

## 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 茵陳蒿湯의 항염증 효과

윤현정<sup>#</sup>, 허숙경, 이효승, 김창현, 김병완, 박선동<sup>\*</sup>

동국대학교 한의과대학 심혈관계질환 천연물연구개발센터·방제학교실

### Anti-inflammatory Effect of Injinho-tang in RAW 264.7 Cells

Hyun-Jeong Yun<sup>#</sup>, Sook-Kyoung Heo, Hyo-Seung Yi, Chang-Hyun Kim, Byung-Wan Kim,  
Sun-Dong Park<sup>\*</sup>

Cardiovascular Medical Research Center and Department of Prescriptionology,  
College of Oriental Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Inflammation is important event in the development of vascular diseases including hypertension, atherosclerosis, and restenosis. Injinho-tang(IJHT) has been used as a traditional Korean herbal medicine since ancient times, and today it is widely used as a medication for jaundice associated with inflammation of the liver. The aim of this study was to determine whether IJHT and its components inhibit production of nitrite, an index of NO, and proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 macrophages.

**Methods** : Cytotoxic activity of IJHT and its components on RAW 264.7 cells was using 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. The nitric oxide (NO) production was measured by Griess reagent system. And proinflammatory cytokines were measured by ELISA kit. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression were detected by western blot.

**Results** : IJHT and its components significantly inhibited the LPS-induced NO production and iNOS expression accompanied by an attenuation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) formation in macrophages.

**Conclusions** : IJHT and its components inhibit LPS-induced inflammation via decreasing cytokines production. These results indicate that IJHT and its components have potential as an anti-inflammation and anti-atherosclerosis agent.

**Key words** : *Evodia officinalis* DODE, anti-inflammatory activity, cytokine, adhesion molecule

\* 교신저자 : 박선동, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 심혈관계 질환 천연물 연구개발 센터·방제학교실  
· Tel : 054-770-2654 · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr  
# 제1저자 : 윤현정, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 심혈관계 질환 천연물 연구개발 센터·방제학교실  
· Tel : 054-770-2654 · E-mail : sksms97@hanmail.net  
· 접수 : 2008년 5월 23일 · 수정 : 2008년 6월 12일 · 채택 : 2008년 6월 20일

## 서론

인진호탕(茵陳蒿湯)은 《傷寒論》<sup>1)</sup>에서 최초로 언급된 처방으로 항염증, 해열, 그리고 이노작용을 가지며, 담낭수축작용의 촉진을 통해 담즙분비를 증가시키고 이를 통한 간보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 임상적으로 급성바이러스성 간염, 만성간염, 간경화, 담낭 및 담도질환 등에서 볼 수 있는 주증상인 황달(黃疸)에 활용되어 온 처방으로 인진(茵陳, *Artemisiae Capillaris Herba*), 치자(梔子, *Gardeniae Fructus*) 그리고 대황(大黃, *Rhei Radix et Rhizoma*)으로 구성되었다<sup>3)</sup>.

茵陳은 이담, 간기능 보호 작용과 항균, 항바이러스 작용이 있으며, 또한 혈압강하와 항동맥경화 활성을 갖는다고 알려져 있다<sup>4)</sup>. 인진에 관해 보고된 연구로는 인진의 분획물이 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )와 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 RAW264.7 세포주의 염증반응을 조절한다는 것으로 nitric oxide (NO)나 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 그리고 superoxide 생성을 억제한다는 보고가 있다<sup>5)</sup>. 치자는 피부진균에 대한 억제작용이 있고 연부조직 손상에 대해 소염, 지통효과도 있다. 또한 이담작용과 췌장분비촉진작용이 있으며, 간기능 보호와 심근수축억제작용이 있다<sup>6)</sup>. 치자와 그 구성성분 중 crocin과 crocetin은 췌장 lipase의 활성을 억제함으로써 고지혈증을 개선시킬 수 있다고 보고하였다<sup>7)</sup>. 최근에는 치자의 geniposide가 간, 심장 그리고 신장에 해롭지 않으면서 항종양인자가 될 수 있음이 보고되었다<sup>8)</sup>. 대황은 사하성분인 anthracene glycosides를 함유하고 각종 세균에 대한 항균작용도 있다. 그 외에 이담, 지혈, 이노작용이 있으며 면역조절작용도 있다<sup>9)</sup>. 대황에서 laminaran을 추출한 다음 고지방식이 흰쥐에게 투여한 바 혈청 지질성분의 개선효과가 있으며<sup>10)</sup>, 대황이 Bax 단백질의 발현을 억제하여 상대적으로 Bax/Bcl-2 자연적 세포사를 억제하여 Mogolian gerbil의 가역성 전뇌허혈 모델에서 신경보호효과도 보고되었다<sup>11)</sup>. 한편 북방으로서 인진호탕에 대한 최신 연구로는 쥐의 간세포에서 anti-apoptosis 경향을 보이므로 담즙배설장애로 야기되는 간질환의 임상적 관리 측면에서 잠재적인 적용가능성을 제시하였으며<sup>12-13)</sup>, 또한 장기투여는 간손상으로 야기된 과량의 담즙산을 개선하였는데 이는 감소된 산화스트레스와 간섬유화의 정도와 관련이 있다고 하였다. 간세포 자연사를 억제하는 것으로부터 수술 후 담관폐쇄 환자에서 간

