

원저

## 黃芩藥針液이 LPS로 誘導된 RAW 264.7 大食細胞에서의 抗炎症效果

최영광\* · 박성호\* · 서일복\*\* · 김호현\*\*\* · 김정선\*\*\*\* · 김이화\*\*

\* 세명대학교 한의과대학 경혈학교실

\*\* 해부학교실

\*\*\* 생리학교실

\*\*\*\* 세명대학교 한방식품영양학과

### Effects of *Scutellariae Radix*-acupuncture solution On Anti-inflammatory in RAW 264.7 macrophages

Young-kwang Choi\* · Sung-Ho Park\* · Il-Bok Seo\*\* · Ho-Hyun Kim\*\*\* · Jeongseon Kim\*\*\*\* · Ee-Hwa Kim\*\*

\* Department of Meridian & Acupoint

\*\* Anatomy

\*\*\* Physiology, College of Oriental Medicine, Semyung University

\*\*\*\* Department of Oriental Medical Food & Nutrition, Semyung University

#### Abstract

**Objective :** Recently, Herbal-acupuncture therapeutics has been used for the treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. Especially, we have been interested in chemical mediators concerned with inflammation such as prostaglandin, cytokine, nitric oxide.

The purpose of this study is investigated that the effect of *Scutellariae Radix*-acupuncture solution in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, performed several experimental items : those are prostaglandin E<sub>2</sub>, nitric oxide and cyclooxygenase-2.

**Method :** The cytotoxicity of *Scutellariae Radix*-acupuncture solution in RAW 264.7 macrophages were measured by MTT-based cytotoxicity assay. In order to observe cyclooxygenase-2 mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, RT-PCR was used. Prostaglandin E<sub>2</sub> formation and nitric oxide production was measured by competitive enzyme immunoassay and Griess assay.

#### Results :

1. The MTT assay demonstrated that cytotoxic effect of *Scutellariae Radix*-acupuncture solution in RAW 264.7 macrophages were not appeared before concentration of 5mg/ml.
2. *Scutellariae Radix*-acupuncture solution inhibited cyclooxygenase-2 mRNA expression in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages.
3. *Scutellariae Radix*-acupuncture solution inhibited nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages.
4. *Scutellariae Radix*-acupuncture solution inhibited prostaglandin E<sub>2</sub> formation in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages.

**Conclusion :** On the basis of these results, It was shown that *Scutellariae Radix*-acupuncture solution is significantly able to inhibit the production of PGE<sub>2</sub> and NO, as well as COX-2 mRNA expression. Our results may provide new mechanism by which *Scutellariae Radix*-acupuncture solution accounts for its beneficial effect on accelerating wound healing and anti-inflammation.

**Key words :** *Scutellariae Radix*, Herbal acupuncture, Rheumatoid arthritis, Nitric oxide, Prostaglandin E<sub>2</sub>

## 1. 緒 論

염증이 일어나는 과정은 감염성 물질(infectious agents), 허혈(ischemia), 항원-항체 반응, 열 또는 다른 신체적인 상처 등과 같은 수많은 자극에 의하여 유도되는 일련의 반응을 수반한다<sup>1)</sup>. 염증반응을 나타내는 기전 중 혈장, 세포 및 손상 받은 조직으로부터 유래하여 염증의 여러 가지 현상들 사이에 개재하여 염증반응을 증대하는 화학적 매개체(chemical mediators of inflammation)는 T. Lewis 경이 처음으로 히스타민과 유사한 물질을 밝힌 이래로 지속적인 발견이 있었고 이러한 화학적 매개체를 대상으로 그 생성과 억제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>2)</sup>.

화학적 매개체 가운데 아라키돈산(arachidonic acid) 대사에 관여되어지고 있는 cyclooxygenase(COX)는 COX-1(cyclooxygenase type 1 ; constitutive form)과 COX-2(cyclooxygenase type 2 ; constitutive form)의 두 가지 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으며 prostaglandin(PG)을 합성하는데 중요한 효소로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 특히 COX-2는 cytokine과 같은 특이한 자극에 의하여 염증반응이 발생 시 유해적인 역할을 한다고 알려져 있다<sup>4)</sup>. 또한 최근에 세포사이의 작용을 매개하는 메신저 물질로 중요한 연구 대상이 되고 있는 nitric oxide(NO)는 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의하여 arginine으로부터 합성되며, NOS는 nNOS, eNOS, iNOS로 구성되어 있다<sup>5)</sup>. 그중 iNOS는 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 lipopolysaccharide(LPS), interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ), interleukin-1(IL-1)과 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )등의 자극에 의해 활성화되어 장시간 동안 다량의 NO를 생성하고, 염증상태에서의 iNOS의 과도한 분비는 조직손상을 유발한다고 알려져 있다<sup>6)</sup>.

黃芩(Scutellariae Radix)은 꿀풀과에 속한 다년생 草本 식물로 性味가 苦寒 無毒하고 瀉實火, 除濕熱, 止血, 安胎의 효능으로 壯熱煩渴, 肺熱咳嗽, 濕熱瀉痢, 黃疸, 癰腫疔瘡등을 치료하며<sup>7)</sup> 주요성분으로 baicalin, baiceain, wogonin, wogonoside,  $\beta$ -sitosterol등이 함유되어 있다. 이 성분 중 baicalin, baiceain, wogonin에 대해 Chen<sup>8)</sup>등은 이

들 성분이 NOS, LPS 및 NOS에 의해 유도된 COX-2등의 발현을 억제한다고 보고하였다.

