

단삼 (*Salviae Miltiorrhizae Radix*)

메탄올 추출물의 항염증 효과

윤현정[#], 허숙경, 윤형중, 박원환, 박선동^{*}

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix*

Hyun-Jeong Yun[#], Sook-Kyoung-Heo, Hyung-Joong Yun, Won-Hwan Park,
Sun-Dong Park^{*}

Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objective : *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Labiatae) (SM), an eminent herbal plant, has been widely used in traditional Chinese medicine for the treatment of vascular diseases such as hypertension. The aim of this study was to determine whether SM inhibits production of nitrite, an index of NO, and proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 macrophages. And this study investigated whether or not SM could reduce tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced inflammatory response in human vascular aortic smooth muscle cells (HASMC) and umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Methods : Cytotoxic activity of SM on RAW 264.7 cells was using 5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. We measured the NO production using Griess Reagent System. Production of Proliflammatory cytokines was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Results : Our results indicated that SM significantly inhibited the LPS-induced NO production accompanied by an attenuation of tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 formation in macrophages. SM decreased TNF- α -induced IL-8, IL-6 production, and intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 expression.

Conclusion : These results indicate that SM has potential as an anti-inflammatory agent.

Key Word : *Salviae Miltiorrhizae Radix*, RAW 264.7, anti-inflammatory effect, nitric oxide

*교신저자 : 박선동, 동국대학교 한의과대학 방제학교실
· Tel : 054-770-2654, e-mail : sundong@dongguk.ac.kr

#제1저자 : 윤현정, 동국대학교 한의과대학 방제학교실
· Tel : 054-770-2654, e-mail : sksms97@hanmail.net

접수 : 2007년 11월 9일 수정 : 2007년 12월 12일 채택 : 2007년 12월 21일

서론

단삼 (*Salviae Miltiorrhizae Radix*)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속하고 뿌리를 건조하여 약재로 이용한다¹⁾. 지용성 성분으로는 phenylanthraquinone계인 tanshinone, cryptotanshinone, hydroxytanshinone, miltrone, 케톤류 화합물로는 saloilenone, tanshilactone 등이 있으며, 수용성 성분은 danshensauin, protocatechuic acid 등이 있다. 그리고 baicalin, β -sitosterol, ursolic acid, vitamin E, tannin 등도 포함되어 있다. 약리작용으로는 심혈관계에 대한 작용이 많은데, 관상동맥확장작용, 말초미소순환계의 개선작용 그리고 혈압강하 작용이 있다. 혈액에서는 혈액응고인자에 영향을 주면서 항혈소판 응집작용과 항혈전 작용을 한다. 이외에서 중추신경억제작용, 간세포 재생 촉진 작용, 항고지혈증 작용, 항암 작용 등 다양한 치료 작용을 가지는 약물이다. 한의학에서는 특히 순환기계와 중추신경계 그리고 면역계에 특이적으로 작용한다고 하였으며, 활혈화어, 진정, 보혈, 그리고 배농 및 조직수복작용을 한다고 하였다. 현재까지 알려진 적용병증으로는 대체로 관상동맥경화성 질환, 뇌혈관성 질환, 만성간염 등에서 효과를 발휘하는 것으로 사용되어온 천연물이다²⁾.

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, prostaglandin E₂ (PGE₂), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여되어 있다. 특히 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화 시키며, 그 결과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 과량의 nitric oxide (NO)와 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다³⁾.

혈관은 대부분 내피세포와 평활근으로 이루어져 있는데, 혈관 내의 염증기작으로 인한 혈관의 노화가 각종 동맥경화증이나 심부전과 같은 질환에 결정적 요인이 될 수 있다⁵⁾. 따라서 최근 혈관에서의 염증반응에 대한 관심이 높아지고 있다. 그 기전으로, 조직 손상에 의한 대식세포의 활성화는 다양한 cytokine을 분비하고 이는 혈관 내의 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 등의 발현을 유도

하여 단핵구나 중성구 등을 조직으로 이동시키면서 2차적인 염증이나 침윤을 발생시키는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

본 연구에서는 마우스 대식 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발시킨 후 단삼의 항염증 활성을 조사하였고, 사람 혈관의 내피세포, 평활근세포에서는 TNF- α 로 염증을 유발시킨 후 단삼이 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는 지 관찰하였다. 그 지표로서 염증성 cytokine인 interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)을 측정하였다. 또한 염증반응에 관여하는 부착분자인 ICAM-1, VCAM-1을 조사하였으며, 세포가 방출하는 NO를 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 300 g의 단삼에 3배량의 100% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 27.6 g (수율 : 9.2%)을 얻었다.