기능과 섬유화의 혈청표식자를 통해 인진호탕의 효과를 평가한바 유의성이 있음도 확인하였다<sup>14-17)</sup>. 또한 본방은 anti-apoptosis 활성을 가지지만 preneoplastic lesions은 증가하지 않고 다만 간세포사의 감소 없이 stellate 세포의 활성억제를 통한 간 섬유화를 유의성 있게 감소한다고 하였다<sup>18)</sup>. 이러한 일련의 실험적 연구를 토대로 추론되는 것은 담즙에 의한 간세포의 염증이 각종 초기적 간질환 유발의 요인이 될 수 있음을 인식할 수 있다. 그러나 인진호탕의 항염증효과와 그 기전에 대해서는 잘 알려진 바가 없다. 따라서 본 처방과 개별구성약물의 항염증기전을 밝히는 것은 중요한 의미가 있다고 본다.

염증(inflammation)은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나이다. 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(pro-inflammatory mediators)이 만들어지는데 이로 인하여 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다. 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostagrandin E2 (PGE<sub>2</sub>) 등이 있다. 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 염증을 일으킨다<sup>19-20)</sup>.

포유동물 세포의 nitric oxide synthase (NOS)의 경우, 유사형태가 3가지 존재하는데 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), 그리고 inducible NOS (iNOS)이다. 그 중에서 특히 iNOS가 염증반응에 관여한다. nNOS와 eNOS는 항상 발현되어있으며, iNOS의 경우 Interferon- $\gamma$ , lipopolysaccharide (LPS), 그리고 여러 가지 염증성 사이토카인의 자극 있을 때 발현된다. 보통 eNOS는 강력한 혈관확장제로서 혈관의 항상성(vascular homeostasis) 유지에 중요한 역할을 한다. 또한 NO는 급성, 만성 염증반응을 조절하기도 한다. PGE<sub>2</sub>는 cyclooxygenase (COX)에 의해서 Arachidonic acid로부터 생산된다.

COX에 대해서는 1990년대 초반에 주로 연구되었는데, 이 또한 유사형태가 2가지 존재한다. COX-1은 거의 모든 조직에 발현되어 있고, prostagrandin을 생산하여 신장의 혈액 흐름을 조절하거나 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적인 기능을 조절한다. 반대로 COX-2의 경우는 미생물에 의한 감염이나 손상 혹은 여러 요인의 스트레스에 반응한 대식세포(Macrophage)에서 발현된다. 즉 iNOS와 COX-2의 발현과 NO, PGE<sub>2</sub>의 생산은 면역세포의 대표적인 염증인자이다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 tumor

necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 등이 포함된다.

최근 천연자원으로부터 혈관 재협착 억제제, 동맥경화 예방 물질에 대한 관심이 집중되고 있다. 지금까지도 천연 자원은 여러 치료제의 선도물질로서 개발되어 제약 산업에 소중한 자원으로 이용되어 왔다. 그러므로 천연자원에서 동맥경화 예방 및 치료 물질의 개발은 인공적인 화학물질보다 부작용을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 가격면에서도 경쟁력이 있을 것이라고 사료된다.

동맥경화 질환은 대표적인 만성염증성 질환(chronic inflammatory disease)인데, 이러한 질환의 예방효과를 알아보기 위하여 약재를 전 처리하여 본 실험에서 선택한 약재가 동맥경화의 예방효과가 있는 지를 알아보는 데 관심을 두었다. 본 연구에서는 인진호탕과 그 구성약재인 인진, 치자, 대황의 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 각각의 약재를 전 처리한 1시간 후 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하였다. 그 다음, 각각의 약재가 세포의 염증 유도를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는지 관찰하였다. 그 지표로서 세포가 방출하는 NO, PGE2 생성량과 iNOS, COX-1 발현정도 뿐만 아니라 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 생성량 등을 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 茵陳蒿湯은 각각의 약재를 혼합하여 총 270 g에 (Table 1), 茵陳, 梔子, 大黃은 각각 300 g에 3배량의

Table 1. Composition and contents of Injinho-tang(IJHT)

약명	생약명	양(g)
인진	Artemisiae Capillaris Herba (AC)	150
치자	Gardeniae Fructus (GF)	75
대황	Rhei Radix et Rhizoma (RR)	45
Total		270

100% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 분말을 얻었다. 수율은 茵陳蒿湯이 17.8% (48.06 g), 茵陳, 梔子, 大黃이 각각 5.36%(16.08 g), 25.5%(76.5 g), 19.3%(57.9 g)였다. 각각의 분말은 세포 배양액에 녹여 실험에 사용하였다.