최근 藥鍼이 관절염 등의 염증질환에 어떠한 효과를 보이는지에 대한 활발한 보고<sup>13-15)</sup>가 진행되는 가운데, 저자는 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증반응에 黃芩藥鍼液이 COX-2의 발현조절, NO 생성조절 및 PGE<sub>2</sub> 생성에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

黃芩 200g을 증류수 500ml에 가열 추출하여 이를 여과한 다음, 이를 rotary evaporator로 감압 농축하였다. 이를 동결 건조하여 정제된 건조추출물 20g(회수율 10%)을 얻어 사용하였다.

### 2. 方法

#### 1) 세포배양

Macrophage cell line인 RAW264.7 cell을 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 용액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> 조건으로 배양하고, 배양액은 2일마다 교환하였다.

#### 2) 시약

배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS) 등은 GibcoBRL(USA)에서 구입하며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)은 Sigma(USA)에서 구입하고, PGE<sub>2</sub> assay kit는 Amersham phamacia(USA)에서 구입하였다. 또한 NO detection kit는 Intron Biotechnology(Korea)에서 구입하였고, 그 외 일반 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

#### 3) 黃芩의 세포독성 검사

黃芩의 농도에 따른 세포독성을 검사하기 위하여 MTT-based cytotoxicity assay를 시행한다. 이는 세포배양

\* 교신저자 : 김이화, 충북 제천시 신월동 산 21-1  
세명대학교 한의과대학 경혈학교실  
(Tel : 043-649-1348, E-mail : kimeh@semyung.ac.kr)

에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방법으로 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 것이며, 흡광도(Optical density)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하였다. 세포독성 지수는 다음의 산출식에 따라 %로 나타내었다.

$$\text{세포독성지수(CI, \%)} = \left(1 - \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Macrophage cell을 10% FBS가 함유된 DMEM 용액에서 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 그리고 두 세포를 각각 96 well plate에 well당 2.0×10<sup>4</sup>의 세포수가 되도록 분주하고, 배양액 100μl를 첨가하였다. 黃芩의 최종농도가 0.1μg/ml, 1μg/ml, 10μg/ml, 그리고 100μg/ml이 되도록 처리하고, 黃芩을 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 12시간 동안 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양한 후, MTT용액(MTT in phosphate buffered saline)을 50μl 가한 뒤 알루미늄 호일로 덮어 빛에 노출되지 않게 하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 DMSO 100μl를 첨가하여 침전물을 용해시킨 다음 ELISA reader로 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) RNA 분리

배양된 macrophage cell에 黃芩과 LPS를 24시간동안 처리한 후 배양액을 제거하였다. 다음에는 trypsin을 이용하여 세포를 배양접시 바닥에서 분리시킨 후, 원심 분리하여 상층액을 제거하고 세포만 test tube로 옮겼다. 각각의 세포를 homogenization 시키기 위하여 각 tube에 1ml의 RNAzol B를 첨가하였다. Chloroform을 100μl를 가하고 15초 동안 잘 혼합한 다음 5분간 방치하였다. 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상층액에 같은 양의 isopropanol을 가한 후 4°C에서 15분간 방치하였다. 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 75% ethanol로 washing 후 다시 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 total RNA를 추출하였다. RNA 농도의 측정은 260/280 흡광도로 측정하였다.

#### 5) RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain

reaction)

대식세포로부터 total RNA를 분리하고, 분리한 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후 COX-2 유전자 증폭을 위한 primer를 가지고 PCR을 시행하여 cDNA의 일부를 대량으로 증폭하였다. Total RNA 1μg에 random hexamer 2μl를 넣어 65°C에서 10분간 반응시킨 후 AMV 역전사 효소 1μl, RNasin 1μl, 10mM dNTP 5μl, 10×buffer 5μl, 50mM MgCl<sub>2</sub> 및 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 50μl로 하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성하게 하였다. PCR은 PCR 자동화 기계(Perkin Elmer 9600, USA)에서 template로 희석된 cDNA 1μl, Taq polymerase 2unit, 2.5mM dNTP 1μl, sense primer 10pM 1μl, antisense 10pM 1μl, 10×buffer 3μl 및 탈이온수를 첨가하여 총 30μl가 되게 하여, 94°C에서 5분간 1회, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초 72°C에서 30초씩 30회 반응시키고, 72°C에서 5분간 1회 시행하여 1.2% 한천 겔에서 전기영동 하였다. Internal standard로는 cyclophilin 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 COX-2 유전자 발현정도를 보정하였다. 각각의 primer는 gene bank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였다.

#### COX-2 primer

Sense : 5'-TG CATGTGGCTGTGGATGTCATCAA-3'

Anti-sense : 5'-CACTAAGACAGACCCGTCATCTCCA-3'

#### Cyclophilin primer

Sense : 5'-ACCCCACCGTGTCTTCGAC-3'

Anti-sense : 5'-CATTGCCATGGACAAGATG-3'

COX-2, cyclophilin의 크기는 각각 583bp, 299bp이다.

