

원저

## 鬼箭羽약침액이 대식세포의 Nitric Oxide와 Interleukin-6의 생성에 미치는 영향

전재천 · 이은용

세명대학교 부속충주한방병원 침구과

### Abstract

### The Effects of *Euonymi Lignum Suberatum* Pharmacopuncture on Nitric Oxide and Interleukin-6 Production in Macrophage

Jeon Jae-cheon and Lee Eun-yong

Department of Acupuncture & Moxibustion, Chung-ju Oriental Medical Hospital,  
College of Oriental medicine, Semyung University

**Objectives** : The objective of this study is to study the effects of *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution on NO and IL-6 production in macrophage.

**Methods** : At first, the RAW 264.7 macrophage was subclutured. In order to evaluate cytotoxicity, MTT assay performed. Then, the cell was induced by LPS, INF- $\gamma$  and Experimental groups were divided into five(Normal, Control, *Euonymi Lignum Suberatum* 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Then *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution was put into cell. We measured IL-6, iNOS, NO.

**Results** : The cytotoxic effect of *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophage was not appeared.

300 $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution inhibited IL-6 production in LPS, INF- $\gamma$ -stimulated RAW 264.7 macrophages significantly.

*Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution inhibited iNOS revelation in LPS, INF- $\gamma$ -stimulated RAW 264.7 macrophages.

All group of *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution inhibited NO production in LPS, INF- $\gamma$ -stimulated RAW 264.7 macrophages significantly.

**Conclusions** : Our study demonstrated that *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution had

· 접수 : 2010. 7. 28. · 수정 : 2010. 8. 5. · 채택 : 2010. 8. 7.  
· 교신저자 : 이은용, 충북 충주시 봉방동 836번지 세명대학교 부속충주한방병원 침구과  
Tel. 043-841-1735 E-mail : acupley@semyung.ac.kr

an inhibition effect on NO production, iNOS revelation, IL-6 production. So *Euonymi Lignum Suberatum* pharmaco puncture solution may have an Anti-inflammation effect.

**Key words** : *Euonymi Lignum Suberatum*, Pharmacopuncture, IL-6, iNOS, NO, Anti-inflammation

## I. 서 론

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응으로<sup>1)</sup>, 대식세포에서 IL-6같은 염증성 cytokine 등의 자극에 의해 NF-κB를 활성화시키며 그 결과 iNOS를 발현시켜 과량의 NO를 생성하여 염증이 발생된다<sup>2,3)</sup>. 따라서 염증반응 기전에서 염증성 cytokine인 IL-6의 변화량, iNOS의 발현 및 NO의 변화량을 관찰하여 조절, 억제할 수 있다면 세포내에서 염증의 유발을 감소시킬 수 있는 물질을 발견할 수 있을 것이다<sup>4,5)</sup>.

鬼箭羽(*Euonymi Lignum Suberatum*)는 衛矛과에 속하는 화살나무(*Euonymus alatus*(Thunb.) Sie bold)의 枝條로서 衛矛, 鬼見羽, 鬼箭 등의 異名이 있으며, 性味가 苦寒無毒하고 破血, 通經, 殺蟲, 抗瘀血, 血糖降下하는 효능이 있어 주로 瘀血停滯, 局部疼痛, 產後瘀血阻滯, 腹部疼痛, 皮膚風毒腫 등에 응용될 수 있다<sup>6-10)</sup>. 鬼箭羽에 대한 최근의 연구에는 윤<sup>11)</sup>의 抗腫瘍效果, 장 등<sup>12)</sup>의 抗알레르기 효과 및 면역반응에 미치는 영향, 이 등<sup>13)</sup>의 抗炎症 효과에 대한 연구 등이 있으나 아직까지는 鬼箭羽의 효과에 대한 연구, 특히 항염증 효과에 대해서는 충분한 연구가 부족한 실정이다.

약침요법은 경락학설과 약물요법의 원리를 바탕으로 유관한 혈위, 압통점 혹은 체표의 촉진으로 얻어진 양성반응점에 선택한 각종약물을 정제하여 주입함으로써 침작용과 약물의 약리작용을 통하여 각종 질병을 치료하는 신침요법으로서 약물의 사용량을 줄이면서도 치료효과를 높일 수 있는 장점을 가지고 있다<sup>14)</sup>.