### 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 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. 실험에 사용된 1차 항체인 iNOS monoclonal antibody (mAb)는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, CA)에서,  $\beta$ -actin mAb는 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사(Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정용 위한 ELISA kit는 Pierce Biotechnology사(Rockford, USA)에서 구입하였으며, Protein assay reagent는 Bio-Rad사(Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  조건에서 배양하였다.

#### 2) MTS assay

茵陳蒿湯 및 각각의 약재 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxy meth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법<sup>21)</sup>으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의

하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에  $1 \times 10^4$ /well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약제를 농도별(0, 50, 100, 300, 500, 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 18 시간 동안 처리하였다. Well당 20  $\mu\text{l}$ 의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 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 약제의 메탄올 추출물을 농도별로 처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100  $\mu\text{l}$ 의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100  $\mu\text{l}$ 의 streptavidine-HRP solution을 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate (TMB) 기질을 100  $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100  $\mu\text{l}$ 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System<sup>22)</sup>을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 약제의 메탄올 추출물을 전처리 하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액 50  $\mu\text{l}$ 와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

### 5) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간

별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS ; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 세척한 후, lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000 $\times$ g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

## 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. 인진호탕 및 각각의 구성약재인 인진, 치자, 대황의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 인진호탕, 인진, 치자, 대황을 농도별로 18시간 동안 처리한 결과, 인진호탕과 치자는 RAW 264.7의 세포 생존율에는 거의 영향을 주지 않았고 인진과 대황은 고농도에서 세포의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1). 그래서 인진호탕, 인진, 치자 그리고 대황이 RAW 264.7의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 다음 실험을 진행하였다. 이는 인진호탕과 그 구성약재들이 보여주는 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성을 말한다.

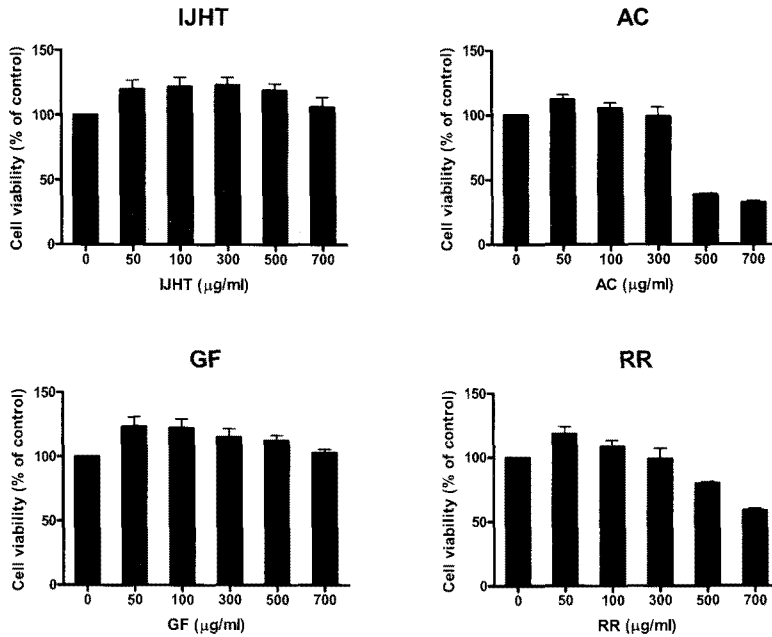


Fig. 1. Effect of IJHT, AC, GF and RR on the cell viability of RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 50, 100, 300, 500, 700 μg/ml) of IJHT, AC, GF and RR 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 인진호탕 및 그 구성약재인 인진, 치자, 대황이 LPS로 유도된 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성량에 미치는 영향

동맥경화 질환은 대표적인 만성 염증성 질환(chronic inflammatory disease)인데, 이러한 질환의 예방효과를 알아보기 위하여 약재를 전 처리하여 본 실험에서 선택한 약재가 동맥경화의 예방효과가 있는 지를 알아보는데 관심을 두었다. 먼저 염증 유발 물질에 주로 사용되는 LPS를 사용하여 염증 유발에 필요한 적절한 농도를 조사하였다. RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별(0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 Griess Reagent를 사용하여 조사한 결과 NO의 생성량이 농도 의존적으로 증가되었으며(data not shown), 100 ng/ml의 농도에서 가장 효과가 있었는데 약 10배 증가되었다. 또한 PGE<sub>2</sub>의 생성량을 ELISA 방법을 이용하여 조사한 결과 LPS의 농도별로 증가하였고 100 ng/ml의 농도에서 20배 증가되었다. 약재의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약재 300 μg/ml의 농도를 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의

