

三黃洗劑가 Raw 264.7 cell 에서의 항염 효과에 미치는 영향

정순영 · 서형식
상지대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The Effects of *Samhwangseje* on Anti-Inflammation in Raw 264.7 cell

Soon-Young Jung · Hyeong-sik Seo

Objectives : This study was carried out to investigate the effects of Samhwangseje(SHSJ) on anti-Inflammation in Raw 264.7 cell.

Methods : The effects of SHSJ on anti-Inflammation were measured by the cytotoxicity of Raw 264.7 cell, the inhibition for NO, TNF- α , PGE₂, iNOS and COX-2, the blocking NF- κ B into nucleus.

Results :

1. All concentrations of SHSJ had no cytotoxicity in Raw 264.7 cell.
2. All concentrations of SHSJ inhibited the production of NO in the Raw 264.7 cell stimulated with LPS.
3. All concentrations of SHSJ did not inhibit the production of TNF- α in the Raw 264.7 cell stimulated with LPS.
4. All concentrations of SHSJ inhibited the production of PGE₂ in the Raw 264.7 cell stimulated with LPS.
5. All concentrations of SHSJ did not inhibit the expression of COX-2 but concentrations of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml SHSJ inhibited iNOS expression in the Raw 264.7 cell stimulated with LPS.
6. Concentrations of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml SHSJ had the effect of blocking NF- κ B into nucleus in LPS-induced macrophage Raw 264.7 cell.

Key words : *Samhwangseje*, NO, TNF- α , iNOS, COX-2, PGE₂, NF- κ B.

교신저자 : 서형식, 강원도 원주시 우산동 283번지
상지대학교 부속한방병원 안이비인후피부과
(Tel: 033-741-9266, E-mail: aran99@sangji.ac.kr)
• 접수 2009/02/27 • 수정 2009/03/25 • 채택 2009/04/08

I. 서 론

三黃洗劑는 《實用中醫外科學》¹⁾에 기재된 처방으로 大黃, 黃芩, 黃柏, 苦參으로 구성되어 있어, 급성 피부병 및 癩病 一切에 사용되는 외용약이다. 또한 清熱, 止痒, 收澁의 효능이 있어 각종 無滲出性 피부염과 滲出性 피부소양증, 黃水瘡, 赤白遊風, 乳癢 등의 병증^{2,3)}에도 사용할 수 있는 처방이다.

다양한 피부병에 응용할 수 있는 처방인 만큼 최근 三黃洗劑에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있는데, 중국에서는 本方 및 加味方을 통하여 음부 습진, 한포진, 수지외상감염, 습진, 임신성 양진 등에 대한 임상논문^{4,8)}을 꾸준히 발표하고 있다. 특히 清熱의 작용이 있어 한의학의 濕熱의 범주에 해당하는 농포창, 모낭염, 지루성 피부염, 여드름에 응용한 논문^{9,11)}도 다수 있다. 그러나 중국에서 발표된 三黃洗劑 및 加味方의 효능에 대한 실험적인 논문은 없는 상태이며, 국내에서는 원¹²⁾이 발표한 三黃洗劑加味方의 항염, 항균, 항알레르기에 대한 실험적 연구가 있으나 三黃洗劑 본방에 대한 실험적인 연구나 항염의 기전적인 측면에 대한 실험적 논문은 없는 상태이다.

이에 저자는 三黃洗劑의 清熱효능을 이용하여 肺經血熱과 脾經濕熱로 인한 염증 치료에 활용하고자, 三黃洗劑의 항염 효능을 알아보기로 하였다. 三黃洗劑가 세포에 미치는 독성 및 염증에 미치는 영향을 규명하기 위하여 NO, TNF- α , PGE₂의 생성 저해능, iNOS, COX-2의 발현 억제능, NF- κ B의 핵 내로의 이동 저해능을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용된 한약재는 《實用中醫外科學》¹⁾에 수록된 三黃洗劑(이하 SHSJ)의 처방에 따른 구성약물로 상지대학교부속 한방병원에서 구입한 후 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Samhwangseje*

韓藥名	生藥名	重量(g)
大黃	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	6.25
黃柏	<i>Phellodendri cortex</i>	6.25
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6.25
苦參	<i>Sophorae Radix</i>	6.25
Total amount		25.00