항염증 치료에 있어서 鬼箭羽를 이용한 연구<sup>13)</sup>는 있으나 鬼箭羽를 약침으로 활용하여 항염증 효과를 고찰한 연구는 이루어지고 있지 않았다. 이에 저자는 약침제조방법을 이용해 鬼箭羽의 항염증 효과를 연구하기 위하여 대식세포에서 염증과 관련된 IL-6의 생성, iNOS 발현 및 NO의 생성에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 방 법

### 1. 세포배양

실험에 사용된 RAW 264.7 murine macrophage cell을 (주)한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM의 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, subculture는 48시간 간격으로 하였다.

### 2. 약침액의 제조

실험에서 사용한 鬼箭羽는 세명대학교 부속제천한방병원(충북 제천, Korea)에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 鬼箭羽 100g을 1L의 증류수에 넣고 2시간 상온 방치 후 100℃에서 2시간 전당하고 여과지로 3회 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 200ml로 농축시킨 후, -80℃에서 동결하였다. 이 농축액을 다시 freezer dryer system(Labconco, USA)를 이용하여 7일간 동결건조한 후 최종적으로 1.84g의 분말을 얻었으며, 이를 3차 증류수에 용해하여 0.80μm syringe filter로 1차 필터링하고, 0.20μm syringe filter로 2차 필터링한 후 약침액으로 사용하였다.

### 3. 세포 독성 평가

鬼箭羽약침액의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 24well plate에 RAW 264.7cell을 4×10<sup>5</sup>cells/ml로 분주하고, 12시간 incubation 한 후 약침액을 0, 100, 200, 300μg/ml로 처치하였다. Plate를 다시 24시간 incubation 시킨 후에 MTT labeling solution(Roche, Germany)을 각 well에 10μl씩 넣어 4시간 incubation하고, 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)에 녹여 ELISA reader(Bio-Tek,

USA)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4. IL-6 함량측정

24 well plate에 RAW 264.7cell을 4×10<sup>5</sup>cells/ml로 분주하고, 12시간 incubation한 후 LPS 10μg/ml, INF-γ 100U/ml를 처치함과 동시에 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300μg/ml로 처치하였다. 다시 plate를 24시간 incubation한 후 얻은 상층액 100μl를 검액으로 하고 Mouse IL-6 ELISA kit(Thermo scientific, USA)을 이용하여 IL-6의 함량을 측정하였다. 96well plate에 검액과 표준액을 50μl씩 분주하고 가볍게 tapping하여 혼합하고 가볍게 shaking하면서 2시간 반응시킨 후 washing buffer로 3회 plate를 세척하였다. Biotin-lated antibody reagent를 100μl/well로 넣고 1시간 반응시킨 후 washing buffer로 3회 plate를 세척한 다음 Streptavidin - HRP solution을 100μl/well로 분주하여 30분간 반응시키고 wash ing buffer로 3회 plate를 세척하였다. 최종적으로 100μl/well의 TMB substrate solution을 넣어 발색시키고, 10분 후 stop solution을 넣어 반응을 종료한 다음 ELISA reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. RT-PCR을 이용한 iNOS 관찰

24well plate에 RAW 264.7cell을 4×10<sup>5</sup>cells/ml로 분주하고, 12시간 incubation 시킨 후 LPS 10μg/ml, INF-γ 100U/ml를 처치함과 동시에 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300μg/ml로 처치하였다. 다시 plate를 24시간 incubation한 후 상층액 100μl를 TRI reagent(Molecular Research Center, USA)를 이용하여 mRNA를 추출하고, 각각의 RNA를 동량으로 하여 cDNA를 합성한 후, 10pM primer, 10mM dNTP mix, 1.25 U EF -

Taq DNA polymerase, 10 X EF-Taq buffer(Solgent, Korea)를 포함하는 혼합액에 cDNA를 넣어 predenaturing phase 95°C 2min, 1cycle; denaturing phase 95°C 20sec, annealing phase 58°C 40sec(cyclophilin 60°C), elongation phase 72°C 20sec 30cycle; post-elongation phase 72°C 5min, 1cycle의 조건으로 PCR을 수행하였다. Product를 10μl씩 Ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 넣고 100V의 전압으로 20분 전기영동한 후, UV로 관찰하였다(Table 1).

#### 6. NO의 측정

NO는 Nitric Oxide detection kit(iNtRON, Korea)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 24well plate에 RAW 264.7cell을 4×10<sup>5</sup>cells/ml로 분주하고, 12시간 incubation한 후 LPS 10μg/ml, INF-γ 100U/ml를 처치함과 동시에 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300μg/ml로 처치하였다. 다시 plate를 24시간 incubation한 상층액 100μl를 96well plate에 옮겨 substrate solution을 50μl 넣고 5분간 상온에 방치한 다음 coloring solution을 50μl 넣고 5분 후에 ELISA reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7. 통계처리

- ① 실험 결과의 통계처리는 SPSS 프로그램(ver. 12.0)을 이용하여 모든 자료의 평균(mean)과 표준편차(SD)를 산출하였다.
- ② 각 군 간의 성적 차이는 one-way ANOVA test를 시행하고 사후 검정으로 Turkey test를 시행하여 확인하였으며, 유의수준은 p<0.05로 설정하였다.

