

해독금화산 물추출물이 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에 미치는 영향

임재수[#], 강옥화[#], 서윤수, 권동렬^{*}

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소

Effects of *Haedokgumhwa-san* Water Extracts on LPS-induced Inflammatory Response in Macrophage

Jae-Soo LIM[#], Ok-Hwa KANG[#], Yun-Soo SEO, Dong-Yeul KWON^{*}

Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, 344-2 Sinyong-dong, Iksan, Chonbuk 54538, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The *Haedokgumhwa-san* water extract (HDKHS) is used in Korea, Japan and China as a traditional therapeutic agent to cure an infectious disease. But its study is not enough. Therefore, the present study focused on the elucidation of HDKHS to investigate the anti-inflammatory effects and to establish the possible mechanisms involved in its action on LPS-stimulated immune response in murine macrophages.

Methods : Inflammatory status was induced by LPS and measured by increasement of inflammatory mediators. LPS induced secretions of NO and PGE₂ in RAW 264.7 cells were measured using griess reagent and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit respectively. production of IL-6 was examined using ELISA kit and expression of IL-6 mRNA was measured by RT-PCR method. To investigate the effects of HDKHS on inflammatory mediators, such as iNOS, COX-2 and MAPKs, western blot and RT-PCR were performed.

Results : HDKHS significantly reduced production of NO and PGE₂ which were induced by LPS. Also, activation of IL-6 was reduced both protein and mRNA levels. The expressions of inflammatory mediator include iNOS and COX-2 were decreased by pretreatment with HDKHS. Furthermore the result showed HDKHS down-regulate the LPS induced phosphorylation of ERK 1/2, one of the MAPK family, which is considered as a main regulator of transmission from pathogens to nucleus of immune cells.

Conclusions : Our results suggest that the anti-inflammatory properties of HDKHS may stem from the inhibition of pro-inflammatory mediators via suppression of initiation of inflammatory response by inhibiting MAPKs signaling pathways.

Key words : *Haedokgumhwa-san*, Anti-inflammatory activity, Macrophages, Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

서론

염증은 다양한 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중 자극 성 물질에 의해 혈관이 확장되어 세포막의 유동성이 증가하고

부종이 일어나며 이를 통해 손상된 부위를 복구시키려는 정상적인 생체 방어기전으로서 조직의 변성, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 유발하는 복합적인 병변으로 주요 증상으로는 발열, 발적, 동통, 부종 등이 있다^{1,2)}.

*Corresponding author : Dong-Yeul KWON, PhD Department of Oriental Pharmacy College of Pharmacy Wonkwang Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr

#First author : Jae-Soo LIM, Department of Oriental Pharmacy College of Pharmacy Wonkwang Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-6802

Ok-Hwa KANG, Department of Oriental Pharmacy College of Pharmacy Wonkwang Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : kangokhwa@daum.net

· Received : 26 August 2015 · Revised : 02 October 2015 · Accepted : 02 October 2015