해 유도되는 NO의 생성량에 미치는 영향을 같은 방법으로 조사한 결과, 인진호탕(300 μg/ml)의 경우에는 74% 감소시켰고, 인진은 98%, 치자는 44%, 대황은 62% 감소시켰다(Fig. 2A). LPS에 의해 유도되는 PGE<sub>2</sub>의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 인진호탕의 경우에는 35%, 인진은 49%, 치자는 55%까지, 대황은 같은 농도에서 30% 감소시켰다 (Fig. 2B). 인진호탕, 인진, 치자 그리고 대황 모두 LPS로 유도된 NO와 PGE<sub>2</sub>을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, 그 중에서도 인진호탕과 그 구성약재 중에 인진의 효과가 가장 큰 것으로 관찰되었다.

## 3. RAW 264.7 세포에서 인진호탕 및 그 구성약재인 인진, 치자, 대황이 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

염증에 관여하는 NO는 보통 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서, PGE<sub>2</sub>는 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어진다. 그래서 RAW 264.7 세포에서 인진호탕 및 그 구성약재인 인진, 치자, 대황이 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 미치

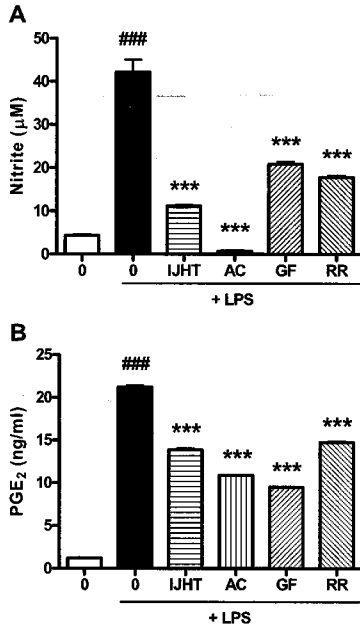


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO and PGE<sub>2</sub> production by IJHT, AC, GF and RR

RAW 264.7 cells were preincubated with 300 µg/ml of IJHT, AC, GF and RR for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The NO production was measured by Griess Reagent System, and the PGE<sub>2</sub> production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (\*): \* : ##, \*\*\* : P < 0.001.

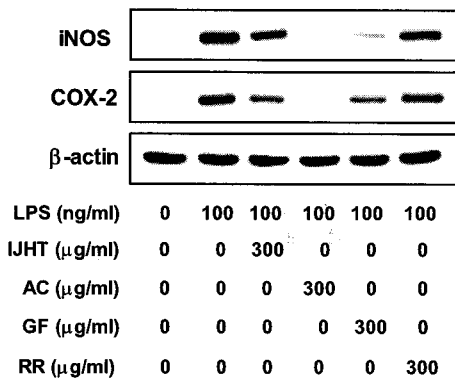


Figure 3. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by IJHT, AC, GF and RR

RAW 264.7 cells were preincubated with 300 µg/ml of IJHT, AC, GF and RR for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blotting as described in Materials and Methods. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. β-actin levels were used as internal markers for loading variation.

는 영향을 알아보기로 하였다. 우선 염증 유발 물질로 주로 사용되는 LPS를 사용하여 염증 유발에 필요한 적절한 농도를 조사하여 본 결과, 100 ng/ml의 농도에서 가장 효과가 있었다(data not shown). 또한 iNOS와 COX-2의 발현도 LPS 100 ng/ml에서 대조군에 비하여 현저히 증가하였다. 약제의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약제 300 µg/ml의 농도를 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 iNOS의 발현에 미치는 영향을 같은 방법으로 조사한 결과, 인진호탕의 경우에는 52% 감소시켰고, 인진은 99%, 치자는 97%, 대황은 36% 감소시켰다(Fig. 3, upper panel). 또한 LPS에 의해 유도되는 COX-2 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 인진호탕의 경우에는 79%, 인진은 99%, 치자는 79%까지, 대황은 같은 농도에서 50% 감소시켰다(Fig. 3, lower panel). 인진호탕, 인진, 치자 그리고 대황 모두 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, 그 중에서도 인진호탕과 그 구성약재 중, 인진의 효과가 가장 큰 것으로 관찰되었다.