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서, Smooth Muscle Cell Medium (SMCM), SMC growth supplement, Endothelial cell Growth Medium-2 (EGM-2)는 ScienCell사 (Sandiego, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 Sodium Dodesyl Sulfate (SDS), Acrylamide, Bis는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고, NP-40, CAPS, tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사 (Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정을 위한 ELISA kit는 Pierce Biotechnology사 (Rockford,

USA)에서 구입하였으며, Protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 사람의 동맥 평활근 세포주인 Human Aortic Smooth Muscle Cells (HASMC)와 사람의 제대정맥 내피세포주인 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)는 ScienCell사 (Sandiego, CA)에서 분양받았다. 각각의 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) MTS assay

단삼의 메탄올 추출물의 세포에 대한 독성 측정에는 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10⁴/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 단삼을 농도별 (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml)로 24시간 동안 처리하였다. Well당 20 µl의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 빼 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 단삼의 메탄올 추출물을 농도별로 처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 µl씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer

로 3회 세척하고 100 µl의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 µl의 streptavidine-HRP solution을 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 µl씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Nitric Oxide 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 단삼의 메탄올 추출물을 전처리 하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액을 회수하여 실험에 사용하였다. 배양액 50 µl와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응 시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

5) 유세포 분석기를 이용한 부착분자 발현율 측정

HASMC 와 HUVEC 세포에 100 ng/ml의 TNF-α와 단삼의 메탄올 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양 후 세포를 회수하여 FACS buffer (0.2% BSA-PBS)로 2번 세척하였다. 각각의 sample에 PE anti-human ICAM-1 mAb 및 PE anti-human VCAM-1 mAb (Pharmingen, Sandiego, USA)을 1 µl씩 첨가하여 Vortex Mixer로 섞어준 다음 암소에서 30분간 반응시킨 후 FACS buffer로 2회 세척하였다. 500 µl의 FACS buffer를 가하여 Vortex Mixer로 잘 섞어 준 후 유세포 분석기 (Becton Dickinson, USA)로 분석하였다.

3. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 편차로 표시하고 유의성 검증은 Sigma Plot (Window용 version 7.0)을 이용하여 student's t-test를 실시하였다.

결 과

1. 단삼의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

단삼이 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 세포 독성을 갖는 지 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 그 결과, 단삼에 의해 RAW 264.7의 세포 생존율에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 보아 세포 독성이 없음을 확인하였다 (Fig. 1).

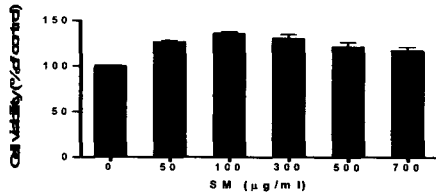


Fig. 1. Effect of SM on the cell viability of RAW 264.7 cells using MTS assay

RAW 264.7 cells (1×10^4 cells/plate) were treated with various concentrations (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml) of SM for 18 h. Cell viability was measured by MTS assay as described in materials and methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

2. RAW 264.7 세포에서 단삼이 LPS로 유도된 proinflammatory cytokines의 생성에 미치는 영향

먼저, RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별 (0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 proinflammatory cytokines의 생성을 유도하는 지 알아보았다. 그 결과, LPS의 농도에 의존적으로 생성량이 증가되었다. 100 ng/ml의 농도에서 TNF- α 는 약 4.3배 증가되었고 IL-6, MCP-1은 각각 57.3, 5.2배 증가되었다 (Fig. 2).