2) 균주 및 세포주

세포독성과 항염증에 RAW 264.7(Mouse Macrophage cell line) cell을 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank: KCLB)에서 분양받아 사용하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT), Griess reagent, Dimethyl sulfoxide (DMSO), N^G-methyl-L-arginine acetate(NMMA) Lipopolysccharide(LPS)는 Sigma(USA)에서 구입하였으며 Fetal Bovine Sereum(FBS), Penicillin-Streptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/HIGH GLUCOSE는 Hyclone (USA)에서 구입하였다. NF- κ B/P65(Rel A)Ab-1는 Labvision(USA)에서 구입하였으며 2차 Antibody는 Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG로 Jackson Lab(USA)에서 구입하여 사용하였다. TNF- α 와 PGE₂의 발현 정도의 측정은 각 ebioscience(USA), R&D system(USA) 제품을 사용하였다. 기기로는 ELISA reader(Perkin-Elmer,

Singapore)와 Multi-photon Confocal Laser Scanning Microscope system(Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)을 사용하여 실험하였다.

2. 방법

1) 시료조제

SHSJ 25 g을 분쇄기를 이용하여 분말로 만들고 2차 증류수 1 l 와 혼합하여 약탕기로 100°C에서 150분 동안 전탕한 후 추출하여 여과지(ADVANTEC 5C)로 여과하고 여과액을 회전감압농축기를 이용하여 완전 농축하였다. SHSJ를 microtube에 담은 후 100% DMSO를 이용하여 20 mg/ml의 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

2) 균주 및 세포 배양

RAW 264.7 cell을 10% FBS, penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 units/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 5% CO₂, 37°C의 환경에서 배양하였으며, 배지는 3~4일 간격으로 교체하고 배양용기에 90%이상 자라게 되면 계대 배양하여 실험에 사용하였다¹³⁾.

3) 세포 독성 측정

96 well plate 에 1×10⁴ cells/well의 농도로 RAW 264.7 cell을 접종하여 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, SHSJ의 농도가 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml가 되도록 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 각 well에 첨가하고, 4시간 동안 항온기에서 반응시킨 후, MTT 시약이 함유된 배지를 제거하였다. 각 well에 100 µl acid iso-propanol(0.04N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁴⁾.

4) 항염 효능 측정

① NO 생성 저해 효능

96 well plate에 well당 5×10⁵ cells/ml의 RAW 264.7 cell이 들어있는 부유액 100 µl를 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 최종 농도가 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml가 되도록 SHSJ를 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후 배지를 이용하여 NO의 생성 정도를 측정하였다¹⁵⁾. 세포배양액 50 µl와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H₂O) 50 µl를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 NO 생성 억제제인 NMMA를 50 uM이 되도록 시료와 같은 방법으로 처리하여 NO 생성 저해 효능을 비교하였다.

② TNF-α 생성 저해 효능

RAW 264.7 cell을 1×10⁶ cells/well의 농도로 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지를 이용하여 시료의 최종 농도가 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml가 되도록 처리한 후 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후 배지를 회수하여 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 회수하여 -70°C에서 보관하였다. 상온에서 측정 배지를 녹인 후 1× assay diluent를 사용하여 50배 희석하였다. 새 plate에 antibody를 코팅해주고 1× coating buffer로 capture Ab를 1/250으로 희석한 후 100 µl/well 넣어 주고 4°C에서 보관하였다. Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. 1× assay diluent 용액을 200 µl/well 넣어주고 실온에서 1시간 반응시킨 후 Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후, 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었

으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. TNF- α standard를 100 $\mu\text{l/ml}$ 넣어주고, TNF- α 측정할 세포 배양액을 1 \times assay diluent 용액으로 50배~100배 희석하여 100 $\mu\text{l/ml}$ 넣어주고 실온에서 2시간 반응시켰다. Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. Detection Ab를 1 \times assay diluent 용액으로 1/250으로 희석하여 100 $\mu\text{l/ml}$ 넣어주고 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. Avidin-HRP를 1 \times assay diluent 용액으로 1/250으로 희석하여 100 $\mu\text{l/ml}$ 넣어주고 실온에서 30분간 반응시켰다. Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. TMB solution을 100 $\mu\text{l/ml}$ 넣어주고 실온에서 15분간 반응시킨 후 Stop solution을 50 $\mu\text{l/ml}$ 넣어주고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ PGE₂ 생성 저해 효능

