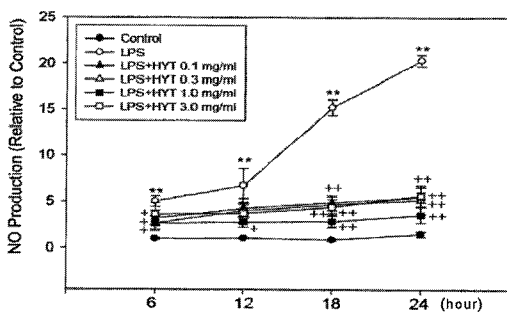


Fig. 1. Effects of HYT on the production of NO in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of HYT dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. *: significant as compared to control, ** $P < 0.01$, +: significant as compared to LPS alone, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$

2. HYT가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

HYT가 NO를 감소시킨 것이, HYT의 세포독성으로 인한 세포의 수적저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, HYT의

cell viability를 측정하였다. 실험결과 LPS는 12~24 h에서 control 보다 유의성있는 세포사를 유도하였다. 그러나, HYT는 12~24 h에서 LPS로 인한 세포사를 보호하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는, HYT가 NO의 생성을 억제한다는 앞의 결과가 Raw cell의 절대적 수의 감소에 기인하는 것이 아니라는 것을 의미한다 (Fig. 2).

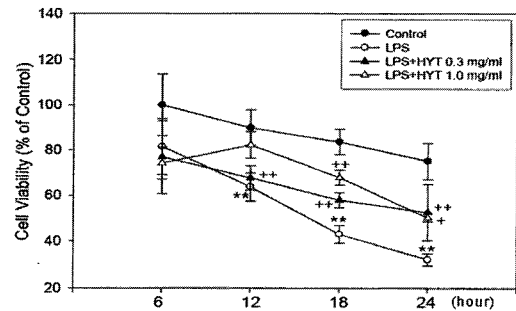


Fig. 2. Effects of HYT on the cell viability in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of HYT dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), and the cells were further incubated for 6-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the Experimental procedures. *: significant as compared to CON, ** $P < 0.01$, +: significant as compared to LPS alone, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$

3. HYT가 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS 발현에 미치는 영향

LPS처리시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 HYT 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었으며, HYT 1.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 HYT를 동시처리시 HYT 농도 의존적으로 iNOS단백질의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

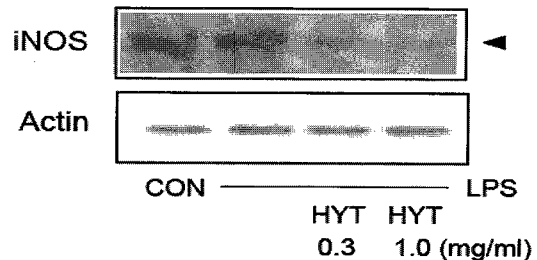


Fig. 3. Effect of HYT on the induction of iNOS by LPS. Inhibition of LPS-stimulated iNOS protein expression by HYT. The level of iNOS protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) with or without HYT pretreatment (i.e. 1h before LPS)

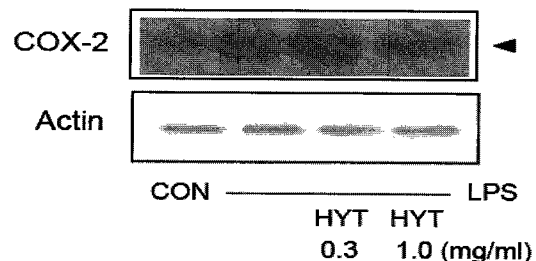


Fig. 4. Effect of HYT on the induction of COX-2 by LPS. Inhibition of LPS-stimulated COX-2 protein expression by HYT. The level of COX-2 protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) with or without HYT pretreatment (i.e. 1h before LPS)

4. HYT가 LPS로 유도된 Raw cell의 COX-2발현에 미치는 영향
LPS, TNF- α 등에 의해 NF κ B의 활성화를 경유하는^{23,24} COX-2는 LPS처치시에는 강하게 유도되었다. LPS에 HYT 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량에 큰 변화가 관찰되지 않았으나, HYT 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서의 COX-2 발현량은 현저히 감소하였다 (Fig. 4).

5. HYT가 LPS로 유도된 Raw cell의 TNF- α 에 미치는 영향
TNF- α 는 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 하며²⁵, tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다²⁶. 본 실험에서 LPS는 6~12 h에서 TNF- α 의 분비를 유의하게 촉진시켰다. HYT를 6 h 처치한 실험군에서는 유의한 감소를 유도하지 못하였다. 1.0 mg/ml의 HYT를 12 h 처치한 실험군에서는 미약한 억제 경향을 나타내었다 (Fig. 5).