1) TNF- α 생성량에 미치는 영향

100 ng/ml LPS를 1시간 동안 전처리한 후 단삼을 농도별로 18시간 동안 처리하여 단삼이 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각 26.24, 26.80, 27.57, 33.27, 41.99%까지 감소시켰다 (Fig. 3).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

100 ng/ml LPS를 1시간 동안 전처리한 후 단삼을 농도별로 18시간 동안 처리하여 단삼이 LPS에 의해 유도되는 IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각 45.76, 46.20%까지 감소시켰다 (Fig. 4).

3) MCP-1 생성량에 미치는 영향

100 ng/ml LPS를 1시간 동안 전처리한 후 단삼을 농도별로 18시간 동안 처리하여 단삼이 LPS에 의해 유도되는 MCP-1의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각 14.09, 15.42, 68.07, 69.03, 85.34%까지 감소시켰다 (Fig. 5)

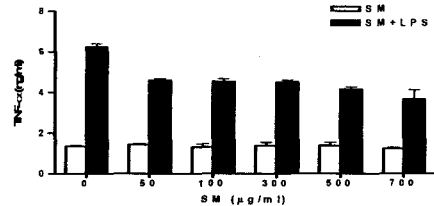


Fig. 2. LPS-induced proinflammatory cytokines in RAW 264.7 cells RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 1, 10, 100 ng/ml) of LPS for 18 h. The levels of cytokines production were measured by using ELISA kits. Data are represented as means \pm SEM.

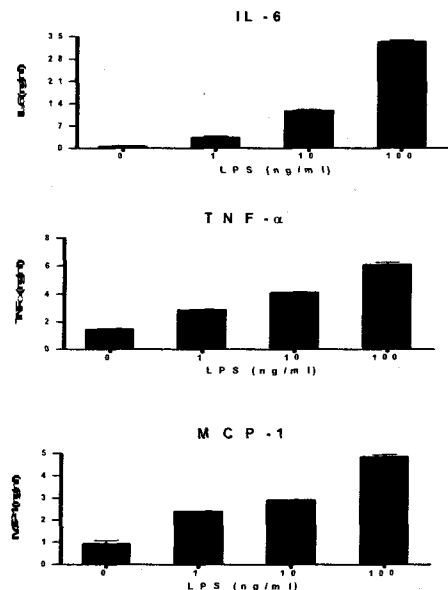


Fig. 3. Inhibition of TNF- α by SM in LPS-induced RAW 264.7 cells Cells were treated with LPS (100 ng/ml) and various

concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml) for 18 h. The TNF-α levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

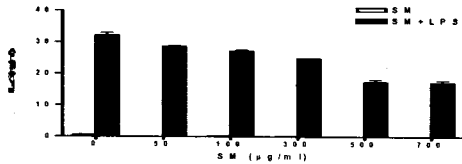


Fig. 4. Inhibition of IL-6 by SM in LPS-induced RAW 264.7 cells Cells were treated with LPS (100 ng/ml) and various concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml) for 18 h. The IL-6 levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

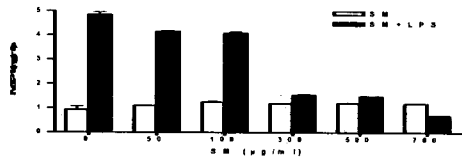


Fig. 5. Inhibition of MCP-1 by SM in LPS-induced RAW 264.7 cells Cells were treated with LPS (100 ng/ml) and various concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml) for 18 h. The MCP-1 levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. ** : P value < 0.01, *** : P value < 0.001

3. RAW 264.7 세포에서 단삼이 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 100 ng/ml의 LPS를 1시간 동안 전처리한 후 단삼을 농도별로 18시간 동안 처리하여 단삼이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성에 미치는 영향을 Griess Reagent를 사용하여 조사한 결과, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각 28.64, 49.64, 94.68, 95.36, 97.70%까지 감소시켰다 (Fig. 6).