RAW 264.7 cell을 1 $\times 10^6$ /well의 농도로 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지를 이용하여 시료의 최종 농도가 20 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$ 이 되도록 처리하여 준 후 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후 배지를 회수하여 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 회수하여 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 상온에서 측정 배지를 녹인 후 Calibrator Diluent를 사용하여 5배 희석하였고 또한 PGE₂ standard를 2500, 1250, 625, 312.5, 156, 39의 농도가 되도록 Calibrator Diluent를 이용하여 희석하였다. 희석되어진 시료와 standard를 각 well에 100 μl 씩 넣고, PGE₂ conjugate와 PGE₂ antibody 용액을 각각 50 μl 씩 넣어준 후 shaker위에서 2시간 반응

시킨 후 PGE₂는 washing buffer를 이용하여 4~5번 세척하였다. Substrate Solution(Color reagent A와 B 용액을 각각 1:1로 섞어서 필요한 만큼 준비)을 각 well에 200 μl 씩 넣어 준 후 빛이 들어 오지 않는 곳에서 30분 동안 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위하여 2N HCl 용액을 각 well당 50 μl 씩 넣어준 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

④ iNOS, COX-2 발현 억제 효능

6 well plate에 well당 1 $\times 10^6$ cell/ml의 RAW 264.7 cell이 들어있는 부유액 1 ml을 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 최종 농도가 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 시료를 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 세포를 scrapper를 이용하여 회수하여 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후에 상층액을 제거하고, PBS를 이용하여 세척한 후 RIPA buffer를 100 μl 씩 넣고 혼합한 후에 얼음에서 30분 동안 세포를 용해시켰다. 세포를 용해시킨 후 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 상층액을 이용하여 Bicinchoninic Acid(BCA)법을 이용한 단백질 정량을 수행하였다. 단백질 정량 후 well당 35 μg 정도의 단백질을 10% SDS-PAGE에 넣고 100 V에서 1시간 동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 PVDF membrane에 단백질을 옮긴 후 COX-2, iNOS 1차 antibody를 반응시킨 후 2차 Antibody를 반응하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 단백질 보정을 위하여 β -actin도 함께 수행하였다.

⑤ NF- κ B의 핵 내로의 이동 저해 여부

6 well plate에 coverglass를 넣고 coverglass위에 RAW 264.7 cell을 1.5 $\times 10^5$ cell/ μl 의 농도로 300 μl 접종한 후 24시간 배양하였다. 시료를 농도별로 처리하였다. LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였고 처리 1시간 후에 PBS를 이용하여 2~3번 세척한 후 100% MeOH을 이용하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분

동안 고정하였다. 0.1% Triton X-100(in PBS)를 이용하여 15분간 투과한 후 PBS를 이용하여 3번 세척하였다. 5% BSA(in PBS)로 45분 동안 고정하였다. 1차 Antibody(NF- κ B, RB -1638 -P1)를 1:100으로 1% BSA가 포함되어 있는 PBS에 희석한 후 2시간 동안 반응시킨 후 PBS를 이용하여 3번 세척한 후 2차 Antibody(Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti -Rabbit IgG (H+L), 111 -165-003)를 1:1000으로 1% BSA가 포함되어 있는 PBS에 희석한 후 1시간 동안 37°C, 어두운 곳에서 반응시켰다. PBS를 이용하여 3번 세척한 후 1분 동안 DAPI(10 μ g/ μ l in PBS)으로 착색하였다. PBS를 이용하여 3번 세척한 후 coverglass에 Mounting medium을 떨어뜨리고 slideglass에 고정했다.

5) 통계분석

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 하였으며, 사후분석은 Duncan's multiple comparison test를 시행하였고 p값이 0.05 미만 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

III. 실험결과

1. 세포독성평가

SHSJ를 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도

Table 2. The Cytotoxic Effect of *Samhwangseje* on Macrophage RAW 264.7 cells by MTT Assay

Group	Average viability(%)	D
Control	100 \pm 1.09	a
20 μ g/ml SHSJ	106 \pm 3.40	b
50 μ g/ml SHSJ	100 \pm 1.83	a
100 μ g/ml SHSJ	96.3 \pm 2.66	a

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.(p<0.01)

D: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

SHSJ: *Samhwangseje*

로 처리한 RAW 264.7 cell의 생존율을 관찰한 결과, 각각 106.6 \pm 3.40%, 100 \pm 1.83%, 96.3 \pm 2.66%로 나타나 모든 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 나타났다(Table 2).