Table 1. Primer Sequences Used in This Study

Gene name	Primer sequence
Cyclophilin (299bp)	Forward : 5'-CATTTGCCATGGACAAGATG-3'
	Reverse : 5'-ACCCCACCGTGTCTTCGAC-3'
i-NOS (115bp)	Forward : 5'-CACTCAGCCAAGCCCTCAC-3'
	Reverse : 5'-GCCTCCAATCTCTGCCTATCC-3'

### III. 성 적

#### 1. 鬼箭羽약침액의 세포 독성 평가

RAW 264.7cell에 鬼箭羽약침액을 각각 0, 100, 200, 300μg/ml로 처치하고 MTT assay로 생존율을 확인하였다. 0μg/ml로 처치한 군(Control)의 생존율을 100%로 하였을 때 100, 200, 300μg/ml로 처치한 군의 생존율은 각각 98.41±7.45%, 99.76±4.03%, 96.28±6.43%

Table 2. Cell Viability in RAW 264.7 Macrophage

Group	Relative viability(% control)
Control	100±10.00
100	98.41±7.49
200	99.76±4.03
300	96.28±6.43

Control : 0µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 100 : 100µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 200 : 200µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 300 : 300µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 Values are represented as mean±SD(n=4).

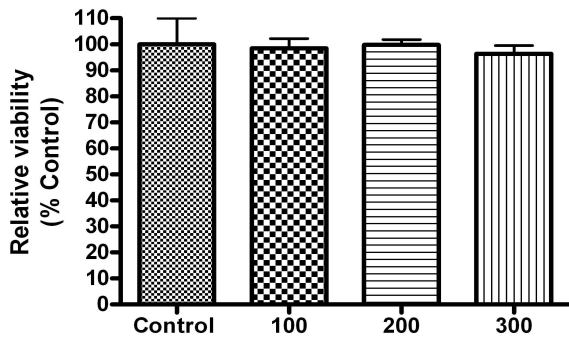


Fig. 1. This graph describes cell viability of *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophage

Control : 0µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 10 : 100µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 200 : 200µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 300 : 300µg/ml *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution treated group.  
 Values are represented as mean±SD(n=4).

로 鬼箭羽약침액의 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 1).

## 2. 鬼箭羽약침액이 IL-6 생성에 미치는 영향

IL-6의 생성은 Control군에서 IL-6의 생성량은 1693.73±204.83pg/ml로 Normal군의 70.40±31.75pg/ml에 비해 큰 폭으로 증가하였다. 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300µg/ml로 처치한 군에서 IL-6의 생성량은 각각 1524.40±217.19pg/ml, 1268.10±205.24pg/ml, 665.07±317.77pg/ml로 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 鬼

Table 3. IL-6 Production in RAW 264.7 Macrophage

Group	IL-6(pg/ml)
N	70.40±31.75
C	1693.73±204.83***
100	1524.40±217.19***
200	1268.10±205.24***
300	665.07±317.77***,††

N : Normal group.  
 C : Control group(LPS 10µg/ml, INF-γ 100U/ml treated group).  
 100 : C + *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution 100µg/ml treated group.  
 200 : C + *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution 200µg/ml treated group.  
 300 : C + *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution 300µg/ml treated group.  
 Values are represented as mean±SD(n=6).  
 \*\*\* : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.001$ .  
 †† : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.01$ .

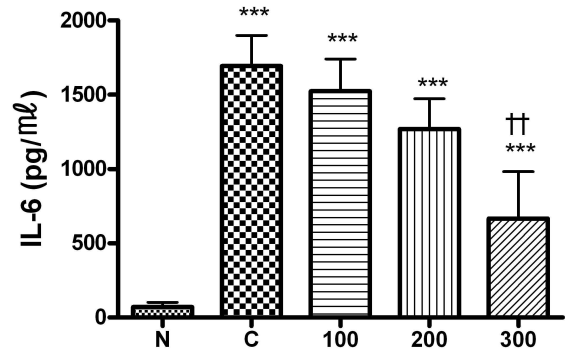


Fig. 2. This graph describes IL-6 production of *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophage

N : Normal group.  
 C : Control group(LPS 10µg/ml, INF-γ 100U/ml treated group).  
 100 : C + *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution 100µg/ml treated group.  
 200 : C + *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution 200µg/ml treated group.  
 300 : C + *Euonymi Lignum Suberatum* pharmacopuncture solution 300µg/ml treated group.  
 Values are represented as mean±SD(n=6).  
 \*\*\* : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.001$ .  
 †† : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.01$ .