한방적 관점에서 염증은 그 증상의 유사성을 보았을 때 癰, 疽, 疔, 疔, 疔 등과 관계가 깊다. 『靈樞·癰疽篇』에서 "營氣가 경맥 속에 머무르면 營血이 응체되어 순행하지 못하고 순행하지 못하면 衛氣가 이를 따라 통하지 않으니, 衛氣가 막혀 순행할 수 없으므로 熱이 나고, 심한 熱이 몇지 않아서 熱이 왕성하면 肌肉이 腐爛되고, 肌肉이 腐爛되면 化膿된다³⁾." 고 하여 營氣와 衛氣의 불통을 염증의 기전을 제시하고 있다. 또한 염증의 발열 및 혈관확장은 한방적으로 熱證의 속성을 가지고 있으므로 熱證의 속성을 가진 化膿과 그 속성이 유사함을 알 수 있다. 膿血이란 피고름이 섞여 있는 것을 말하며, 膿血病은 이질에 의해 피고름이 섞인 대변을 누는 증상을 나타낸다. 이는, 濕熱毒이 大腸에 몰려 氣와 血이 傷하게 되어 일반 痢疾 증상과 함께 大便에 피와 고름이 섞여 나오는 증상으로 주로 瘡瘍이 터져 泄瀉와 함께 나오는 것으로 볼 수 있을 것이다⁴⁾. 瘡瘍에는 腫瘍과 癰, 疽등이 포함되며, 주로 邪毒이 침입하여 생긴 邪熱로 인해 血이 상하게 되어 氣血이 물려있는 것으로 한방적으로 熱證의 속성을 가지고 있다. 한방에서는 "諸痛瘡瘍皆屬於火"라고 하여 모든 痛, 瘡瘍은 火의 성질을 가진다고 하였다. 瘡瘍에 동반되어 나타나는 火, 즉, 熱證의 속성은 인체의 氣가 邪氣와 다투는 과정에서 나타나는 면역반응으로 이것은 염증과 그 양상이 유사함을 알 수 있다. 또한 瘀血, 痰飲, 氣鬱 등이 지속되면 여러 조건에 의해 化火하여 內火로서 작용하여 인체의 恒常性도 깨뜨리게 된다⁵⁾.

解毒金花散은 금원사대가중 한명인 元나라 朱丹溪의 경험 처방으로 『丹溪心法』 19편 痢에서 下痢 膿血毒을 치료한다고 수록되어 있고 『東醫寶鑑』 내경편 4권중 大便편 痢疾諸證 膿血痢에서는 熱毒 膿血痢를 치료한다고 되어 있다^{6,7)}. 解毒金花散은 黃連·黃柏 각 2錢, 黃芩·白朮·赤芍藥·赤茯苓 각 1錢으로 구성 되어 있다. 黃連, 黃芩, 黃柏에 梔子가 더해진 黃連解毒湯⁸⁾은 一切 熱毒에 사용할 수 있다. 白芍藥, 白朮, 白茯苓 세 가지 약재와 炙甘草로 구성된 것이 三白湯인데 一切 泄瀉⁹⁾에 사용한다. 黃連解毒湯과 三白湯의 의미가 합해 있는 처방인 解毒金花散은 전통적으로 膿血痢와 같은 감염으로 인한 염증성 질환에 사용되어온 처방으로 항염증활성을 가지고 있을 것으로 예상되지만, 아직 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 대한 항균효과에 대해서만 보고가 되어있을 뿐¹⁰⁾, 解毒金花散의 항염증작용과 그에 대한 기전의 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 이번 연구에서는 LPS를 처리한 RAW 264.7 cells을 이용하여 黃連解毒湯의 항염증 활성을 검증하고 그 기전을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

자극원으로 사용한 LPS (*E. coli* lipopolysaccharide), 세포 배양에 사용되는 RPMI-1640 배지와 Penicillin-Streptomycin, Bovine Serum Albumin (BSA)는Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, Fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone (New zealand) 제품을 구입해 사용하였다. 조직

배양 플레이트와 직경 100mm 페트리접시는 넉스사 (Nunc, Inc, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에서 필요한 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)는 Promega (Madison, Wisconsin, USA)에서 구입하였다. PGE₂ EIA kit 와 IL-6 ELISA kit를 R&D시스템스 (MN, USA)로부터 구입하였다. Western blot 실험에서 필요한 Protein Extraction Solution은 iNtRON Biotechnology (Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였고, Ponceau S solution은 Sigma (St. Louis, Mo, USA), EzReprobe은 ATTO (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. COX-2, iNOS, β -actin, MAPKs (ERK, JNK, p38), 단일세포 항체 및 peroxidase-conjugated된 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였다. PCR실험에서 사용된 Easy Blue total RNA Extraction kit는 iNtRON Biotechnology (Gyeonggi-do, Korea), Reverse Transcription kit는 Giagen (Valencia, CA, USA), Sensi 2 × PCR premix은 Lugen, Gel red, 6 × loading buffer는 Dynebio (Gyeonggi-do, Korea), Primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입해 사용하였다.