2. 항염 효능 평가

1) NO 생성 저해 효능

SHSJ가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 20 μ g/ml 농도에서 37.5 \pm 2.81%, 50 μ g/ml 농도에서 90.4 \pm 0.65%, 100 μ g/ml 농도에서 103 \pm 0.12%로 나타나 50과 100 μ g/ml에서 우수한 NO 생성 저해 효능이 있는 것으로 나타났다 (Table 3).

2) TNF- α 생성 저해 효능

SHSJ가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 TNF- α 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 20 μ g/ml 농도에서는 생성 저해 효능이 없었으며, 50 μ g/ml 농도에서 0 \pm 4.53%, 100 μ g/ml 농도에서 5.96 \pm 3.08%로 나타나 유의성 있는

Table 3. Inhibitory Effects of *Samhwangseje* on NO Production in LPS-induced Macrophage RAW 264,7 Cell

Group	Inhibition Rate(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	D
LPS(100 ng/ml)	0 \pm 0,65		a
20 $\mu\text{g/ml}$ NMMA	51,4 \pm 2,06	6,96	c
20 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	37,5 \pm 2,81		b
50 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	90,4 \pm 0,65	24,3	d
100 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	103 \pm 0,12		e

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.(p<0,001)

NO: Nitric oxide

LPS: Lipopolysaccharide

D: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

NMMA: N^G-methyl-L-arginineacetatesalt

SHSJ: *Samhwangseje*

Table 4. Inhibitory Effects of *Samhwangseje* on TNF- α Production in LPS-induced Macrophage RAW 264,7 Cell

Group	Inhibition Rate(%)	D
LPS(100 ng/ml)	0 \pm 1,21	a
20 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	-	
50 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	0 \pm 4,53	a
100 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	5,96 \pm 3,08	a

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.(non-significant)

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

LPS: Lipopolysaccharide

D: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

SHSJ: *Samhwangseje*

-: No inhibition

Table 5. Inhibitory Effects of *Samhwangseje* on PGE2 Production in LPS-induced Macrophage RAW 264,7 Cell

Group	Inhibition Rate(%)	D
LPS(100 ng/ml)	0 \pm 15,6	a
100 $\mu\text{g/ml}$ Indomethacin	94,4 \pm 1,54	b
20 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	85,6 \pm 1,78	b
50 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	96,1 \pm 0,92	b
100 $\mu\text{g/ml}$ SHSJ	95,0 \pm 1,93	b

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.(p<0,001)

PGE₂: Prostaglandin E₂

LPS: Lipopolysaccharide

D: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

SHSJ: *Samhwangseje*

TNF- α 생성 저해 효능은 없는 것으로 나타났다 (Table 4).

3) PGE₂ 생성 저해 효능

SHSJ가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 PGE₂ 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 양성대조군(Indomethacin)은 94.4 ± 1.54%의 생성 저해 효능이 있었고, SHSJ는 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 85.6 ± 1.78%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 96.1 ± 0.92%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 95.0 ± 1.93%로 나타나 양성대조군과 동일한 PGE₂ 생성 저해 효능이 있는 것으로 나타났다(Table 5).

4) iNOS, COX-2 발현 억제 효능

SHSJ가 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 iNOS, COX-2 발현을 억제하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, COX-2의 경우에는 모든 농도에서 발현 억제 효능을 나타내지 못하였고, iNOS의

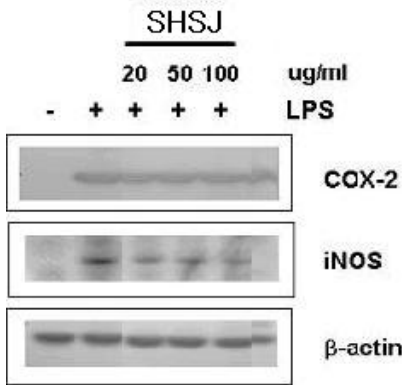


Fig. 1. Inhibitory Effects of *Samhwangseje* on iNOS, COX-2 Protein Expression in LPS-induced Macrophage RAW 264.7 Cell,

Lysates were prepared from control or 24h LPS(100 ng/ml) stimulated cells or from LPS plus SHSJ(20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Equal amounts of total protein(50 $\mu\text{g/lane}$) were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblot using specific anti-iNOS and anti-COX-2 antibodies. Actin is used as a loading control.