#### 6) Prostaglandin E<sub>2</sub> 분비량 측정

PGE<sub>2</sub>의 분비량을 측정하기 위하여 competitive enzyme immunoassay 법을 시행하였다. 96well plates에 대식세포를 1일간 배양한 후, 黃芩을 첨가하여 24 시간동안 배양하였다. 세포를 용해하기 위하여 각 well에 buffer A를 20μl씩 넣고 잘 흔든 뒤 실온에서 10분간 방치한 후, 세포가 용해된 용액 50μl를 goat anti-mouse Ig가 coating된 측정용 plate에 옮겼다. 항체와 conjugate 용액을 각각 50μl씩 넣고 실온에서 1시간 방치한 후, wash buffer로 4번 세척하고 발색 용액 150μl/well를 넣고 실온에서 정확

히 30분간 반응시킨 뒤 630nm에서 측정하였다.

7) Nitric oxide(NO) 분비량 측정

NO의 분비량을 측정하기 위하여 Griess assay(Green et al., 1982)를 사용하여 NO의 분비량을 측정하였다. 96well plates에 macrophage cell을 1일간 배양한 후, 黃芩藥鍼液을 첨가하여 24 시간동안 배양하였다. 그 다음 세포의 배양액을 100µl씩 수확하여, Griess reagent(1% sulphanilamide+2% phosphoric acid, 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride) 50µl씩 각각 첨가한 후, 실온에서 10분동안 방치한후, 550nm에서 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 회색하여 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 작성하여 얻었다.

8) 통계처리

實驗結果는 SPSS Window program(Ver. 10.0)을 利用하였으며, 모든 測定값은 平均값±標準誤差(Mean ± standard error)로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 黃芩藥鍼液의 효과를 판정하기 위한 통계학적 분석은 Student's t-test<sup>16)</sup>를 실시하였다.

III. 實驗成績

1. 세포독성에 미치는 영향

黃芩藥鍼液을 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 5mg/ml 및 10mg/ml의 농도로 배양한 세포의 생존률을 관찰한 결과 대조군에 비해서 98.96±5.41%, 96.25±6.69%, 94.58±5.86%, 64.26±7.42%, 그리고 51.25±5.24%로 나타났다. 이러한 결과로 黃芩藥鍼液은 1mg/ml의 농도까지 RAW 264.7 대식세포에서 통계학적으로 유의한(p<0.05) 독성이 없음을 확인하였다(Table 1, Fig. 1).

2. COX-2 mRNA 발현에 대한 영향

黃芩藥鍼液이 COX-2에 대한 RT-PCR를 시행하여 COX-2의 mRNA 발현에 대한 효과를 상대적으로 평가하였다. 본 연구에서 대조군은 1로 하여 실험군의 COX-2 mRNA 발현수준을 측정하였다. 측정결과 5µg/ml

Table 1. The cytotoxic effect of *Scutellariae Radix* on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay

Group	Average Viability
Control	100.00±5.65 <sup>a)</sup>
0.1mg/ml S. R.	98.96±5.41
0.5mg/ml S. R.	96.25±6.69
1mg/ml S. R.	94.58±5.86
5mg/ml S. R.	64.26±7.42*
10mg/ml S. R.	51.25±5.24*

<sup>a)</sup>: Mean ± standard error

\*: Statistically significant value compared with control group

S. R. : *Scutellariae Radix*

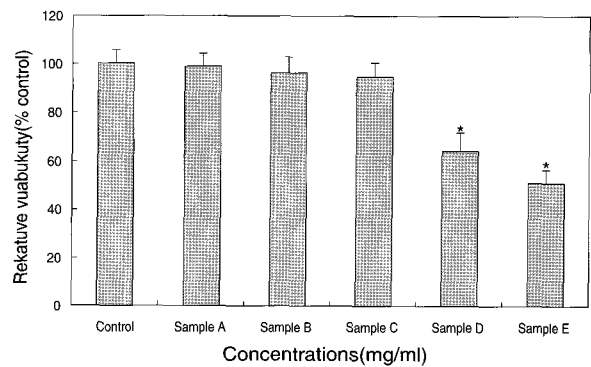


Fig. 1-1. The cytotoxic effect of *Scutellariae Radix* on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay

Sample A : 0.1mg/ml S. R.

Sample B : 0.5mg/ml S. R.

Sample C : 1mg/ml S. R.

Sample D : 5mg/ml S. R.

Sample E : 10mg/ml S. R.

농도의 LPS를 처리한 군에서는 5.78±0.25로 나타나서 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 반면에 5µg/ml 농도의 LPS 및 0.1mg/ml 黃芩藥鍼液을 처리한 군에서는 4.51±0.39, 5mg/ml 농도의 LPS 및 1mg/ml 黃芩藥鍼液을 처리한 군에서는 4.11±0.54로 나타나 LPS로만 처리한 군에 비해서 통계학적으로 유의한(p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 2, Fig. 2-1, 2-2).