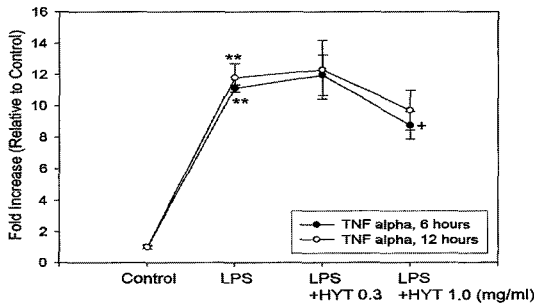


Fig. 5. The effect of HYT on LPS-stimulated TNF- α production. Production of TNF- α was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of HYT for 6 h. The amount of TNF- α was measured by immunoassay as described in Experimental procedures. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. *: significant as compared to control, **P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, +P < 0.05

6. HYT가 LPS로 유도된 Raw cell의 IL-6에 미치는 영향
IL-6는 B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진한다. 또한 IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 경향을 나타낸다²⁶. 본 실험에서 LPS는 6~12 h에서 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, HYT 0.3 및 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 유의성있게 감소시켰다 (Fig. 6)

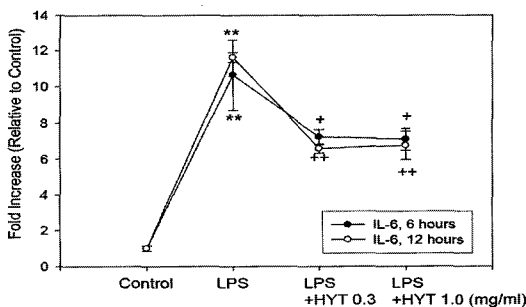


Fig. 6. The effect of HYT on LPS-stimulated IL-6 production. Production of IL-6 was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of HYT for 6 and 12 h. The amount of IL-6 was measured by immunoassay as described in Experimental procedures. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. *: significant as compared to control, **P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, +P < 0.05, ++ P < 0.01

고찰

荊芥蓮翹湯은, 萬病回春¹⁾에 처음 수록된 方으로, 荊芥 蓮翹 防風 當歸 川芎 白芍 柴胡 枳殼 黃芩 山梔 白芷 桔梗 甘草로 구성되어, 腎經風熱로 인한 兩耳腫痛을 치료하는 方劑이다. 또한 단병회춘에는 膽의 熱이 腦로 轉移하여 발생한 鼻淵을 치료하는 荊芥蓮翹湯이 있으며, 처방의 구성에 있어서는 枳殼대신 薄荷가 들어간 차이가 있다¹⁾. 荊芥 蓮翹 防風 當歸 川芎 白芍 柴胡 枳殼 黃芩 山梔 白芷 桔梗 甘草로 구성된 荊芥蓮翹湯은 腎經風熱에 의한 耳腫, 耳痛, 耳膿을 치료하는 처방이며, 風熱이 上發하여 頭上諸證을 야기시킨 것을 다스리며, 체질개선제로 널리 응용되는 처방이다. 清熱, 和血, 解毒作用이 있기 때문에, 耳病뿐만 아니라 中耳炎, 扁桃腺炎 또는 青年期 腺病質者의 諸證에 응용된다⁷⁾.

처방중의 荊芥, 蓮翹, 防風은 散風熱하여 消腫하고, 當歸, 川芎은 和血行血하여 諸經의 血凝氣聚를 散하며, 白芍藥, 白芷는 除風止痛하고, 柴胡, 黃芩, 梔子是 少陽火를 瀉하며, 桔梗, 枳殼은 胸膈을 利하게 하고 快氣宣通하며, 甘草는 諸藥을 和하고 急迫을 緩和한다²⁷⁾.