#### 4. RAW 264.7 세포에서 인진호탕 및 그 구성약재인 인진, 치자, 대황이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)은 염증을 나타내는 지표로서 아주 중요하다. 그래서 RAW 264.7 세포에서 인진호탕 및 그 구성약재인 인진, 치자, 대황이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향을 알아보기로 하였다. 우선, RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별(0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 염증성 사이토카인의 생성하는 적절한 농도를 조사하였다. 그 결과 LPS의 농도에 의존적으로 생성량이 증가하였고(data not shown), 그 중 100 ng/ml의 농도에서 가장 효과적으로 염증성 사이토카인들이 유도되었으므로 RAW 264.7 세포에서 염증 유발 물질(병원 물질)로서 100 ng/ml 농도의 LPS를 사용하기로 하였다. LPS 100 ng/ml의 농도에서 TNF-α는 4.3배, IL-1β는 6.2배, IL-6는 57.3배, MCP-1은 5.2배 증가되었다(Fig. 4). 그 다음으로 약제의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약제 300 µg/ml의 농도를 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 TNF-α의 생성

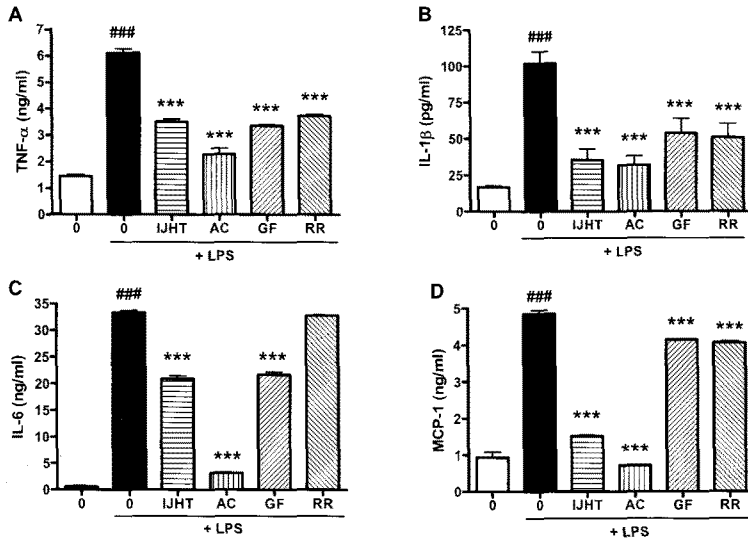


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 by IJHT, AC, GF and RR

RAW 264.7 cells were preincubated with 300  $\mu$ g/ml of IJHT, AC, GF and RR for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as means $\pm$ SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (\*); ###, \*\*\* : P < 0.001.

량에 미치는 영향을 조사한 결과, 인진호탕(300  $\mu$ g/ml)의 경우에는 44% 감소시켰고, 인진은 63%, 치자는 46%, 대황은 40% 감소시켰다(Fig. 4A). LPS에 의해 유도되는 IL-1 $\beta$ 의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 인진호탕의 경우에는 67%, 인진은 70%, 치자는 49%까지, 대황은 같은 농도에서 45% 감소시켰다(Fig. 4B). 또한 LPS에 의해 유도되는 IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 인진호탕의 경우에는 34%, 인진은 90%, 치자는 32%까지, 대황은 같은 농도에서 5% 감소시켰다(Fig. 4C). 같은 방법으로 LPS에 의해 유도되는 MCP-1의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 인진호탕의 경우에는 69%, 인진은 85%, 치자는 15%까지, 대황은 같은 농도에서 16% 감소시켰다(Fig. 4D). 인진호탕, 인진, 치자 그리고 대황 모두 LPS로 유도된 proinflammatory cytokines을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, 그 중에서도 인진호탕과 그 구성약재 중, 인진의 효과가 가장 큰 것으로 관찰되었다.

## 고찰

최근 생활수준의 향상과 더불어 성인병의 예방과

치료에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 성인병 중에서 고혈압, 동맥경화, 심장병, 뇌졸중 등은 대표적인 순환기계 질병으로 지금까지 치료약제가 다수 개발되어 있음에도 불구하고 개선되지 않고 있다. 최근 선진국의 조사에 의하면 혈관 순환기계 질환이 현대인의 사망원인에 1위를 차지하고 있으며, 우리나라의 통계 보고에서도 사망자수의 원인에 있어 악성종양이 21%, 뇌혈관질환이 약 17%, 심장질환이 약 9%로서 혈관의 장애에 의해 사망하는 것이 약 26%로 악성종양보다 높은 사망률을 나타내고 있다. 따라서 이 뇌혈관 및 심장질환은 현재 의학적으로 많은 관심을 보이고 있어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 혈관질환은 동맥이 약 70% 폐색이 되어도 통증을 느낄 수 없는 병증으로 질환해석과 발병요인에 대한 것은 물론 개선제의 개발이 미약한 분야로 혈관질환을 개선하는 예방 및 치료제의 개발에 대한 여지가 높은 질환으로 부각이 되었다. 특히 동맥경화 질환은 대표적인 만성 염증성 질환(chronic inflammatory disease)이다.