3. Prostaglandin E<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향

대조군에서 prostaglandin 생성을을 조사한 결과 118±

Table 2. Effects of *Scutellariae Radix* on expression of COX-2 mRNA

Group	mRNA expression (O.D.)
Control	1
LPS	5.78 ± 0.25 <sup>a)</sup> *
LPS+0.1mg/ml S. R.	4.51 ± 0.39 <sup>#</sup>
LPS+1mg/ml S. R.	4.11 ± 0.54 <sup>#</sup>

<sup>a)</sup> : Mean ± standard error

\* : Statistically significant value compared with control group

<sup>#</sup> : Statistically significant value compared with LPS treated group

S. R. : *Scutellariae Radix*

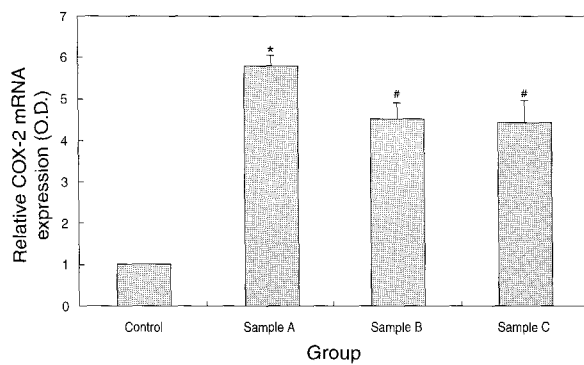


Fig. 2-1. Effects of *Scutellariae Radix* on expression of COX-2 mRNA

Sample A : only LPS

Sample B : LPS+0.1mg/ml S. R.

Sample C : LPS+ 1mg/ml S. R.

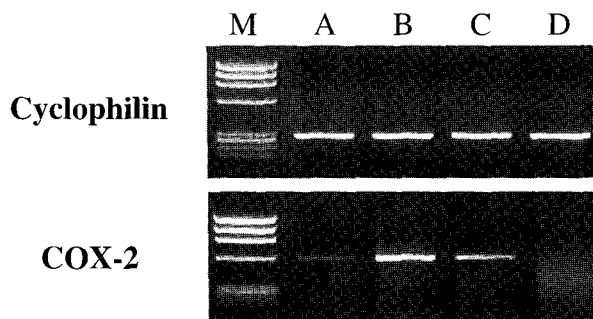


Fig. 2-2. Effects of *Scutellariae Radix* on expression of COX-2 mRNA RAW 264.7 cells were exposed to LPS(5 μg/ml), LPS+0.1mg/ml S. R and LPS+1mg/ml S. R.

M : Maker

A : Control

B : LPS

C : LPS+0.1mg/ml S. R.

D : LPS+ 1mg/ml S. R.

21.11pg/well 농도로 나타난 반면, LPS 처리군에서는 311 ± 19.50pg/well로 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다. 또한 LPS에 黃芩藥針液을 0.1mg/ml 및 1mg/ml로 처리한 군에서는 222 ± 12.14 및 207 ± 21.21로 나타나 LPS군에 비해서 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effects of *Scutellariae Radix* on PGE2 synthesis

Group	Prostaglandin E <sub>2</sub> (pg/well)
Control	118 ± 21.11 <sup>a)</sup>
LPS	311 ± 19.50*
LPS+0.1mg/ml S. R.	222 ± 12.14 <sup>#</sup>
LPS+ 1mg/ml S. R.	207 ± 21.21 <sup>#</sup>

<sup>a)</sup> : Mean ± standard error

\* : Statistically significant value compared with control group

<sup>#</sup> : Statistically significant value compared with LPS treated group

S. R. : *Scutellariae Radix*

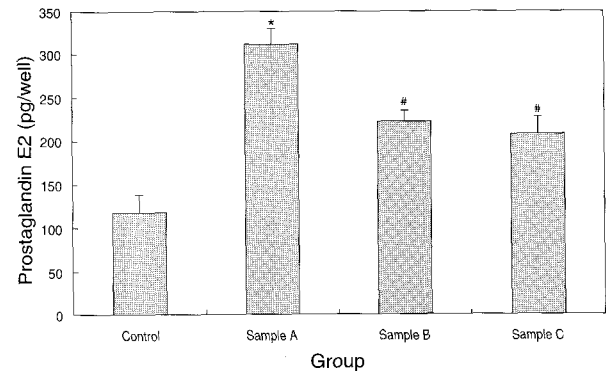


Fig. 3. Effects of *Scutellariae Radix* on PGE<sub>2</sub> synthesis

Sample A : only LPS

Sample B : LPS+0.1mg/ml S. R.

Sample C : LPS+ 1mg/ml S. R.

#### 4. Nitric oxide 생성에 미치는 영향

대조군의 nitric oxide 생성율을 조사한 결과 0.98 ± 0.02 μM 농도로 나타난 반면, LPS군에서는 16.02 ± 2.27 μM 로 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다. 또한 LPS에 黃芩藥針液을 0.1mg/ml 및 1mg/ml로 처리한 군에서는 8.76 ± 1.54 μM 및 8.56 ± 2.01 μM로 나타나 LPS 처리군에 비하여 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다(Table 4, Fig. 4-1, 4-2).