荊芥蓮翹湯에 대한 연구로는, 신²⁾등이 알레르기성 鼻炎환자의 치료에 있어서 88%의 환자에게서 荊芥蓮翹湯加味가 유효함을 보고하였으며, 오³⁾등이 荊芥蓮翹湯 및 구성약물이 *Klebsiella pneumoniae*에 대해 항균효과를 나타냄을 보고하였다. 또한, 양⁴⁾등은 소아 재발성 삼출성 중이염에 加味荊芥蓮翹湯을 투여한 결과 pneumatoscopy를 통한 고실소견, impedance audiometry를 통한 고실도 소견, 청력검사를 통한 역치변화, 방사선검사를 통한 함기도변화에 있어서 加味荊芥蓮翹湯투여군이 항생제 투여군보다 치료가 높음을 보고하였고, 박⁵⁾등은 소아 재발성 삼출성 중이염에 加味荊芥蓮翹湯을 투여하고, 중이강 삼출액 내에서 Ig-G 아형 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)을 관찰한 결과 加味荊芥蓮翹湯투여군이 항생제투여군보다 우수한 결과를 나타냄을 보고하였으며, 이⁶⁾등은 소아의 재발성삼출성 중이염에 加味荊芥蓮翹湯을 투여하고, 중이강삼출액내의 IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α 등의 cytokine에 미치는 영향을 평가하였다. 그리고, 박⁷⁾등은 荊芥蓮翹湯과 加味荊芥蓮翹湯이 picryl chloride에 의한 지연성과민성반응, histamine에 의한 혈관투과성반응, carageenin에 의해 유발된 국소부종에 유효함을 보고하였으나, 아직 iNOS를 매개로 하는 염증반응에 대한 荊芥蓮翹湯에 대한 연구는 아직 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 열수추출된 荊芥蓮翹湯(YST)이 LPS로 activated된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하였다. LPS는 endotoxin으로서, septic shock syndrome을 유발시키기도 하고, 또한 NO, TNF- α , interleukins, prostanoids, leukotrien과 같은 염증 매개물들을 생산을 유도하므로^{8,9)}, 일반적인 염증의 in vitro 연구에 활용된다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 하며, 염증의 과정에 있어서 중요한 인자 중의 하나로 작용한다^{9,28)}.

Inducible NOS (iNOS)는 염증시 대량으로 생성되고, 구조를 이루는 (constitutively expressed) NOS (cNOS)는 저농도에서 생리적으로 작용한다²⁹⁾. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{18,30)}. 이와는 달리 iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- α (TNF α) 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸⁾. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 HYT의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 HYT를 0.1-3.0 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS농도 의존적으로 증가하였으며, HYT를 0.1과 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 6h, 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, HYT 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 실험 전시간에 걸쳐 유의한 NO생성억제를 나타내었다. 또한 HYT 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 18 h, 24h에서 유의한 억제를 나타내었다. HYT가 0.3 및 1.0mg/ml (6~24 h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, HYT의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, HYT의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 LPS는 12~24 h에서 control보다 유의성있는 세포사를 유도하였다. 그러나, HYT는 12~24 h에서 LPS로 세포사를 보호하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는, HYT가 NO의 생성을 억제한다는 앞의 결과가 Raw cell의 수적 감소에 기인하는 것이 아니라 HYT자체에 어떠한 NO의 생성 억제기작이 있음을 의미한다.

이러한 HYT의 NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 HYT 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 양이 줄어들었으며, HYT 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 양이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 HYT를 동시처리시 HYT 농도 의존적으로 iNOS단백질의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

한편, COX-2는 prooxidant나 proinflammatory stimuli (i.e. TPA, LPS, TNF α , ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NF κ B의 활성화를 경유하여 생성되고, prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다^{23,24)}. 또 Monocyte에서 COX-2의

발현은 proinflammatory agent인 IL-1 β , TNF- α 와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다³¹⁾. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료의 target molecule이 되고 있다²⁵⁾. 본 실험에서 LPS처치시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 HYT 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 양에 큰 변화가 관찰되지 않았지만, HYT 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 발현량이 현저히 줄어들었다.

TNF- α 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다²⁵⁾. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- α 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다²⁶⁾. 본 실험에서 LPS는 6~12 h에서 TNF- α 의 분비를 유의하게 촉진시켰으나, HYT를 6 h 처치한 실험군에서는 유의한 감소를 유도하지 못하였다. 그러나, 1.0 mg/ml의 HYT를 12 h 처치한 실험군에서는 미약한 억제 경향을 나타내었다.

Monocyte나 macrophage에서 분비되는 cytokine중의 하나인 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다²⁶⁾. 본 실험에서 LPS는 6~12 h에서 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, HYT 0.3 및 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 유의성있게 감소시켰다.