箭羽약침액을 300µg/ml로 처치한 군에서 유의한 감소가 나타났다(Table 3, Fig. 2.).

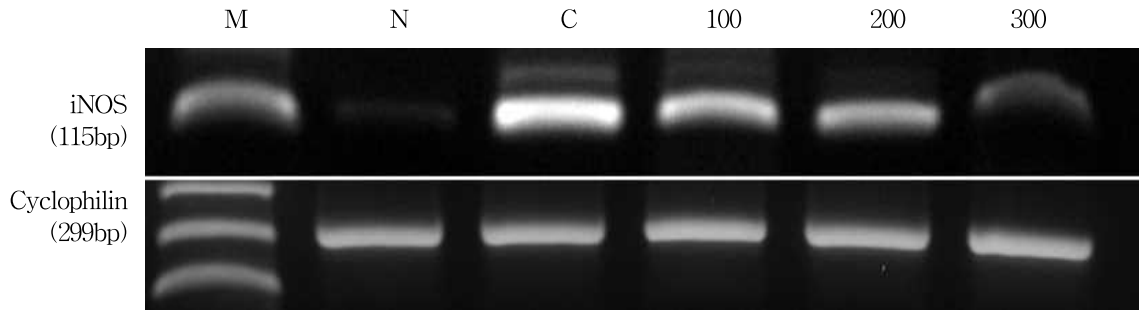


Fig. 3. This spectrogram describes iNOS revelation of *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophage

M : Marker. N : Normal group. C : Control group(LPS 10 $\mu$ g/ml, INF- $\gamma$  100U/ml treated group).  
 100 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 100 $\mu$ g/ml treated group.  
 200 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 200 $\mu$ g/ml treated group.  
 300 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 300 $\mu$ g/ml treated group.

Table 4. NO Production in RAW 264.7 Macrophage

Group	NO( $\mu$ M)
N	1.39 $\pm$ 0.27
C	65.58 $\pm$ 2.00 <sup>***</sup>
100	60.64 $\pm$ 1.16 <sup>***,†††</sup>
200	58.68 $\pm$ 2.26 <sup>***,†††</sup>
300	50.19 $\pm$ 1.87 <sup>***,†††</sup>

N : Normal group.  
 C : Control group(LPS 10 $\mu$ g/ml, INF- $\gamma$  100U/ml treated group).  
 100 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 100 $\mu$ g/ml treated group.  
 200 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 200 $\mu$ g/ml treated group.  
 300 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 300 $\mu$ g/ml treated group.  
 Values are represented as mean $\pm$ SD(n=6).  
<sup>\*\*\*</sup> : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.001$ .  
<sup>†††</sup> : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.001$

### 3. 鬼箭羽약침액이 iNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향

Normal군에서는 iNOS가 발현되지 않았고, control군에서는 iNOS 발현이 되었으며, 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300 $\mu$ g/ml로 처치한 군에서 iNOS의 발현이 control군에 비하여 상대적으로 억제되었다. House keeping gene으로는 cyclo philin을 사용하였다(Fig. 3).

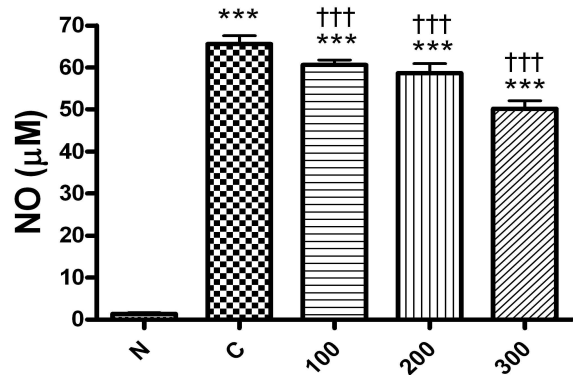


Fig. 4. This graph describes NO production of *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution in RAW 264.7 macrophage

N : Normal group.  
 C : Control group(LPS 10 $\mu$ g/ml, INF- $\gamma$  100U/ml treated group).  
 100 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 100 $\mu$ g/ml treated group.  
 200 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 200 $\mu$ g/ml treated group.  
 300 : C + *Euonymi Lignum Suberatatatum* pharmacopuncture solution 300 $\mu$ g/ml treated group.  
 Values are represented as mean $\pm$ SD(n=6).  
<sup>\*\*\*</sup> : Statistically significant difference from the Normal group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.001$ .  
<sup>†††</sup> : Statistically significant difference from the Control group, as determined by the Turkey test as  $p < 0.001$ .