Table 4. Effects of *Scutellariae Radix* on NO synthesis

Group	Nitric Oxide Synthesis( $\mu$ M)
Control	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>a)</sup>
LPS	16.02 $\pm$ 2.27*
LPS+ 0.1mg/ml S. R.	8.87 $\pm$ 1.54 <sup>#</sup>
LPS+ 1mg/ml S. R.	8.56 $\pm$ 2.01 <sup>#</sup>

<sup>a)</sup> : Mean  $\pm$  standard error

\* : Statistically significant value compared with control group

<sup>#</sup> : Statistically significant value compared with LPS treated group

S. R. : *Scutellariae Radix*

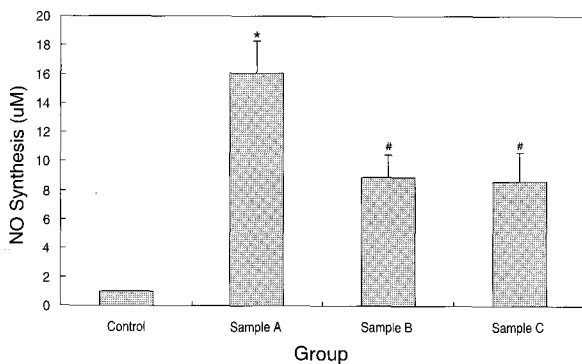


Fig. 4-1. Effects of *Scutellariae Radix* on NO synthesis

Sample A : only LPS

Sample B : LPS+0.1mg/ml S. R.

Sample C : LPS+ 1mg/ml S. R.

#### IV. 考 察

黃芩(*Scutellariae Radix*)은 꿀풀과에 속한 多年生 草本 식물로 性味가 苦寒 無毒하고 瀉實火, 除濕熱, 止血, 安胎의 효능으로 壯熱煩渴, 肺熱咳嗽, 濕熱瀉痢, 黃疸, 癰腫?瘡 등을 치료한다<sup>2)</sup>. 주요 성분은 baicalein, baicalin, wogonin 등의 flavonoid 성분으로 지질과산화 효소 활성 억제에 의한 항알러지, 과산화지질 생성억제에 의한 간장 손상 보호, 세포면역 촉진, 신장독성 감소, 이노작용, 진정작용, 혈관 이완 작용, 해열, 해독, 항균작용, 항알레르기, 항염증, 항암, 진정, 강압, 간의 이물 배설기능, 망상내피계통의 기능, 간담대사 등을 향상시키는 이담작용과, 지질대사 개선, 모세혈관 투과성 억제 등이 보고되었으며 바이러스성 간염, 신염, 골반염, 담낭염, 백내장 등에 응용되고 있다<sup>21-23)</sup>. 황금의 항염증작용과 관련하여 Chi<sup>9)</sup>등은 황금 성분의 wogonin이 LPS로 유도된 RAW

264.7 cells에서 NOS와 COX-2에 대해 어떠한 효과를 보이는지를 보고하였고, Chen<sup>2)</sup>등도 또한 baicalein, baicalin, wogonin 등의 성분들이 NOS, LPS 및 NOS에 의해 유도된 COX-2 등의 발현을 억제한다고 보고하였다.

본 실험에서 이용된 RAW 264.7 cell은 대식세포주로서 IL-1 또는 INF- $\gamma$  등과 같은 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어 일반적으로 세포독성을 갖는 물질들의 독성검정을 위해 유용하게 사용되고 있다<sup>18)</sup>. 한편 RAW 264.7 cell의 활성화는 실험실에서 흔히 사용되는 LPS를 이용하였는데, Martin-Sanz<sup>24)</sup>등은 LPS로 유도된 rat의 hepatocyte에서 COX-2 발현의 증가를 확인하였으며, Stuehr<sup>19)</sup>등은 대식세포, 내피세포, 심근세포 등 여러세포에서 LPS, INF- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$  등의 자극에 의해 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다고 보고 하였다. 또한 김<sup>20)</sup>등도 RAW 264.7 세포를 INF- $\gamma$ 와 LPS로 공동 처리할 경우 처리하는 농도에 의존적으로 NO의 생성을 증가시켰다고 보고하였다.

염증과 통증에 관여한다고 알려진 prostaglandin이 생성되는 기전은 세포내 calcium을 증가시키면 phospholipase A<sub>2</sub>를 활성화시켜 세포막의 인지질(phospholipid)로부터 arachidonic acid를 생산하고 이러한 세포내 arachidonic acid는 COX에 의하여 prostaglandin G<sub>2</sub>(PGG<sub>2</sub>)를 생성한다. PGG<sub>2</sub>는 과산화반응에 의해 prostaglandin H<sub>2</sub>(PGH<sub>2</sub>)로 되면서 트롬복산, 프로스타사이클린, PGE<sub>2</sub>등의 산물로 전환되는데, PGE<sub>2</sub>는 특히 혈관의 긴장도 및 투과성에 다양한 효과를 보이면서 염증 시 혈관확장의 가장 중요한 매개체로 작용하고 다른 매개체의 투과성 증가나 화학주성효과를 강화시키기도 한다<sup>1)</sup>. 즉 PGE<sub>2</sub>는 COX 활성화에 따른 주요 산물로서 염증 질환, 자가면역 질환 그리고 종양성 질환의 병리에서 중요한 역할을 하며, 특히 염증 반응의 중요한 매개 물질로 작용한다<sup>9)</sup>.