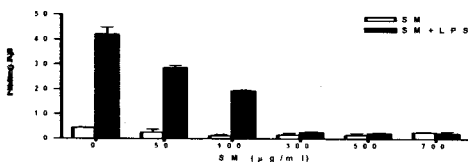


Fig. 6. Inhibition of NO by SM in LPS-induced RAW 264.7 cells Cells were treated with LPS (100 ng/ml) and various

concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml) for 18 h. The nitric oxide production was measured by Griess Reagent System. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

4. 사람의 혈관조직세포에서 단삼이 TNF-α로 유도된 proinflammatory cytokines 생성에 미치는 영향

HASMC와 HUVEC에 100 ng/ml TNF-α와 단삼을 농도별로 24시간 동안 처리하여 proinflammatory cytokines 생성에 어떠한 변화가 있는지 조사하였다.

1) IL-8 생성량에 미치는 영향

HASMC에서 TNF-α로 유도된 IL-8이 단삼의 농도 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각 5.88, 9.12, 17.91, 17.91, 25.75%까지 감소되었고, HUVEC에서는 각각 12.03, 12.70, 50.83, 57.66, 63.72%까지 감소되었다 (Fig. 7).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

HASMC에서 TNF-α로 유도된 IL-6가 단삼의 농도 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각 5.16, 14.13, 21.67, 22.68, 23.17%까지 감소되었고, HUVEC에서는 각각 31.32, 48.41, 66.46, 67.75, 73.21%까지 감소되었다 (Fig. 8).

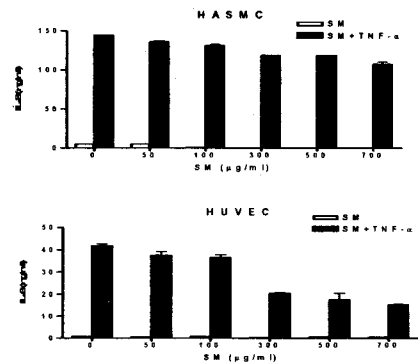


Fig. 7. Inhibition of TNF-α-induced IL-8 production by SM in HASMC and HUVEC Cells were treated with TNF-α (100 ng/ml) and various concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml) for 24 h. The IL-8 levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. * : P value < 0.05, ** : P value < 0.01, *** : P value < 0.001

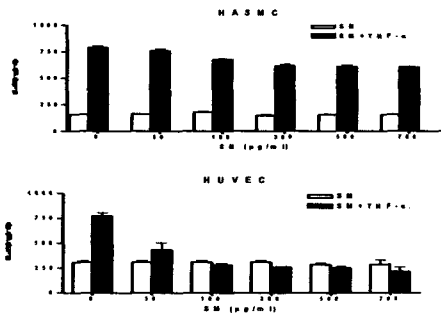


Fig. 8. Inhibition of TNF- α -induced IL-6 production by SM in HASMC and HUVEC Cells were treated with TNF- α (100 ng/ml) and various concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 μ g/ml) for 24 h. The IL-6 levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means \pm SEM. * : P value < 0.05, ** : P value < 0.01, *** : P value < 0.001

5. 사람의 혈관조직세포에서 단삼이 TNF- α 로 유도된 부착분자의 생성에 미치는 영향

사람 혈관조직세포주인 HASMC와 HUVEC에 100 ng/ml TNF- α 와 단삼을 농도별 (0, 50, 100, 300, 500, 700 μ g/ml)로 24시간 동안 처리하여 부착분자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

1) ICAM-1의 발현에 미치는 영향

HASMC와 HUVEC 세포에서 단삼만 처리한 경우에 ICAM-1의 발현이 농도 의존적으로 효과적인 감소가 관찰되었다. TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1의 발현은 HASMC의 경우 단삼의 농도 50, 100, 300, 500, 700 μ g/ml에서 각각 12.71, 15.12, 30.34, 31.01, 83.72%까지 감소되었고, HUVEC에서는 각각 15.37, 19.63, 28.43, 38.92, 94.41%까지 감소되었다 (Fig. 9).