경우에는 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 발현 억제 효능이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1).

5) NF- κ B의 핵 내로의 이동 저해 여부

LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서 염증유발 전사인자인 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것을 확인하였으며, SHSJ를 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 각각 처리 하였을 때 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것을 저해 시켜주는 효능을 측정하는 실험을 한 결과 유의성 있는 이동 저해 효능이 나타났다(Fig. 2).

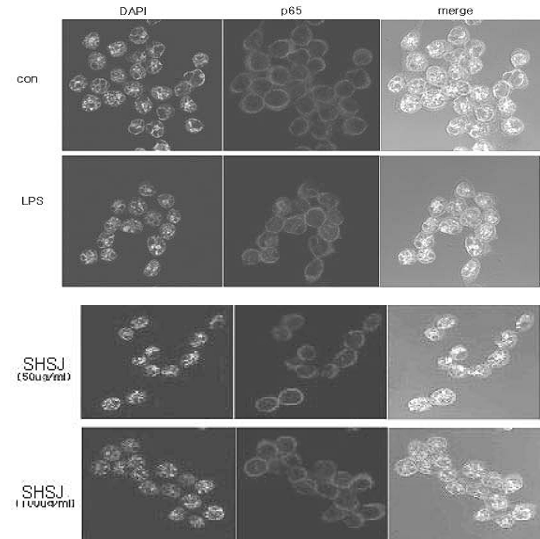


Fig. 2. The Effects of *Samhwangseje* on Blocking NF- κ B into Nucleus in LPS-induced Macrophage RAW 264.7 Cell,

NF- κ B was increased movement into nucleus by challenged with LPS. However, SHSJ was showed to reduce the movement of NF- κ B into nucleus.

IV. 고 찰

염증은 인체에 생기는 가장 흔한 질환으로, 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감

염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 회복 재생하려는 기전이다¹⁶⁾. 염증에 의한 반응으로 조직의 혈관확장에 의한 부종과 발열, 조직손상, 세포증식 등이 발생하며¹⁷⁾, 원인은 여러 가지이나 세균에 의한 것이 가장 많다¹⁸⁾.

한의학에서는 염증반응을 正邪투쟁의 결과로 체내에 나타나는 병리적 현상 중의 하나로 보았다¹⁹⁾. 염증에 대한 병리적 기전에 대해서는 《靈樞-癰疽》²⁰⁾에서 “寒邪客於經絡之中則血泣，血泣則不通，不通則衛氣歸之，不得復反，故癰腫”이라고 하였으며, 염증의 국소증상인 발적, 발열, 동통, 종창은 대개 火와 熱의 개념으로 보고 있다²¹⁾. 瘡瘍, 癰疽 등의 병증은 서양의학의 화농성 염증질환에 해당한다고 할 수 있다¹²⁾.

三黃洗劑는 淸熱, 止痒, 收澁의 효능이 있어 일체의 급성피부병 및 癰病, 紅腫焮痒出水한 피부병에 사용된 처방¹⁾으로 여드름에도 응용할 수 있는 외용약이다¹¹⁾. 처방구성은 大黃, 黃芩, 黃柏, 苦蔘으로 이루어져 있는데, 大黃²²⁾은 苦寒無毒한 性味로 脾, 胃, 大腸, 肝, 心包經으로 歸經해 瀉熱通腸, 涼血解毒, 逐瘀經痛하는 효능이 있으며, 黃芩²²⁾은 苦寒無毒한 性味로 肺, 膽, 胃, 大腸經에 歸經하여 瀉實熱, 除濕熱, 止血, 安胎의 효능이 있다. 黃柏²²⁾은 苦寒無毒한 性味로 腎, 膀胱, 大腸經에 歸經하여 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱하는 효능이 있으며, 苦蔘²²⁾은 苦寒無毒한 性味로 心, 肝, 胃, 大腸, 膀胱經으로 歸經해, 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利尿의 효능이 있다. 현대약리 연구 상 네 가지 약물 모두 살균, 피부진균 및 병독 등을 억제하는 작용, 모세혈관의 투과성을 낮추고 체액의 삼출을 억제하는 등 항염, 항과민작용에 좋은 효과가 있다는 것이 알려져 있다¹⁰⁾. 이러한 효능을 가진 약물들로 구성된 三黃洗劑가 염증 치료에 유효한 효과를 가지리라 생각되어, 어떠한 기전으로 항염작용을 하는지 알아보기 위하여 NO, TNF- α , PGE₂의 생성 저해

능, iNOS, COX-2의 발현 억제능, NF- κ B의 핵내로의 이동 저해능을 측정하는 실험을 시행하였다.