2) Primer 준비

RT-PCR을 위해 여러 개의 primer를 사용하였다. Primer의 구성은 table 1과 같다.

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

cDNA		Primer sequence
iNOS	forward	5'-CATGTTCTCTGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACTAGGTTTGCCGAGTA-3'
COX-2	forward	5'-CACTCAGTTTGTGTAGTCATTG-3'
	reverse	5'-GATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3'
IL-6	forward	5'-CATGTTCTCTGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACTAGGTTTGCCGAGTA-3'
β -actin	forward	5'-ATGAAGATCTGACCCAGCGT-3'
	reverse	5'-AACGCACTCAGTAACAGTCCG-3'

2. 방법

1) 시료의 조제방법

解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)은 (주)백제허브에서 구입한 黃連, 黃柏, 黃芩, 白朮, 赤芍藥, 赤茯苓을 3차 증류수 (100g/L)로 2시간 환류 추출하여 준비하였다. 그 추출물을 0.45 μ m filter paper로 여과 후 rotary evaporatory (EYELA, JAPAN)로 감압 농축 후 동결 건조하였으며, 2.8g이 얻어져 4°C에서 보관하였다. 동결건조 된 추출물은 실험하기 위하여 인산완충 식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)에 용해하였다(Table 2).

Table 2. The composite of *Haedokgumhwa-san*

Herb name	Parmacognostic name	Weight (g)
黃連	Coptidis Rhizoma	8
黃柏	Phellodendri Cortex	8
黃芩	Scutellariae Radix	4
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	4
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	4
赤茯苓	Poria Sclerotium	4

2) 세포 배양

본 실험에 사용된 세포인 murine macrophage cell line, RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행으로부터 구입하여 사용하였다 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology American Tissue Culture Collection). 대식세포는 항생제 및 항균제로서 100 U/mL의 페니실린과 100 µg/mL의 streptomycin을 첨가하고 10% 열처리 우태아 혈청 (heat inactivated FBS)을 첨가한 완전한 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂의 습한 대기, 37°C의 온도조건으로 배양하였다. 이 때 사용한 FBS는 사용하기 전 56°C에서 30분간 heat-inactivation 시켜 사용하였다.

3) 시료의 처리

100mm culture dish에 부착된 세포들을 cell scraper를 이용하여 세포를 이탈시킨 후, hemocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. 이 후 실험방법에 따라 적정 농도로 희석한 후 well-plate에 접종하여 배양하였다. HDKHS는 각각 PBS에 용해시킨 후 접종한지 24시간 후에 RAW 264.7 세포만을 배양한 정상균인 대조군, LPS로 자극한 대조군, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리한 실험군으로 분류하였다.

4) MTS 분석

RAW 264.7 세포 (5×10^4 cells/mL)를 96-well culture plate에 RPMI 1640배지와 함께 100 µL로 분주한 뒤 하룻밤 배양한 다음, HDKHS (50, 100, 250 과 500 µg/mL)을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTS 용액을 20 µL 씩 넣은 후 2시간 동안 배양하면서 환원 반응을 유도하여 발색정도를 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성 (cell toxicity)은 세포만 배양한 무 처리군의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포 생존율을 계산하였다.

5) NO 생성량 측정

PBS로 희석한 HDKHS를 여러 농도 (50, 100, 250 및 500 µg/mL)로 처리하고 여기에 LPS (200 ng/mL)를 각각 주입한 다음 상기 대식세포 RAW 264.7을 24시간 배양하였다. 대식세포의 상층액을 수집하여 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)와 동량으로 주입한 후 10분간 실온에서 방치하였다. 반응 후 상층액의 흡광도 값은 Microplate reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 아질산 0-30 µM의 흡광도 값을 측정하여 이 값을 기준으로 하여 여러 실험군의 생성된 NO의 흡광도 값을 정량하였다.

6) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 HDKHS를 각각 100, 250, 500 µg/mL농도로 1시간 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/mL)로 RAW 264.7 대식세포를 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 IL-6

생성량을 ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

7) PGE₂ 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 HDKHS를 각각 100, 250, 500 µg/mL 농도로 1시간 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/mL)로 RAW 264.7 대식세포를 자극한 후 세포부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE₂ 생성량을 EIA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량해 분석하였다.

8) Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS로 세척 한 후 1 mL의 lysis buffer을 첨가하여 20분간 lysis 시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 정량은 BSA와 Bio-Rad protein Assay Kit를 사용하였고, microplate reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하고 정량하였다. 20-30 µg의 lysate를 8-12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 Ponceau S solution으로 염색 한 후, Transfer가 잘 되었는지 확인하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBST (TBS + 0.05% Tween 20)용액에서 상온에서 1시간 동안 실시하였다. MAPKs의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 ERK anti-mouse (1 : 1000) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 TBST 용액에서 희석하여 상온에서 3시간 반응시킨 후 TBST로 15분간 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1 : 2000으로 희석하여 상온에서 1 시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1-3분 간 반응 후 ImageQuant™ LAS 4000 mini을 이용하여 단백질 발현량을 분석하였다.

9) RNA 분리 및 RT-PCR

HDKHS에 의한 COX-2와 iNOS 발현과의 상관성을 알아보기 위하여 RT-PCR로 mRNA 발현을 조사하였다. RNA 및 RT-PCR RNA 세포의 준비는 6-well culture plate에 2×10^6 cells/mL 의 농도로 세포로 분주한 다음, 하루 밤 동안 안정화 시켰다. 이 세포에 HDKHS (100, 250, 500 µg/mL)을 처리한 후, LPS로 자극하고 24시간 후에 세포를 모아 PBS로 세척하여 이지 블루 (easy blue, 인트론사) 1 mL을 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200 µL를 넣고 다시 교반하여 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 한 다음, 상층액 400 µL에 isopropanol 동량을 가하여 다시 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 70% EtOH로 2회 세척한 후, DEPC가 처리된

증류수에 용해시켰다. cDNA를 합성하기 전 Nano Drop 기기로 A260/A280 nm의 비율이 1.6~2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료를 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 Reverse Transcription kit를 사용하였다. cDNA에 IL-6, B-actin, COX-2, iNOS Primer를 넣고 유전자 증폭기를 이용하여 증폭시켰다. 2% Agarose Gel에 Gel red를 1 : 10,000 희석시켜 전기영동 한 후, UV 검출기로 발현 정도를 확인하였다.

10) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 ± 표준편차 (SD)를 구하여 그 유의성은 SPSS (ver.22)를 사용하여 Student's *t*-test 분석법을 따라 분석하였으며, 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 세포생존율에 대한 영향

RAW 264.7세포에서 HDKHS의 세포생존율을 MTS assay 방법으로 조사하였다. 그 결과, HDKHS 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 이후 실험은 세포 독성이 없는 농도범위에서 수행하였다(Fig. 1).

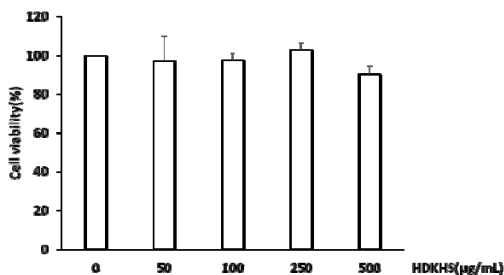


Fig. 1. Effect of HDKHS on cell viability in RAW 264.7 cells. The cell viability assessed using an MTS assay following incubation with different doses (50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of HDKHS for 24 hours.