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE2, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 특히 대식세포에서 cytokines, TNF- $\alpha$ , LPS

와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화시키며 그 결과 iNOS, COX-2를 발현시켜 과량의 NO와 PGE2를 생성하여 염증을 일으킨다<sup>19-20</sup>. 이러한 염증반응을 조절할 수 있다면 염증을 매개로 하는 많은 질병들의 치료 및 예방에 효과적으로 작용할 것이다. 이에 본 연구에서는 항염증 활성을 가질 것으로 기대되는 한약재 및 처방을 선정하여 실험을 수행하였다.

인진호탕은 인진, 치자, 대황으로 구성되어 한의학에서는 陽明病에 속하는 胃腸의 實熱을 解하는 약으로 카타르성 황달의 초기에 쓸 때가 많으며, 황달이 없어도 내부의 瘀熱, 즉 위장에 熱이 鬱滯되었을 때 활용하는 처방이다. 임상적으로 급성바이러스성 간염, 만성간염, 간경화, 담낭 및 담도질환 등에서 볼 수 있는 주증상인 黃疸에 활용되어 온 처방이다<sup>23</sup>.

인진호탕에 대한 최근의 연구를 보면, 인진호탕이 쥐의 간세포에서 anti-apoptosis 경향을 보이고 담즙 배설장애로 야기되는 간질환의 임상적 관리 측면에서 잠재적인 적용가능성을 제시하였으며, 쥐에게 장기간 인진호탕 투여는 간 손상으로 야기된 과량의 담즙산을 개선하였는데 이는 감소된 산화스트레스와 간 섬유화의 정도와 관련이 있다고 하였다<sup>12-13</sup>. 또한 Imanishi 등<sup>24</sup>은 인진호탕과 대황의 emodin이 간의 stellate 세포에서 PDGF-BB 의존신호경로를 조절하고 쥐에서 thioacetamide에 의해 유도된 간 섬유화의 증식을 감소시킨다고 하였다. 그리고 Sakaida 등<sup>18</sup>은 인진호탕이 정상 간세포의 세포사에는 영향을 주지 않고 stellate 세포의 활성을 억제함으로써 간 섬유화를 감소시킨다고 보고하였다. 국내연구로는, 정<sup>25</sup>은 담석증모형 생쥐에서 인진호탕이 혈중 지질의 감소로 담석형성의 억제가능성을 제기하였고, 하 등<sup>26</sup>은 금주침을 시술받은 간기능 검사 이상 소견자를 대상으로 인진호탕엑기스를 투여한 바 혈액학적 효소수치가 감소한다고 하였다. 성 등<sup>27</sup>은 담도결찰로 유도된 간 손상에서 인진호탕 약침을 期門穴에 투여한바 혈청 WBC, bilirubin, GOT, GPT, cholesterol, albumin 등이 유의성 있는 효과를 보여 간 섬유화나 간경화에 적용할 수 있을 것으로 보았다. 한편 김 등<sup>28</sup>은 인진호탕이 장기적인 알코올 투여로 인한 고지혈증과 간 손상에 대한 예방효과가 있을 것으로 주장하였다.

인진의 성분 중 esculetin은 담즙의 분비를 촉진하고, 산치자의 geniposide와 함께 작용하여 담즙분비를 더욱 촉진한다. 또한 chlorogenic acid, caffetannic acid는 혈중의 cholesterol과  $\beta$ -Lipoprotein을 저하시켜 혈관벽에 지방이 침착하는 것을 방지하며, 혈중지질

저하작용, 콜레스테롤 저하작용을 한다. Eugenol, eugenic acid가 항혈전작용, 담즙분비 촉진작용, 항산화작용을 한다<sup>29</sup>. 치자의 성분으로는 geniposide, genipin, gardenoside, shanzhiside, gardenin, mannitol,  $\beta$ -sitosterol, nonacosane, pectin, tannin 등이 있어 담즙분비 촉진작용, 항고콜레스테롤혈증, 재산작용, 항아세틸콜린작용, 항히스타민작용 등이 알려져 있다<sup>30</sup>. 대황의 성분은 anthraquinone 유도체인 rhein, emodin, chrysophanol, aloe-emodin, physcion 등과 그 배당체들로 이루어져 있으며 다양한 약리작용이 밝혀져 있다. 특히 sennoside A는 소화기계에서 사하작용이 강력함이 이미 증명되었으며, 혈액에 대한 작용으로 혈장침투압을 상승시켜, 조직의 수분을 혈관내로 이동시키고, 대출혈에 의한 혈액용량을 보충하며, 혈액 점도를 감소시켜 미소순환장애를 개선한다고 알려졌다. 이외에도 항고지혈증, 항감염, 항종양, 이뇨, 그리고 여성 호르몬양 작용 등이 밝혀졌는데 한의학에서는 일찍이 大黃牧丹皮湯, 大承氣湯, 黃龍湯, 涼膈散, 그리고 溫脾湯 등의 처방에서 주약으로 활용되어온 약물이다<sup>30</sup>.