COX는 arachidonic acid를 불안정한 중간물(intermediate)인 PGG<sub>2</sub>와 PGH<sub>2</sub>로 변환시키는데, 이 효소는 현재 COX-1과 COX-2의 두가지 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. COX-1은 조직의 구성 요소이며 위장관계를 포함한 조직에 산재한다. 각 조직에서 혈류의 유지, 세포분화(cell division), 점액(mucus)과 중탄산염(bicarbonate)의 생성 등에 관여하는 국소적인 prostaglandin의 양을 조절한다. 이러한 COX-1의 활성화를 NSAIDs(nonsteroidal anti-inflammatory drugs)가 저해함으로써 통증은 억제하지만 위장관과 신장의 부작용

및 항혈소판 작용(antiplatelet activity)이 나타난다. 반면에 COX-2는 뇌와 신장에서 주로 발견되며 일부 염증성 세포(inflammatory cell)에서도 발견되고, 특히 염증부위에서 유도된다. 그 염증부위에서 고농도의 prostaglandin은 염증과 통증의 매개물질로서 중요한 역할을 한다. COX-1은 염증부위에서 거의 유도되지 않으므로 COX-1의 억제 작용은 거의 없는 선택적인 COX-2 저해제를 고안하게 되었다. 선택적인 COX-2 저해제는 염증과 통증을 감소시킬 수 있는 반면에 COX-1에는 영향을 끼치지 않기 때문에 위장관계에서는 안전한 것으로 제시된다<sup>9</sup>. 현재 사용되는 거의 대부분의 NSAIDs는 COX-1과 COX-2를 비선택적으로 억제하거나 또는 구성요소인 COX-1에 약간의 선택성을 갖고 있는 제제들이다<sup>10</sup>. NSAIDs는 가장 흔히 처방되는 제제 중의 하나이지만, 이 NSAIDs의 사용으로 인하여 부작용이 빈번하게 발생한다. 따라서, NSAIDs의 항염증 효과 및 진통 효과와는 비슷한 효능을 가지면서도 이러한 NSAIDs에서 흔히 나타나는 위장관 부작용은 없는 선택적인 COX type 2 저해제(selective inhibitors of COX-2)가 이미 개발되어 임상에서 사용되고 있다<sup>2,4,6</sup>. 특히 Chi<sup>11</sup>등이 黃芩의 성분 중 하나인 wogonin의 COX-2 발현 억제에 대한 보고는 본 실험과 관련지어 고무적이라 할 수 있다. 한의학계에서도 蜂毒의 COX-2 발현 억제에 대한 연구가 진행중인데, 류<sup>12</sup>등은 蜂毒주입이 아세트산 유발 복부 긴장 회수와 치상회에서의 COX-2 발현이 억제됨을 보고하였고, 황<sup>20</sup>등도 봉독이 골육종세포주에서 COX-2 mRNA의 발현을 선택적으로 억제한다고 보고하였다.

NO는 신경계통 조직에서 신경전달물질, 신경조절물질 또는 이차전령물질(second messenger)로 작용하는 것으로 알려진 free radical이다. NO의 형성은 흥분성 아미노산 수용체에 대한 자극과 관련이 있으며 일단 산화질소가 생성되면 수용성 guanylate cyclase가 자극된다. 산화질소는 산화질소 합성효소(NOS)에 의하여 arginine 으로부터 합성되며 이때 NADH와 tetrahydrobiopterin이 조효소로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>13</sup>. NOS는 크게 cNOS, iNOS, eNOS로 나눌수 있으며, iNOS는 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 농도에 비의존성이며 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 LPS, INF- $\gamma$ , IL-1과 TNF- $\alpha$  등의 자극에 의해 활성화되어 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다<sup>14</sup>. NO는 중추신경계통, 말초신경계통, 심장혈관계통에서 작용을 나타냄이

보고되어 왔는데, 1990년 초에 동물 세포에서 세포간의 매신저로서 생성된다는 것을 발견하였고 혈압, platelet adhesion, neutrophil의 집성뿐만 아니라 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되어졌다. 즉 NO는 혈소판 내에서 혈소판의 응집을 억제하며 대식세포에서 세포독성을 매개하는 작용을 하며 일부 인체조직에서는 혈관확장을 매개하는 물질로도 알려져 있다<sup>15</sup>. 이 NO가 적게 만들어지면 고혈압, 성교불능, 동맥경화 등의 증상을 나타내고 균에 감염되기 쉽다. 반면 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagensis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다<sup>16</sup>. 그러므로 NO 생성저해제는 septic shock, 당뇨, 동맥경화 등의 만성질환 치료제로의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 이런 질병에 대한 치료제를 개발할 목적으로 최근에는 천연물로부터 NO 생성저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다<sup>24</sup>. 노<sup>17</sup>등은 枳實로부터 2종의 coumarin계의 물질을 분리하여 NO 생성에 대한 강한 저해활성을 보고하였고, 한의학적 치료방법인 藥鍼에 있어서 김<sup>18</sup>등은 白何首烏 藥鍼의 항산화효능과 면역반응에 미치는 효과에 있어 NO의 유의성 있는 소거효과를 보고하였다. 또한 이<sup>19</sup>등은 黃芪 藥鍼液의 항산화효능과 면역반응에 미치는 효과와 관련하여 NO의 소거효과를 측정 한 결과 黃芪藥鍼이 유의성 있는 NO 소거 효과가 있음을 보고하였고, 조<sup>20</sup>등은 IL-1으로 야기된 1차성 골관절염 인체 연골세포에 대한 항염증 효과를 연구하는 과정에서 全蠍藥鍼이 연골세포에서 NO와 iNOS mRNA의 단백질 합성을 감소시켰음을 보고하였다.