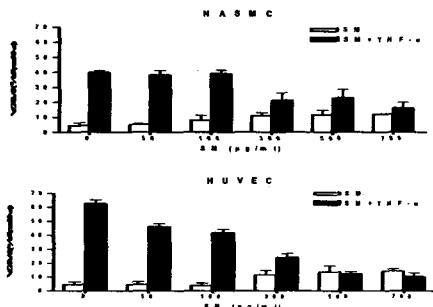


Fig. 9. Inhibition of TNF- α -induced ICAM-1 production by SM in

HASMC and HUVEC Cells were treated with TNF- α (100 ng/ml) and various concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 μ g/ml) for 24 h. The levels of ICAM-1 production were measured by flow cytometer. Data are represented as means \pm SEM. *** : P value < 0.001

2) VCAM-1의 발현에 미치는 영향

TNF- α 에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현은 HASMC의 경우 단삼의 농도 50, 100, 300, 500, 700 μ g/ml에서 각각 6.21, 3.74, 47.41, 43.32, 58.22%까지 감소되었고, HUVEC에서는 각각 25.23, 32.12, 60.57, 79.95, 82.92%까지 감소되었다 (Fig. 10).

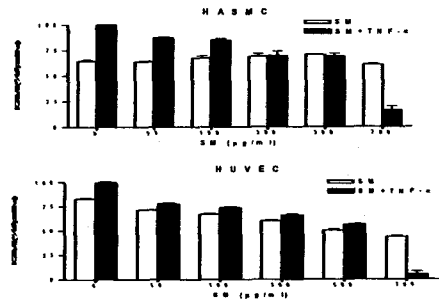


Fig. 10. Inhibition of TNF- α -induced VCAM-1 production by SM in HASMC and HUVEC Cells were treated with TNF- α (100 ng/ml) and various concentrations of SM (0, 50, 100, 300, 500, 700 μ g/ml) for 24 h. The levels of VCAM-1 production were measured by flow cytometer. Data are represented as means \pm SEM. * : P value < 0.05, ** : P value < 0.01, P value < 0.001

고찰

단삼(Salviae Miltiorrhizae Radix)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속한 다년생 초본으로 뿌리를 건조하여 약재로 이용하는데¹⁾, 丹參飲, 複方丹蔘片, 丹蔘通脈湯, 丹蔘生脈散加味, 冠心2號方 등²⁾의 전통적 한방처방에서 보인다. 약리작용으로는 심기능 개선에 효과적인데, 심근수축력은 증가시키나 심근 산소 소모량은 증가시키지 않으므로 심근경색의 응급치료에 응용되며, 관상동맥을 확장시켜 혈류량을 증가시킨다. 또한 fibrinolysin의 활성을 높이고, 섬유단백의 용해를 촉진하여 혈전형성을 억제하고 혈액응고시간을 연장하고, 혈액과 혈장의 점도를 낮추어 혈류역학 개선작용을 한다. 말초부위에서도 마찬가지로 혈액유속을 빠르게 하고 모세혈관망의 개방을 촉진시킨다. 또한 단삼은 괴사된 심근조직의 회복을 촉진시켰으며 대식세포를 활성화하고 fibroblast의 분화와

교원섬유형성이 비교적 잘 나타나며 육아형성도 비교적 빨리 이루어지게 한다. 이외에도 단삼은 골절된 부위의 어혈을 감소시키고, 국부의 혈액순환을 개선하며 골절 유합 시간을 단축시킨다고 하고, 대뇌피질의 자발적인 전기활동을 감소시키는 진정효과도 있다고 하며, *in vitro*에서 포도상구균, 대장균, 프로테우스균 등의 병원균을 억제하며 내성을 가진 황색포도상구균에 대해서도 억제작용이 있다. 독성 실험으로 단삼주사액을 생쥐에 복강주사하면 LD50는 36.7±3.8g/kg이다.^{1,7,8,9)}