그러나 인진호탕과 그 구성약재인 인진, 치자, 대황의 항염증효과에 대해서는 보고된 바가 없다. 그래서 본 실험에서는 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 인진호탕과 그 구성약재인 인진, 치자, 대황을 농도별로 처리하여 항염증 활성에 대하여 조사하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 대한 약재의 독성을 알아보기 위하여 인진호탕과 그 구성약재인 인진, 치자, 대황을 농도별로 18시간 동안 처리한 후 MTS assay를 수행하였다. 그 결과 인진호탕과 치자는 700  $\mu$ g/ml의 고농도까지 세포의 생존율에 거의 영향을 주지 않았고 인진과 대황은 500, 700  $\mu$ g/ml의 농도에서는 세포 독성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 인진호탕과 그 구성약재인 인진, 치자, 대황 모두가 독성을 가지지 않는 농도인 300  $\mu$ g/ml를 세포에 처리하여 실험을 수행하였다. 이는 인진호탕과 그 구성약재들이 보여주는 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성을 말한다.

동맥경화 질환은 대표적인 만성염증성 질환(chronic inflammatory disease)인데, 이러한 질환의 예방효과를 알아보기 위하여 약재를 전 처리하여 본 실험에서 선택한 약재가 동맥경화의 예방효과가 있는지를 알아보는데 관심을 두었다. 그래서 RAW 264.7에 인진호탕과 그 구성약재인 인진, 치자, 대황을 처리하여 1시간이 지난 후에 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 다음으로 염증인자인 NO, PGE2의 production, iNOS, COX-2



expression, proinflammatory cytokines인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1의 생성량 등을 측정 하였다. 그 결과 인진호탕과 그 구성 약재가 모두 LPS로 유도된 염증인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, 그 중에서도 인진호탕과 인진의 효과가 가장 큰 것으로 관찰되었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 인진호탕 및 그 구성 약재는 강력한 항염증 활성을 가지고 있으며, 그 중 인진호탕과 인진의 효과가 가장 뛰어난 것으로 나타났다. 그러나 인진의 경우 300  $\mu$ g/ml 보다 높은 농도에서는 세포에 강한 독성을 가지는 것으로 보아, 복용인 인진호탕이 가장 이상적인 항염증 활성을 가지는 것으로 보인다. 따라서 동맥경화를 비롯한 고혈압, 당뇨병, 암이나 관절염 등 염증기작으로 인하여 생기는 많은 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

마우스 대식세포에서 茵陳蒿湯 및 그 구성약재의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

동맥경화 질환은 대표적인 만성염증성 질환 (chronic inflammatory disease)인데, 이러한 질환의 예방효과를 알아보기 위하여 약재를 전 처리하여 본 실험에서 선택한 약재가 동맥경화의 예방효과가 있는 지를 알아보는데 관심을 두었다.

1. 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 인진호탕, 인진, 치자, 대황의 독성 효과를 조사하여 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(300  $\mu$ g/ml)에서 실험을 진행하였다. 이는 인진호탕과 그 구성약재들이 보여주는 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성임을 말한다.
2. RAW 264.7 세포에 약재를 1시간 전 처리한 후, 100ng/ml의 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 결과 인진호탕과 그 구성약재들이 LPS로 유도되어야 할 NO, PGE2의 생성량과 iNOS, COX-2의 발현을 크게 저해하였고, 또한 염증성 사이토카인도 현저히 감소시켰다. 그 중에서도 특히 인진호탕과 인진의 효과가 탁월한 것으로 관찰되었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 인진호탕 및 그 구성 약재는 항염증 효과를 가지고 있으며, 그 중 인진호

탕은 고농도에서도 거의 독성을 나타내지 않아 가장 이상적인 효과를 나타내었다. 나아가 동맥경화를 비롯한 고혈압, 당뇨병, 암이나 관절염 등 염증기작으로 인하여 생기는 많은 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