이와 같은 보고들에 의해서 임상에서 사용되어지고 있는 여러 가지 藥鍼液들이 염증반응을 중개하는 화학적 매개체와 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 黃芩藥鍼液이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 COX-2 mRNA, PGE<sub>2</sub> 생성 및 NO 생성 억제효과에 대해 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

黃芩藥鍼液의 세포독성을 조사하기 위해 각각의 농도로 배양하여 세포의 생존률을 관찰한 결과 1mg/ml의 농도까지 RAW 264.7 대식세포에서 통계학적으로 유의한(p<0.05) 독성이 없음을 확인하였다.

黃芩藥鍼液이 COX-2에 대한 RT-PCR을 시행하여 COX-2의 mRNA 발현에 대한 효과를 평가하였다. 본 연구에서 실험군의 COX-2 mRNA 발현수준을 측정 한 결

과 LPS를 단독 처리한 군에서는  $5.78 \pm 0.25$ 로 나타나 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다. 반면, LPS에 0.1mg/ml 및 1mg/ml 黃芩藥鍼液을 처리한 군에서는 LPS로만 처리한 군에 비해서 통계학적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었다.

黃芩藥鍼液이 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 LPS를 처리한 결과 대조군에 비해서 PGE<sub>2</sub> 생성율이 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 이에 반하여 LPS에 0.1mg/ml 및 1mg/ml 黃芩藥鍼液을 처리한 군에서는 LPS 처리군에 비해서 통계학적으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소하였다.

黃芩藥鍼液이 NO 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 LPS를 처리한 결과 정상군에 비해서 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다. 이에 반하여 LPS에 0.1mg/ml 및 1mg/ml 黃芩藥鍼液을 처리한 군에서는 통계학적으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소하였다.

본 실험 결과와 관련하여 Chen<sup>2)</sup>등은 LPS로 처리한 RAW 264.7 macrophage cells의 COX-2의 mRNA 발현에 대한 효과를 黃芩의 성분인 baicalein, baicalin, wogonin 으로 실험한 결과, baicalein, baicalin에서는 COX-2 mRNA 발현이 증가하였고 wogonin에서는 발현이 감소되었음을 보고 하였다. 또한 Chi<sup>3)</sup>등도 wogonin이 COX-2 mRNA 발현을 감소시킨다고 보고하였다. 즉 Chen<sup>2)</sup>등과 Chi<sup>3)</sup>등의 연구로 黃芩의 성분에 따라 COX-2의 발현 효과가 달라질 수 있음을 보였는데 이는 접근방식의 차이로 실제로 한의학적인 치료방법으로 사용될 黃芩藥鍼液에 있어서의 COX-2 생성을 억제 할 수 있음을 보여주는 본 연구의 결과는 실제 임상에서 실질적 가치가 있다고 사려된다. 또한 PGE<sub>2</sub>의 분비량을 측정 하였을 때는 黃芩藥鍼液이 PGE<sub>2</sub>의 분비량을 감소시키는 것을 관찰하였고, 한편, 황금약침액의 농도가 증가함에 따라 PGE<sub>2</sub>의 분비량이 감소됨을 알 수 있었는데 Chi<sup>3)</sup>등은 현저한 wogonin의 농도 증가에 의해 PGE<sub>2</sub>의 분비량이 급격히 감소함을 보고하였고, Chen<sup>2)</sup>등도 baicalein, baicalin, wogonin이 모두 농도가 증가함에 따라 PGE<sub>2</sub>의 분비량이 감소함을 보고하였다. 즉 PGE<sub>2</sub>의 분비량 억제의 효과에 있어서는 黃芩 각각의 성분과 黃芩藥鍼液 모두 유사한 결과를 보였다. 한편, 黃芩藥鍼液이 NO의 분비량에 있어서도 NO의 생성을 억제시킴을 본 실험에서 관찰되었다. Chen<sup>2)</sup>등의 연구에서 baicalein, baicalin, wogonin에 의해 NO와 iNOS의 생성이 감소되었음을 보고하였는데 이러한 결과는 본 실험 결과와 유사함을

알 수 있었다.

이상의 결과는 黃芩藥鍼液이 LPS 유도성 염증모델에 있어서 COX-2를 경유한 PGE<sub>2</sub>와 관련이 있음을 제시하는 것이며, 강력한 항염증효과가 있음을 보여 주었다. 또한 말초성 염증에 의해 증가된 NO를 억제시키는 黃芩藥鍼液의 항염증 효과는 복막염, 관절염과 같은 질환에도 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사려된다.

## V. 結 論

LPS로 유도된 RAW 264.7 murine macrophage에서의 염증반응에 대한 黃芩藥鍼液의 항염증 작용을 규명하기 위해 黃芩藥鍼液이 COX-2의 발현조절, NO 생성조절 및 PGE<sub>2</sub> 생성에 어떠한 영향을 미치는 지를 실험한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 黃芩藥鍼液은 RAW 264.7 대식세포에서 MTT에 의한 세포독성을 관찰한 결과 1mg/ml 농도 이전에서는 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 黃芩藥鍼液은 LPS에 의해 유도된 염증 모델에서 증가된 COX-2의 발현을 억제시켰다.
3. 黃芩藥鍼液은 LPS에 의해 유도된 염증 모델에서 증가된 NO의 생성을 감소시켰다.
4. 黃芩藥鍼液은 LPS에 의해 유도된 염증 모델에서 증가된 PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시켰다.