결론

腎經風熱로 인한 兩耳腫痛을 치료하는 荊芥蓮翹湯의 물추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 nitric oxide의 production, iNOS 및 COX-2의 expression, cytokine의 level에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

HYT를 0.1과 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 6~24 h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, HYT 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 실험 전시간에 걸쳐 유의한 NO생성억제를 나타내었다. 세포생존율을 측정한 결과 LPS는 12~24 h에서 control보다 유의성있는 세포사를 유도하였으나, HYT는 12~24 h에서 LPS로 인한 세포사를 억제하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 HYT를 처치한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 HYT의 농도의존적으로 감소하였다. LPS처치시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었고, HYT 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 발현량이 현저히 감소하였다. LPS는 6~12 h에서 TNF- α 의 분비를 유의하게 촉진시켰으나, HYT를 6 h 처치한 실험군에서는 유의한 감소를 유도하지 못하였다. 1.0 mg/ml의 HYT를 12 h 처치한 실험군에서는 유의성있는 억제를 나타내었다. LPS는 6~12 h에서 IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, HYT 0.3 및 1.0 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 유의성있게 감소시켰다.

이러한 결과는 荊芥蓮翹湯이 gram-negative bacterial

infection에 의한 염증 또는, 과량의 nitric oxide 및 과량의 proinflammatory cytokine생성과 관련된 면역증상의 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원 한방바이오퓨전연구지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다. (Grant No. B050035)

참고문헌

1. 龔廷賢. 萬病回春(下冊). 大中國圖書公司. 台北. p 12, 14, 1986.
2. 신경숙, 노석선. 荊芥蓮翹湯加味가 알레르기성 비염에 미치는 효능에 대한 임상보고. 혜화의학. 1(3):185-196, 1994.
3. 오은영, 지선영, 서부일. 荊芥蓮翹湯 및 구성약물의 Klebsiella pneumoniae에 대한 항균효과에 관한 연구. 본초학회지 18(2):109-119, 2003.
4. 이은미, 박은정, 소아 재발성삼출성 중이염에 加味荊芥蓮翹湯이 중이강삼출액내 세포활성물질에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지 13(2):149-170, 1999.
5. 박은정, 이윤심. 소아 재발성 삼출성 중이염에 加味荊芥蓮翹湯이 중이강 삼출액 내 Immunoglobulin-G 아형에 미치는 영향. 대한한방 소아과학회지 15(1):131-153, 2001.
6. 양미라, 진경선, 이해자, 권미원, 박은정. 소아 재발성 삼출성 중이염에서 加味荊芥蓮翹湯의 치료효과에 대한 임상적 연구. 대한한방소아과학회지 15(2):87-100, 2001.
7. 박은정, 신소영. 荊芥蓮翹湯과 加味荊芥蓮翹湯이 소염·진통 및 항알레르기에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지 11(1):249-273, 1997.
8. Hewett, J.A., Roth, R.A. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. Pharmacol Rev. 45(4):382-411, 1993.
9. Kubes, P., McCafferty, D.M. Nitric oxide and intestinal inflammation. Am J Med. 109(2):150-158, 2000.
10. Lee, Y.S., 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(1):8-15, 2000.
11. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 144(4):1425-1431, 1990.
12. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211(1):24-32, 1996.
13. Corbett, J.A., MacDaniel, M.L. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. J Exp Med. 181(2):559-568, 1995.
14. Cetkovic-Cvrlje, M., Eizirik, D.L. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 6(4):399-406, 1994.
15. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39: 52-63, 1999.
16. 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(2):217-226, 2000.
17. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol. 406(3):301-309, 2000.
18. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Kwon, T.O., Yun, Y.G., Kim, N.Y., Chung, H.T. Inhibitory effects of methanol extract of Cyperus rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol. 76(1):59-64, 2001.
19. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 항부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(3):771-776, 2003.
20. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. 대한한화학방제학회지 10(2):189-197, 2002.
21. Yoon, T.G., Byun, B.H., Kwon, T.K., Suh, S.I., Byun, S.H., Kwon, Y.K., Kim, S.C. Inhibitory effect of farfarae flos water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 18(3):908-913, 2004.
22. 黃度淵. 方藥合編. 서울. 南山堂. pp 238-239, 1985.
23. Surh, Y.J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. Food Chem Toxicol. 40(8):1091-1097, 2002.
24. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat Res. pp 480-481, 243-268, 2001.
25. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B

- phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology*. 139(1):11-20, 2003.
26. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 37(6):355-361, 2003.
27. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울, 成輔社, p 169, 1989.
28. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333(6174):664-666, 1988.
29. Kubes, P. Inducible nitric oxide synthase; a little bit of good in all of us. *Gut*. 47(1):6-9, 2000.
30. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 69(6):625-635, 2001.
31. Linton, M.F., Fazio, S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*. 4(2):116-123, 2004.