### 4. 鬼箭羽약침액이 NO 생성에 미치는 영향

LPS와 INF- $\gamma$ 를 처치한 control군에서 NO의 생성량은 65.58 $\pm$ 2.00 $\mu$ M로 아무것도 처치하지 않은 normal

군의  $1.39 \pm 0.27 \mu\text{M}$ 에 비해 큰 차이를 보였다. LPS와 INF- $\gamma$ 를 처리하고 동시에 鬼箭羽약침액을 100, 200,  $300 \mu\text{g/ml}$ 로 처리한 군에서의 NO 생성량은 각각  $60.64 \pm 1.16 \mu\text{M}$ ,  $58.68 \pm 2.26 \mu\text{M}$ ,  $50.19 \pm 1.87 \mu\text{M}$ 로 鬼箭羽약침액 처리군 모두에서 control군에 비해 유의한 감소가 나타났다(Table 4, Fig. 4).

#### IV. 고찰

炎症은 상처를 줄 수 있는 자극에 대하여 내부의 항상성을 유지하기 위한 생체의 방어반응으로, 임상적으로는 發赤, 發熱, 腫瘡, 疼痛, 機能障礙의 5가지 증상이 나타나며 cytokines, PGE2, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하는 작용이다<sup>15)</sup>. 일반적으로 LPS 등의 자극에 의해 IL-1, TNF, IL-6 같은 염증성 cytokine이 분비되면, NF- $\kappa$ B, iNOS, TNF- $\alpha$ , COX-2의 발현을 유도하는데, NF- $\kappa$ B 활성이 증가되면 COX-2 및 iNOS의 발현에 관여하여 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 NO의 생성을 유발하여 염증반응이 나타나게 된다<sup>16-18)</sup>.

이러한 염증반응에서 외부의 자극에 대하여 대응하는 면역 활성 조절 물질로는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF 등을 들 수 있는데, 이들은 그 생물학적 작용의 다양성, 생성세포의 다양성으로 생체의 항상성을 유지시키는 기본적인 호르몬의 일종일 것으로 생각되고 있다. 이러한 cytokine은 일반적으로 외부에서 오는 여러 자극에 대하여 한 개체의 세포와 유기적 내지는 종합적 반응을 나타내는데 필요한 세포 상호간의 작용을 매개하는 역할을 하며, 조절작용, 면역반응, 일반적 염증과정 등에 관련된 모든 세포들의 작용을 조절한다. 이들이 다른 endocrine성 hormone과 다른 점은 특별한 gland가 아닌 여러 종류의 세포에서 같은 종류의 물질이 생산될 수 있으며 한 가지 cytokine이 한 가지 이상의 표적세포에 작용하여 그 표적세포의 고유한 기능의 향진을 유발함으로써 여러 가지 차원의 병리 생리학적 소견이 도출된다는 것이다<sup>19)</sup>.

특히 IL-6는 면역 세포인 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조혈계에 다양한 기능을 나타낸다<sup>20)</sup>. 지금까지 알려진 IL-6의 기능은 B세포의 성장 및 분화에 관여하며, 간에서 hepatocyte-stimulating factor 같은 작용을 해서 murine B cell hybridomas의 성장촉진, multicolony stimulating factor

(CSF) 같은 작용을 해서 hematopoietic stem cell을 활성화시키며, T세포의 증식과 분화에 관여하며, 각질세포의 성장유도에 관여하는 것으로 되어 있으며<sup>21-23)</sup> 이렇게 다각적인 기능을 가진 IL-6는 감염, 염증과 조직손상에 대해서 면역 기능조절 급성상 단백질(acute phase protein)의 합성, 조혈기능 등의 역할을 함으로써 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>24)</sup>. 그리하여 많은 연구에서 IL-6이 급성 조절단백으로 류마티드 관절염에서 염증반응에 주된 매개 작용으로 혈청 및 관절염에 손상된 관절의 관절액에서 IL-6의 활성도가 증가하며, 특히 외상성 관절염 및 골관절염보다 높은 활성도를 보여 질환의 활성도와 연관성이 있다고 보고하고 있다<sup>21,25-27)</sup>.