以上的 실험결과 LPS 유도성 염증모델에 있어서 黃芩이 COX-2 mRNA, NO 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제시킴으로써 강력한 항염증효과를 나타내며, 이러한 黃芩藥鍼液의 항염증 효과는 복막염, 관절염과 같은 질환에도 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사려된다.

## 參考文獻

- 1) 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 1995 : 83-89.
- 2) Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ, Yang LL.



- Wogonin, baicalein and baicalin inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol.* 2001 ; 61 : 1417-1427.
- 3) Martin-Sanz P, Calles NA, Diaz-Guerra MJ, Bosca L. Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines, *Br J Pharmacol.* 1998 ; 125 : 1313-1319.
  - 4) Chi YS, Cheon BS, Kim HP. Effect of wogonin, a plant flavon from *Scutellariae Radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol.* 2001 ; 61 : 1195-1203.
  - 5) Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Matin RC, O'Beirne G : Intracellular measurement of prostaglandin E<sub>2</sub>: effect of anti-inflammatory drugs cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem.* 1999 ; 271(1) : 18-28.
  - 6) Chou TZC, Earl Fu, Shen EC. Chitosan inhibits PGE<sub>2</sub> formation and COX-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Com.* 2003 ; 308 : 403-407.
  - 7) 노태철, 최희철, 김보연, 김영호, 안종석, 김영국, 이현선. 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 Nitric Oxid 생성 저해활성. *생약학회지.* 1999 ; 30(4) : 413-416.
  - 8) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998 ; 12(12) : 1063-1073.
  - 9) Kufmann WE, Andresson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenase and the central nervous system. *Prostaglandins.* 1997 ; 54(3) : 601-624.
  - 10) Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N ENGL J MED.* 1993 ; 329 : 2002-2012.
  - 11) Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS.* 1992 ; 17 : 399-402.
  - 12) 전국한외과 대학 본초학교실. *본초학.* 서울. 영림사. 1994 : 178-179.
  - 13) 구민숙, 윤종화, 김경호, 장준혁, 이승덕, 김갑성. 호도약침이 생쥐의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2002 ; 19(3) : 88-94.
  - 14) 장통영. 牛膝藥鍼이 Rat의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. *대한한외학회지.* 2000 ; 21(3) : 77-87.
  - 15) 李鐘國. 防風藥鍼이 진통, 소염, 해열 및 진경에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 1986 ; 3 : 11-23.
  - 16) 박순영. *의학통계학.* 서울. 경희대학교출판국. 1998 : 162-183.
  - 17) Insel PA. Analgesic-antipyretic and drugs employed in the treatment of gout. In : Hardman JG, et al., eds. *The pharmacological basis of therapeutics.* 9th ed. USA : McGraw-Hill. 1996 ; 617-624.
  - 18) 임정호. 니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 NO의 역할. *대한 산업외학회지.* 2001 ; 13(3) : 274-277.
  - 19) Stuehr D, Cho HJ, Kwon NS, Weise M, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine induced macrophage NO synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Sci USA.* 1991 ; 88 : 7773-7777.
  - 20) 김영덕, 전창덕, 이병순, 이복수, 박석돈, 백상기, 정현택. 사이토카인과 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포주의 NO 생성. *대한면역학회지.* 2002 ; 10 : 345-350.
  - 21) Kimuya Y, Kubo M, Tani T, Arichi S, Okuda, H. Studies on *Scutellariae Radix*. IV. Effect on lipid peroxidation in rat liver. *Chem Pharm Bull(Tokyo).* 1981 ; 29(9) : 2610-2617.
  - 22) 문관성. 약초의 성분과 이용. 평양. 과학백과사전출판사. 1999 : 618-620.
  - 23) 신민교. *원색임상분초학.* 서울. 영림사. 1992 : 308-10.
  - 24) 대한통증학회. *통증의학.* 서울. 군자출판사. 2000 : 8-26.
  - 25) 류은경, 최도영, 이재동. 세포증식과 COX-2 발현에 미치는 蜂毒의 효과. *대한침구학회지.* 2003 ; 20(2) : 112-122.
  - 26) 황대연, 김호현, 김창주, 김이화. 蜂毒이 꿀육종 세포주에서 세포사멸 및 COX-2 억제에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2003 ; 20(3) : 63-74.
  - 27) Giatgen A. The Dual Role of nitric oxide in Islet  $\beta$ -cell. *New Physiol Sc.* 1999 ; 14 : 49-53.

- 28) Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The surprising life of nitric oxide. Chem Eng News. 1993 : 26-38.
- 29) 김동현, 서정철, 임성철, 정태영, 한상원. 白何首烏藥 鍼液의 NO, DPPH 소거 및 IL-4 억제효과. 대한침 구학회지. 2003 ; 20(4) : 42-52.
- 30) 이경민, 서정철, 한상원. 황기약침액의 NO, DPPH 소거 및 IL-4 억제효과. 대한침구학회지. 2003 ; 20(2) : 184-194.
- 31) 조현석, 김갑성. 전갈약침액의 인체연골세포에서 nitric oxide synthase의 IL-1 유도 유전형질 발현과 nitric oxide의 생산의 억제에 관한 연구. 대한침구 학회지. 2003 ; 20(1) : 104-119.