먼저 三黃洗劑의 세포 독성을 측정하기 위하여 三黃洗劑를 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 처리한 Raw 264.7 세포의 생존률을 관찰하였다. 그 결과 각각 106.6 \pm 3.40%, 100 \pm 1.83%, 96.3 \pm 2.66%로 나타나 모든 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다(Table 2).

염증이 유발되는 기전에 대해 살펴보면, 세균에 함유되어 있는 lipopolysacchride(LPS)로 세포가 자극되면 대식세포가 활성화되고, 활성화된 대식세포는 cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현하여 nitro oxide(NO), prostaglandin(PGE₂)의 염증 증대물질이나 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1, IL-6와 같은 cytokines 등 여러 염증성 매개체들을 과량으로 방출한다²⁰⁾. 이러한 매개체 중 세포의 염증에는 NO 및 TNF- α 생성, inducible NOS(iNOS) 및 NF- κ B가 관여하며, 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 PGE₂ 등의 염증인자가 iNOS 및 COX-2에 의해 형성된다²³⁾. 이렇게 생성된 매개체들은 조직 손상의 복구와 보호에 필요한 것이기도 하지만 과량 생산되면, 정상조직에도 과도한 면역반응과 염증 반응을 일으키게 된다²⁴⁾.

염증성 매개체중 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능, 혈관확장, 항균작용 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 대식세포가 LPS와 interferon- γ (IFN- γ)로 자극될 때는 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되는데, NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 저혈압, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다²⁵⁾. 그러므로 NO 합성의 억제가 만성적 염증질환에 대한 치료방법으로서 효율적이라는 점

을 유추할 수 있다. 본 실험에서는 三黃洗劑가 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $37.5 \pm 2.81\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $90.4 \pm 0.65\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $103 \pm 0.12\%$ 로 나타나 50과 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 양성대조군(NMMA)보다 뛰어난 NO 생성 저해 효능이 있음을 보여줬다(Table 3).

TNF- α 는 중요한 염증성 전구 cytokine으로서, T세포와 다른 염증세포 활성화뿐 아니라 IL-1, IL-6나 IL-10과 같은 cytokine의 분비를 유도하며, TNF- α 가 과생성되는 경우 iNOS의 발현을 증가 시킴으로서 NO생성이 급격히 늘어나게 된다. 그러므로 활성화된 macrophage에 의한 TNF- α 의 생산저하는 염증성 질환의 치료에 유용하게 이용될 수 있다²⁶⁾. 본 실험에서 TNF- α 생성을 저해하는 SHSJ의 효능을 측정한 결과, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 생성 저해 효능이 없었으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $0 \pm 4.53\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $5.96 \pm 3.08\%$ 로 나타났으나 유의성 있는 TNF- α 생성 저해 효능은 없었다(Table 4).

PG는 arachidonic acid에서 유래하는데, COX 효소의 작용을 받아 PG를 합성한다. PG는 PGE₂, PGI₂, tromboxane의 세 가지 형태가 있는데, 이 중 PGE₂와 PGI₂는 혈관투과성 향진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 관련이 가장 깊은 것으로 알려져 있다. 특히 PGE₂는 흥반, 발열, 부종 등의 염증반응에 관여하며, 염증의 초기 단계에 작용하는 핵심 물질이다²⁷⁾. 본 실험에서는 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 PGE₂ 생성을 저해하는 SHSJ의 효능을 측정하였는데, 그 결과 양성대조군(Indomethacin)은 $94.4 \pm 1.54\%$ 의 우수한 생성 저해 효능이 있었고, SHSJ는 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $85.6 \pm 1.78\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $96.1 \pm 0.92\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $95.0 \pm 1.93\%$ 로 나타나 SHSJ 역시 전 농도에서 양성대조군과 동일한 수준의 PGE₂ 생성 저해 효능이 있는 것으로 나타났다(Table 5).