IL-6의 분비에 의해 발현되는 iNOS는 NO의 생성을 유도하는 효소 중의 하나로서 L-arginine로부터 NO를 생성시킨다<sup>28)</sup>. iNOS는 외부로부터 침입한 병원성 미생물 및 종양세포에 대한 방어물질로 작용하는 것으로 알려져 있으며<sup>29)</sup>, 다량의 NO를 생성하여 주세포의 면역작용에 중요한 역할을 수행하지만 필요이상으로 분비된 과량의 NO의 원인이 되어 만성 염증을 유발한다<sup>30)</sup>.

염증반응중에 생성되는 NO는 본래 신경계통 조직에서 신경전달물질, 신경조절물질 또는 이차전령물질로 작용하는 것으로 알려진 자유롭게 확산하는 기체 free radical이다<sup>31)</sup>. 신경계·혈관계·면역계에서 세포 사이의 작용을 매개하여 혈압조절 및 항생작용, 신경계의 정보와 기억에까지 넓은 범위에서 활성을 나타내는 생물학적 신호로서 작용한다<sup>32)</sup>. NO는 1990년 초에 동물세포에서 세포간의 메신저 물질로 생성된다는 것을 발견하였고, 혈압, platelet adhesion, neutrophil의 집성뿐만 아니라 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되었다. 즉 NO는 혈소판 내에서 혈소판의 응집을 억제하며 대식세포에서 세포독성을 매개하는 작용을 하며 일부 인체조직에서는 혈관확장을 매개하는 물질로도 알려져 있는데<sup>32)</sup>, 이 NO가 적게 만들어지면 고혈압, 성교불능, 동맥경화 등의 증상이 나타나고 낮은 농도에선 신호로 작용을 하지만 고농도의 NO는 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있기 때문에 NO의 생성은 조절될 필요성이 있다<sup>33)</sup>.

鬼箭羽(*Euonymi Lignum Sube ratatum*)는 衛矛과에 속하는 枝條로서 衛矛, 鬼見羽, 鬼箭 등의 異名으로도 불리운다. 性味が 苦寒無毒하고 肝經으로 들어가서

破血, 通經, 殺蟲, 抗瘀血, 血糖降下하는 효능이 있어 주로 瘀血停滯, 局部疼痛, 產後瘀血阻滯, 腹部疼痛, 皮膚風毒腫 등에 응용되며, 經閉, 蟲疔, 腹痛, 婦人血氣, 崩中, 產後腹痛, 歷節風, 賊風, 中惡, 癥結, 蟲積腹痛 등을 主治한다<sup>6-10</sup>. 鬼箭羽에 대한 최근의 연구로는 윤<sup>11</sup>의 抗腫瘍效果, 장 등<sup>12</sup>의 항알레르기 효과 및 면역반응에 미치는 영향, 이 등<sup>13</sup>의 抗炎症 효과에 대한 연구가 있다.

약침요법은 경락학설과 약물요법의 원리를 바탕으로 유관한 혈위, 압통점 혹은 체표의 촉진으로 얻어진 양성반응점(아시혈, 압통점)에 선택한 각종 약물을 정제하여 주입함으로써 침작용과 약물의 약리작용을 통하여 각종 질병을 치료하는 신침요법으로서 약물의 사용량을 줄이면서도 치료효과를 높일 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 본 연구에서는 약침액 형태로 대식세포에 주입하여 관찰하는 방법을 선택하였다<sup>14</sup>.

본 연구에서 저자는 鬼箭羽의 항염증작용에 착안하여, LPS와 INF- $\gamma$ 로 유도된 macrophage cell line인 RAW 264.7cell을 선정하여 鬼箭羽약침액을 처리한 후 鬼箭羽의 세포독성에 대해 관찰하기 위하여 MTT 반응실험을 하였고, 또한 鬼箭羽약침이 염증반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 IL-6 생성, iNOS 발현, NO의 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

鬼箭羽약침액의 세포독성을 조사하기 위해 鬼箭羽약침액을 각각 0, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 MTT assay로 생존율을 확인한 결과 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군(Control)의 생존율을 100%로 하였을 때 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군의 생존율은 각각 98.41 $\pm$ 7.45%, 99.76 $\pm$ 4.03%, 96.28 $\pm$ 6.43%로 나타나 鬼箭羽약침액의 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 1).