현재 임상에서 활용되는 적응병증을 보면 대부분 관상동맥경화성질환인 협심증이나 심근경색, 뇌혈관성질환인 뇌동맥경화증, 뇌졸중 및 그의 후유증이다. 이외에도 만성간염이나 초기 간 경변, 염증감염증에 의한 화농성질환, 강피증, 결절성 홍반, 혈전색소성 맥관염, 자궁의 임신, 임신중독증, 기능성자궁출혈 등에서 단일제제나 처방에 귀속되는데 대개 6~20g 정도 사용된다²⁾. 한편, 중국에서는 그 응용범위가 더욱 확대되어 血瘀證, 疼痛證, 心神不安證, 溫熱病, 瘡瘍癰腫 및 피부병에 사용되며, 임상에서 새롭게 응용한 것을 보면 妊娠膽汁鬱積證, 호흡계통질병, 만성신기능부전, 당뇨병, 小兒秋冬季節腹瀉, 耳聾, 비염, 口腔粘膜白斑, 青光眼, 점상각막염, 쇼크, 宮頸糜爛, 子宮內膜異位, 급만성간염, 급만성신염 등에 대한 보고가 있다¹⁰⁾.

단삼에 대한 실험연구로 국내에서는 남 등¹¹⁾과 선 등¹²⁾은 세포독성을 억제한다고 하였으며, 성 등¹³⁾은 그 활성물질을 분리하여 항암활성을 보고하였으며, 최 등¹⁴⁾은 apoptosis를 유도함으로써 항암활성을 가지고 있음을 보고한 바 있다. 국제동향으로는 단삼에 대한 신경보호효과¹⁵⁾, 미세혈류장애의 개선 등의 개선이나¹⁶⁾ 동물실험에 의한 각종 부착인자의 부착을감소를 통한 미세순환의 향상¹⁷⁾, iNOS의 mRNA발현을 감소시켜 항염증작용을 통한 급성췌장염치료작용¹⁸⁾, 혈관내피세포의 항상성유지로 혈관보호작용¹⁹⁾, 신생혈관생성에 중요한 역할²⁰⁾, 알코올에 의한 간손상을 보호하는 효과²¹⁾, 토끼실험동맥경화모델에서 단삼의 동맥경화억제기전²²⁾, 단삼성분인 salvianolic acid의 항혈전작용²³⁾, 허혈성 뇌손상에 대한 보호작용²⁴⁾, 급성신부전에 대한 방어 및 치료효과²⁵⁾, 만성천식성기관지염환자에 대한 단삼의 효과²⁶⁾가 보고되고 있다.

본 연구에서는 단삼의 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포주인 RAW 264.7에 단삼의 메탄올 추출물을 처리하여 실험을 수행하였다. 먼저,

MTS assay를 수행한 결과, 단삼에 의해 RAW 264.7의 세포 생존율에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 보아 세포 독성이 거의 없음을 확인하였다. 다음으로, LPS를 처리하여 proinflammatory cytokines인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1의 생성을 유도시킨 후 단삼을 농도별로 처리하여 각각의 cytokines의 생성량에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 그 결과 단삼의 농도에 의존적으로 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1의 생성량이 감소하였다. 또한 LPS로 유도된 NO 생성량이 단삼의 농도에 의존적으로 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 실험 결과들로 보아, proinflammatory cytokines 및 NO의 생성량 조절을 통해 항염증 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 따라서 단삼이 다양한 염증성 질환의 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

마우스 대식세포 RAW 264.7에서 단삼의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 단삼이 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 세포 독성을 갖는 지 조사한 결과 세포 생존율에는 크게 영향을 주지 않았다.
2. RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별로 처리한 결과, proinflammatory cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1의 생성량이 증가되었고 이들은 단삼의 농도에 의존적으로 감소되었다.
3. RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별로 처리한 결과, NO의 생성량과 iNOS의 발현이 크게 증가하였고, LPS로 유도된 NO는 단삼의 농도에 의존적으로 감소되었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 단삼은 항염증 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호:R13-2005-013-01000-0).