iNOS는 NOS의 isoform 중 하나로 염증 등의 자극에 의해서 활성화된 대식세포에서 유래하고, NF- κ B에 의해 활성화되기도 하며, NO를 지속적으로 생산하게 하는 염증유발인자이다. iNOS는 과량의 NO를 생산하는데, NO는 과다생성되면 활성 산소(O²⁻)와 결합하여, 과산화질소(ONOO-)등의 또 다른 독성 유리기 물질을 만들어내고, 이들은 거의 모든 체내 기관에 해로운 영향을 미친다²⁴⁾.

COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재하는데, I형인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류 조절, 혈소판응집 등 우리 몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하며, 대부분의 정상적인 조직에서 발생하는 house keeping enzyme이다. 반면 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 하며, 조직의 손상이나 염증상태에서 그에 반응하여 다량으로 유도되는 효소이다²⁷⁾. 또한 백혈구나 대식세포의 활성을 유도하는 염증반응을 매개하는 중요한 인자 중의 하나이며, COX-2에 의해 합성된 적은 양의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다²⁸⁾. 본 실험에서 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 iNOS, COX-2 발현을 억제하는 SHSJ의 효능을 측정한 결과, COX-2의 경우에는 모든 농도에서 발현 억제 효능을 나타내지 못하였고, iNOS의 경우에는 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 발현 억제 효능이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1).

NF- κ B는 전사인자(transcriptional factor)로서 염증반응과 면역반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하는 종양 형성, 자가면역 질환, 염증 질환에 중요한 역할을 담당한다²⁹⁾. 이는 COX-2나 iNOS와 같은 염증과정들을 매개하는 효소의 유도에 관여하는데, 이런 염증성 분자들은 전사단계에서 조절되기 때문에 핵전사인자인 NF- κ B는 일련의 염증반응과정에서 매우 중요한 세포 간 매개체로 작용한다³⁰⁾. 따라서 NF- κ B를 억제하는 약물은 과다

한 염증관련 유전자의 발현을 억제함으로 만성 염증 질환의 발병을 예방하거나 치료제로 활용하고 있다³¹⁾. 본 실험을 통해 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 염증유발 전사인자인 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것을 확인하였으며, 여기에 SHSJ를 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도로 각각 처리 하였을 때 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것을 저해 시켜주는 효능을 측정 한 결과 유의성 있는 이동 저해 효능이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

이상의 실험결과를 종합하면, 三黃洗劑가 항염증의 병리과정 중에서 COX-2를 통한 염증반응의 매개를 억제하지는 못하였으나, NF- κ B의 활성을 억제하여 iNOS의 단백질 발현을 억제시키고, 염증성 매개체인 NO와 PGE₂도 억제함을 입증할 수 있었다.

V. 결 론

三黃洗劑의 항염증 효능을 관찰하기 위한 NO, TNF- α , PGE₂ 생성 저해 효능, iNOS, COX-2 발현 억제 효능, NF- κ B의 핵 내로의 이동 억제 효능을 측정 한 실험의 결과는 다음과 같다.

1. 三黃洗劑는 모든 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 나타났다.
2. 三黃洗劑가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 NO 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 농도 의존적인 생성 저해 효능이 나타났다.
3. 三黃洗劑가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- α 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 유의성 있는 생성 저해 효능은 없는 것으로 나타났다.
4. 三黃洗劑가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 PGE₂ 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 농도 의존적인 생성 저해 효능이 나타났다.

5. 三黃洗劑가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 iNOS, COX-2 발현을 억제하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, COX-2의 경우에는 모든 농도에서 발현 억제 효능을 나타내지 못하였고, iNOS의 경우에는 50 μ g/ml 농도와 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있는 발현 억제 효능이 있는 것으로 나타났다.