鬼箭羽약침액이 IL-6의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , INF- $\gamma$  100U/ml를 처리하는 동시에 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 뒤 비교한 결과 control군에서 IL-6의 생성량은 1693.73 $\pm$ 204.83pg/ml으로 normal군의 70.40 $\pm$  31.75pg/ml에 비해 큰 폭으로 증가하였고, 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서 IL-6의 생성량은 각각 1524.40 $\pm$ 217.19pg/ml, 1268.10 $\pm$ 205.24pg/ml, 665.07 $\pm$  317.77pg/ml로 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 鬼箭羽약침액을 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서는 유의한 감소가 나타났다. 이것을 통하여 鬼箭羽약침액이 IL-6의 감소에 유의한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(Table 4, Fig. 4).

鬼箭羽약침액이 iNOS 발현에 어떠한 영향을 미치

는지 알아보기 위하여 LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , INF- $\gamma$  100U/ml, 鬼箭羽약침액 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 뒤 RT-PCR을 시행한 결과 normal군에서는 iNOS가 발현되지 않았으며, control군에서는 iNOS 발현이 증가되었으며, 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서 iNOS의 발현이 control군에 비하여 상대적으로 억제된 것으로 보아 鬼箭羽약침액은 iNOS의 발현의 억제에 있어서도 유의한 영향을 미치는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3).

鬼箭羽약침액의 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LPS 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , INF- $\gamma$  100U/ml를 처리하는 동시에 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 뒤 비교한 결과 LPS와 INF- $\gamma$ 를 처리한 control 군에서 NO의 생성량은 65.58 $\pm$ 2.00 $\mu\text{M}$ 로 아무 것도 처리하지 않은 normal군의 1.39 $\pm$ 0.27 $\mu\text{M}$ 에 비해 큰 차이를 보였고, LPS와 INF- $\gamma$ 를 처리하고 동시에 鬼箭羽약침액을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서의 NO 생성량은 각각 60.64 $\pm$ 1.16 $\mu\text{M}$ , 58.68 $\pm$ 2.26 $\mu\text{M}$ , 50.19 $\pm$ 1.87 $\mu\text{M}$ 로 control군에 비해 유의한 감소가 나타났는데, 이것을 통하여 鬼箭羽약침액은 NO의 감소에 유의한 영향을 미치는 것을 관찰할 수가 있었다(Table 3, Fig. 2).

본 실험의 결과를 종합적으로 고려해볼 때 鬼箭羽약침액은 염증반응에 관여하는 IL-6의 생성, iNOS의 발현, NO의 생성을 억제시킴으로써, 항염증효과가 있는 것으로 관찰되며, 이는 鬼箭羽약침액의 임상적 이용에 기초 자료를 제시할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

鬼箭羽약침액이 대식세포에서의 IL-6의 생성, iNOS의 발현, NO의 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 鬼箭羽약침액은 RAW 264.7 대식세포에서 MTT에 의한 세포독성을 관찰한 결과 100, 200, 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  모두 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 鬼箭羽약침액은 LPS와 INF- $\gamma$ 에 의해 유도된 염증 모델에서 NO의 생성을 감소시키며, 鬼箭羽약침액을 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 군에서는 유의성 있는 감소를 나타내었다.
3. 鬼箭羽약침액은 LPS와 INF- $\gamma$ 에 의해 유도된 염증 모델에서 iNOS 발현을 억제시켰다.

4. 鬼箭羽약침액은 LPS와 INF- $\gamma$ 에 의해 유도된 염증 모델에서 鬼箭羽약침액을 처리한 100, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$  모두에서 IL-6의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 鬼箭羽약침액은 염증과 관련된 요소인 IL-6의 생성, iNOS의 발현, NO의 생성을 억제함으로써, 실험적으로 항염증 효과를 갖고 있는 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