참고문헌

1. 김호철, 한약약리학, 서울 집문당, pp.332-334, 2004.
2. 曾野維喜, 續東西醫學臨床漢方處方學, 일본, 남산당, p.168, 1995.
3. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim J. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kappaB transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells*. 23(3):398-404, 2007.
4. Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsuji S, Tsujii M, Hayashi N, Kawano S. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF-kappaB. *Dig Dis Sci*. 52(8):1890-1896, 2007.
5. Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 947:93-109, 2001.
6. Tribolo S, Lodi F, Connor C, Suri S, Wilson VG, Taylor MA, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. [Epub ahead of print], 2007.
7. 이상인 외, 한약임상응용, 서울, 정보사, pp.269-271, 1986.
8. 馬清鈞, 王淑玲, 常用中藥現代研究與臨床, 中國, 天津科技翻譯出版公司, pp.398-404, 1995.
9. 宋振玉 外, 中草藥現代研究(第2卷), 中國, 北京醫科大學, 中國協和醫科大學聯合出版社, pp.472-541, 1996.
10. 雷載權 張廷模, 中華臨床中藥學 下卷, 중국, 인민위생출판사, pp.1099-1108, 1998.
11. 남우열, 전병훈, MMC 등의 항암화학요법제로 유발된 세포독성에 미치는 단삼의 영향. *동의병리학회지*. 11(2):113-117, 1997.
12. 선중기, 신민교. 단삼의 L1210세포에 대한 세포독성의연구. *신경정신과학회지*. 3(1):84-90, 1992.
13. 성락기, 김성훈, 이권익, 단삼의 항암효과와 활성물질 분리에 관한 연구, *동의병리학회지*. 10(2):76-91, 1996.
14. 최선미, 최승훈, 안규석, 단삼의 항암활성과 apoptosis에 미치는 영향, *동의병리학회지*. 14(2):22-47, 2002.
15. Liu CS, Chen NH, Zhang JT. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from *Radix Salviae miltiorrhizae*. *Phytomedicine*. 14:492-497, 2007.
16. Zhang XP, Li ZJ, Liu DR. Progress in research into the mechanism of *Radix salviae miltiorrhizae* in treatment of acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 5(4):501-504, 2006.
17. Zhao Y, Yin Y, Lü XJ, Feng P, Liu J, Sha JP, Lei BJ. Effects of *Radix Salviae Miltiorrhizae* on the PMN-EC adhesion in vitro at the early stage of endotoxemia. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 35(3):320-322, 2004.
18. Zhang Y, Shi CX, Li YX. Effect of *salviae miltiorrhizae* on mRNA expression of inducible nitric oxide synthase and organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 25(11):1012-1015, 2005.
19. Shi CS, Huang HC, Wu HL, Kuo CH, Chang BI, Shiao MS, Shi GY. Salvianolic acid B modulates hemostasis properties of human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res*. 119(6):769-775, 2007.
20. Gao D, Song J, Hu J, Lin J, Zheng L, Cai J, Du J, Chen K. Angiogenesis promoting effects of Chinese herbal medicine for activating blood circulation to remove stasis on chick embryo chorio-allantoic membrane. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 25(10):912-915, 2005.
21. Xiong ZB, Wu P, Huang YF. Protective mechanisms of *radix salviae miltiorrhizae* against chronic alcoholic liver injury in mice. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 25(5):425-428, 2005.

22. Li S, Wan L. Experimental study on the preventive mechanism of salviae miltiorrhizae against atherosclerosis in rabbits models. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 24(3):233-235, 2004.

23. B.Li M, Zhao C, Wong RN, Goto S, Wang Z, Liao F. Inhibition of shear-induced platelet aggregation in rat by tetramethylpyrazine and salvianolic acid. Clin Hemorheol Microcirc. 31(2):97-103, 2004.

24. Wu W, Kuang P, Li Z. Protective effect of radix Salviae miltiorrhizae on apoptosis of neurons during focal cerebral ischemia and reperfusion injury. J Tradit Chin Med. 17(3):220-225, 1997.

25. in H, Wang A, Wang Y. Preventive and therapeutic effects of radix Salviae miltiorrhizae on glycerol-induced acute renal failure in rats. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 22(4):236-8, 255-256, 1997.

26. Wei ZM. Effects of injection Salviae miltiorrhizae on senile chronic asthmatic bronchitis patients. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 16(7):402-404, 1996.