6. 三黃洗劑가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 염증 유발 전사인자인 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 三黃洗劑를 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도로 각각 처리 하였을 때 유의성 있는 이동 저해 효능이 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 三黃洗劑는 항염증 효능이 우수하므로 염증 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 顧伯葦 主編, 實用中醫外科學, 上海: 上海科學技術出版社, 1985:535-6, 628.
2. 江克明, 包明蕙, 방제대사전, 서울: 의성당, 1991:68.
3. 楊思澍, 張樹生, 傅景華, 중의임상대전, 서울: 의성당, 1993:864, 886, 900.
4. 葛華, 三黃洗劑治療陰部濕疹 48例, 陝西中醫, 2002;23(3):257.
5. 龔明, 三黃洗劑爲主治療汗疱疹 85例, 陝西中醫, 2000;21(3):129.
6. 張宏亮, 李雪瑞, 楊樹耿, 自擬三黃洗劑加減治療手指外傷感染 36例, 內蒙古中醫藥, 2000;19:12.
7. 董新亮, 烏秀華, 三黃洗劑治療濕瘡 54例, 長春

- 中醫學院學報, 1999;15(3):43.
8. 曹玉忠. 三黃洗劑治療妊娠性痒疹療效觀察. 中國現代醫藥雜誌, 2008;10(2):106.
 9. 石秀蘭. 中藥三黃洗劑在皮膚科的應用. 新中醫, 1996:105.
 10. 李舜華. 三黃洗劑在皮膚病中的運用. 江西中醫藥, 1996:113.
 11. 黃春黎. 蜂膠三黃洗劑治療痤瘡24例臨床觀察. 養蜂科技, 2004:39.
 12. 원영호, 심은기, 안찬근, 박민철, 황충연. 三黃洗劑加味方の 항균, 항염 및 항알레르기효과에 대한 실험적 연구. 대한안이비인후피부과학회지, 2005;18(1):135-53.
 13. H. Kim, H. Lim, B. Kim, H. Kim, S. Choi, C. Yoon, Studies on the anti-acne effect of Agrimonia pilosa Ledeb. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 2006;32(1):53-8.
 14. T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application of proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*, 1983;65:55.
 15. S. M. Han, K. G. Lee, J. H. Yeao, H. Y. Kweon, and K. K. Park. Anti-inflammatory effect of the venom from asian honeybees (*Apis cerana* L.) on inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in Raw 264,7 cell line. *Korean J. Apiculture*, 2004;19:89.
 16. 이은방, 정수연, 이숙영, 류향옥, 승상애, 양지선, 유태무. Studies on the antiinflammatory effects of natural products. 응용약물학회지, 1998;6(3):269-75.
 17. Wu MJ, Wang L, Ding HY, Weng CY, Yen JH. *Glossogyne tenuifolia* acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPS-induced NF- κ B. *J Biomed Sci* 2004;11:186-99.
 18. 박희준, 이제현, 김수영, 심범상, 구현종 외. 고량강의 항염증 작용에 대한 연구. 大韓本草學會誌, 2005;20(2):43-53.
 19. 최승만, 김민주, 최영호, 안호정, 윤여표. *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과 검색. 대한약학회지, 1998;42:89-94.
 20. 홍원식 편. 精校黃帝內經靈樞. 서울: 동양의학 연구원출판부, 1985:345-50.
 21. 신연상. 유백피의 항염 및 조직재생에 대한 실험적 연구. 대한외관과학회지, 2001;14(1):129-53.
 22. 전국한의과대학 본초학교수 공편지. 本草學. 서울: 영림사, 1998:178-9, 182, 186, 243.
 23. Han M, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ. Acetylbritannilone suppresses NO and PGE₂ synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression. *Life science*, 2004;75:675-84.
 24. 이연아, 홍승재, 이상훈, 박은경, 김경수 외. 황련 추출물의 항염 효과. 경희의학, 2007;23(1):21.
 25. Tsai, P., Weaver J., Cao G.L, Pou S., Roman L.J., Starkov A.A., Rosen G.M. *Biochem. Pharmacol*, 2005;69(6):971-9.
 26. Vilcek J., Lee T.H. Tumor necrosis factor; New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. *J. Biol Chem*, 1991;266:7313-6.
 27. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글린딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지, 1998;42:558-66.
 28. Keller, B. Pharmaceut Composit. *Therap*.

- 2002:16.
29. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappa B in the resolution of inflammation. *Nat Med*. 2001;7(12):1291-7.
30. Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends pharmacol. Sci*. 1997; 18(2):46-50.
31. 김영일. 牡丹皮·桃仁 배합이 항염증 작용에 미치는 영향. 원광대학교 대학원(박사). 2005.