- 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 1995 : 83-9.
- Ito T, Ikeda U. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Current Drug Target Inflammation & Allergy*. 2003 ; 2(3) : 257-65.
- Bartus VV, Talaieva TV, Radalovska NV. The role of a systemic inflammatory process in the atherogenic modification of lipoproteins and the development of hypercholesterolemia. *Fiziol Zh*. 1999 ; 45(1-2) : 40-9.
- 배상철, 김동욱, 김태환, 전재범, 정성수, 이인홍, 유대현, 김성운, 이은영, 장성렬. 염증성 관절염에서 NO의 역할에 관한 연구. *대한내과학회지*. 1997 ; 52(1) : 32-41.
- 조성도, 김연호, 김영규, 김성숙, 고철연, 이범재. 류마티드 관절염 환자에서 Interleukin-6 측정의 임상적 의의. *대한정형외과학회지*. 1999 ; 34(2) : 327-31.
- 傳統醫學研究所 編. 東洋醫學大辭典. 서울 : 成輔社. 2000 : 283.
- 허준. 국역증보 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1995 ; 1226.
- 장일무 외. 東洋醫藥科學大典. 서울 : 서울대학교 학술편수관. 2003 : 60.
- 양시진. 本草述鉤元. 科技衛生出版社. 1957 : 542.
- 오이곡 主編. 中藥學. 上海 : 上海科學技術出版社. 1991 : 242-3.
- 윤진여. 消積四君子湯 瓦松 및 鬼箭羽가 MNNG를 투여한 흰쥐에 抗癌 作用에 관한 研究. *동국대학교 논문집*. 1986 : 311-22.
- 장일진, 채우석. 鬼箭羽水鍼이 實驗的 血栓症과 알레르기 및 免疫反應에 미치는 影響. *대한침구학회지*. 1994 ; 11(1) : 405-33.
- 이호현, 박용수, 김나영, 김동일, 이태균. 쥐의 대식세포에서 鬼箭羽의 메탄올 및 부탄올 추출물에 의한 일산화질소 합성 저해작용. *대한한의학회지*. 2005 ; 26(1) : 26-36.
- 대한침구학회 교재편찬위원회. *침구학(중)*. 서울 : 집문당. 2008 : 408.
- Fox JB, Doerr RC, Lakritz L. Interaction between sample preparation techniques and three methods of nitrite determination. *J Assoc Off Anal Chem*. 1982 ; 3 : 690-5.
- 김세종. 免疫學. 서울 : 고려의학. 1994 : 263-4.
- Kaltschmidt B, Spama T, Kaltschmidt C. Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. Summer. 1999 ; 1(2) : 129-44.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH. 15-Doxy- $\Delta$ 12-14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kB signaling pathway. *Proceeding National Academy of Science of the USA*. 2000 : 97(9) : 4844-9.
- 정태호, 김정철, 김문규. 최신 면역학 강의. 대구 : 경북대학교 출판부. 1996 : 211-25.
- Suzuki Y, Rani S, Liesenfeld O, Kojima T, Lim S, Nguyen TA, Dalrymple SA, Murray R and Remington JS. Impaired Resistance to the Development of Toxoplasmic Encephalitis in Interleukin-6-Deficient Mice. *The Journal of Infection And Immunity*. 1997 ; 65(6) : 2339-45.
- FA Houssiau, JP Devogelaer, J van Damme, CN de Deuxchaisnes, J van Snick. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with Rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis and Rheumatism*. 1988 ; 31 : 783-8.
- Uson J, Balsa A, Pascual-salcedo D, Cabezas JA, Gonzales-Tarrio JM, Martin-mola E, Fontan G. Soluble Interleukin-6 (IL-6) receptor and (IL-6) levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. *J Rheumatol*. 1997 ; 24 : 2069-75.
- Himo T, Malsud T. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in Rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 1988 ; 18 : 1797-801.



24. 조성도, 김연호, 김영규, 김성숙, 고철언, 이법재. 류마티드 관절염 환자에서 Interleukin-6 측정의 임상적 의의. 1999 ; 34(2) : 327-31.
25. Waage A, Kaufmann C, Espevik T and Husby G. Interleukin-6 in synovial fluid from patient with rheumatoid Arthritis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1989 ; 50 : 394-8.
26. Okumoto H, Yamamura M, Morita M, Harada S, Makino H, Ota Z. The synovial expression and serum level of Interleukin-6, Interleukin-11, leukemia inhibitory factor and oncostatinm in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1997 ; 40 : 1096-105.
27. Helle M, Boeije L, E de Groot, Alex de vos A, Aarden L. Sensitive ELISA for interleukin-6. Detection of IL-6 in biological fluid : synovial fluids and sera. *Journal of Immunological Methods*. 1991 ; 138 : 47-56.
28. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 1991 ; 88 : 2811-4.
29. Solary E, Bertrand R, Khon KW, Pommier Y. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase and inhibitors. *Blood*. 1993 ; 81 : 1359.
30. Flitney FW, Megson IL, Thomson LM, Kennovin GD, Butler AR. Vasodilator response of rat isolated tail artery enhanced by oxygen-dependent, photochemical release of nitric oxide from ironsulphur nitrosyls. *Br J Pharm Acol*. 1996 ; 117 : 1549-57.
31. Spinass GA. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet  $\beta$ -Cell. *New Phisiol Sci*. 1999 ; 14 : 49-54.
32. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chemical & Engineering News*. 1993 : 26-38.
33. Anggard E. Nitric oxide : mediator, murderer and medicine. *Lancet*. 1994 ; 9 : 1199-206.