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

본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임

## 참고문헌

1. 張仲景. 仲景全書. 서울 : 대성문화사. 1984 : 409, 494, 611.
2. 宗全和. 中醫方劑通釋 권 1. 중국 : 하북과학기술출판사. 1995 : 215-9.
3. 沈金鰲. 中醫對肝炎. 간경화적 변증론치. 중국 : 산서인민위생출판사. 1983 : 30-3.
4. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2004 : 239-41.
5. ak JS. Effects of Artemisia caillaris on the iNOS expression and sueroxide formation in the RAW264.7 cells. The Journal of Traditional Korean Medicine. 1999 ; 9(1) : 200-11.
6. 김호철. 한약약리학. 서울. 집문당. 2004 : 125-7.
7. Lee IA. Lee JH. Baek NI. Kim DH. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of Gardenia jasminoides and its metabolite Crocetin. Biol harm Bull. 2005 ; 28(11) : 2106-10.
8. eng CH. Huang CN. Wang CJ. The anti-tumor effect and mechanisms of action of enta-acetyl genioside. Curr Cancer Drug Targets. 2005 ; 5(4) : 299-305.
9. 김호철. 한약약리학. 서울. 집문당. 2004 : 174-7.
10. 김영명 외. 大黃유래 Laminaran이 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐의 혈청지질 성분에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 2006 ; 35(7) : 841-6.
11. Kim BH et al. Gerbil의 전뇌허혈에 대한 大黃의 신경보호효과. 대한한의학회지. 2002 ; 23(3) : 74-84.

12. Lee TY, Chang HH, Wu MY, Lin HC. Yin-Chen-Hao-Tang ameliorates obstruction-induced hepatic apoptosis in rats. *J harm pharmacol.* 2007 ; 59(4) : 583-90.
13. Lee TY, Chang HH, Chen JH, Hsueh ML, Kuo JJ. Herb medicine Yin-Chen-Hao-Tang ameliorates hepatic fibrosis in bile duct ligation rats. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 109(2) : 318-24.
14. Yamamoto M, Miura N, Ohtake N, Amagaya S, Ishige A, Sasaki H, Komatsu Y, Fukuda K, Ito T, Terasawa K, Geniin. a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Gastroenterology.* 2000 ; 118(2) : 380-9.
15. Yamamoto M, Ogawa K, Morita M, Fukuda K, Komatsu Y. The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. *Hepatology.* 1996 ; 23(3) : 552-9.
16. Tamura T, Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Koga H, Miyano T. Inchin-ko-to reverts medium-term liver fibrosis in ovariectomized biliary atresia patients. *ediatr Surg Int.* 2007 ; 23(4) : 343-7.
17. Kobayashi H, Horikoshi K, Yamataka A, Lane GJ, Yamamoto M, Miyano T. Beneficial effect of a traditional herbal medicine (inchin-ko-to) in ovariectomized biliary atresia patients. *ediatr Surg Int.* 2001 ; 17(5-6) : 386-9.
18. Sakaida I. Herbal medicine Inchin-ko-to(TJ-135) reverts liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol.* 2003 ; 38(6) : 762-9.
19. 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- $\kappa$ B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells.* 2007 ; 23(3) : 398-404.
20. 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- $\kappa$ B. *Dig Dis Sci.* 2007 ; 52(8) : 1890-6.
21. Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of acitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci.* [Epub ahead of print]. 2007.
22. Wang S, Chen Y, He D, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 114(3) : 458-62.
23. 失數道明 著. 具本泓 譯. 임상응용 새 한방처방해설. 서울 : (주)보건신문. 1995 : 461-5.
24. Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, Seki S, Matsui H, Kawada N, Arakawa T. Herb medicine Inchin-ko-to(TJ-135) regulates DGF-BB-dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats. *J Hepatol.* 2004 ; 41(2) : 242-50.
25. 정승식, 최승훈, 안규석.茵陳蒿湯 및茵陳蒿湯가미방이 생쥐의 담석증모형에 미치는 영향. 한국 : 동의병리학회지. 1991 ; 6 : 159-70.
26. 하재원, 조종관.茵陳蒿湯엑기스산이 알콜성 간진환에 미치는 영향. 해화의학. 1993 ; 1(2) : 190-4.
27. 성락기, 김원신, 전병훈. 이견목, 가감茵陳蒿湯수침액이 담도결찰로 유도된 간 손상에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1993 ; 8(1) : 71-110.
28. 김수곤, 서부일, 최선미, 최홍식. 한茵陳蒿湯이 알코올 투여로 유발된 흰쥐의 고지혈증과 간 손상에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2005 ; 20(1) : 9-11.
29. 박영순. 한방의 약리해설. 아카데미서적. 2002 : 153-4.
30. 曾野維喜. 續東西醫學臨床漢方處方學. 南山堂. 1995 : 98, 207-8.