2. NO 생성에 대한 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 억제 효과

NO 생성에 대한 HDKHS의 항염증 효과를 알아보기 위해 Griess reagent 시약을 이용한 방법으로 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2 의 형태를 측정하였다. HDKHS은 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리농도에서 각각 농도 의존적이고 유의적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

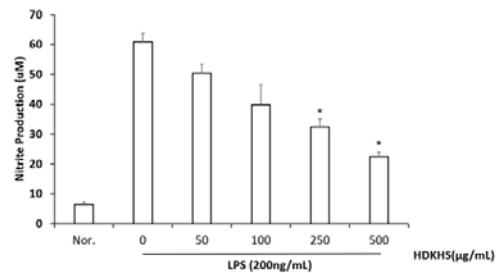


Fig. 2. Effect of HDKHS on NO production LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pre-treated with the indicated concentration of HDKHS for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Data are mean \pm SD values of triplicate determinations from three separate experiment. $P < 0.05$, when compared to the LPS treated group.

3. PGE₂ 생성에 대한 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 억제 효과

대식세포 매개 PGE₂는 COX-1과 COX-2로부터 생성되는데, 소량의 경우 생체대사에 필수적이지만 유도성 COX-2의 과발현에 의한 과량의 PGE₂는 강력한 염증 매개물질로 작용하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 PGE₂를 대상으로 HDKHS의 약리학적 효능 평가를 실시하였다. RAW 264.7 대식세포에 HDKHS을 각각 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 1시간 동안 처리한 후, LPS (200 ng/mL)로 세포주를 자극하여 1시간 후 세포부유액을 원심분리하여 상층액을 수집하고 PGE₂ 생성량을 측정된 결과, Normal에서는 PGE₂ 생성량이 매우 낮게 측정되었으나, LPS의 자극에 의해 현저히 증가 되었다. 반면, HDKHS을 처리한 그룹 가운데 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 농도 의존적으로 PGE₂ 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

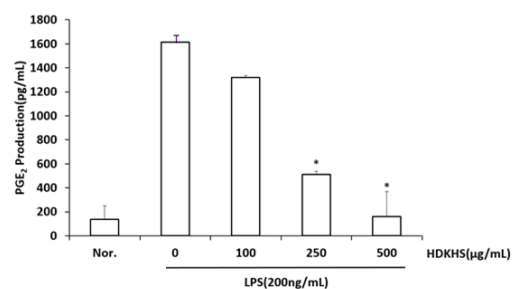


Fig. 3. Effect of HDKHS on PGE₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pre-treated with the indicated concentration of HDKHS for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 24 hours. Data are mean \pm SD values of triplicate determinations from three separate experiment. $P < 0.05$, when compared to the LPS treated group.

4. COX-2와 iNOS의 단백질 발현에 대한 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 억제 효과

HDKHS의 COX-2와 iNOS의 단백질 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 Western blot을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 COX-2와 iNOS의 단백질 발현은 약물

처리 시 억제되는 양상을 보였으며 500 µg/mL으로 처리 시 iNOS의 발현이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

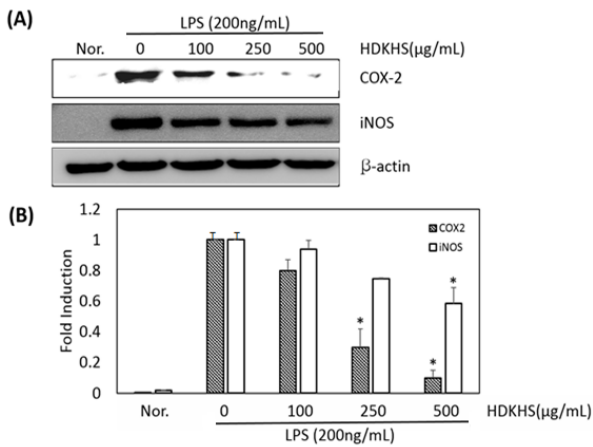


Fig. 4. Effect of HDKHS on protein expression of COX-2 and iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cell were pre-treated with HDKHS for 30 minutes, and then incubated with LPS (200 ng/mL) for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods. Date are mean \pm SD values of triplicate determinations from three separate experiment. * P < 0.05, when compared to the LPS treated group.

5. COX-2와 iNOS의 mRNA 발현에 대한 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 억제 효과

HDKHS의 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현은 약물 처리 시 농도 의존적으로 억제되는 양상을 보였으며 500 µg/mL으로 처리 시 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 5A, B).

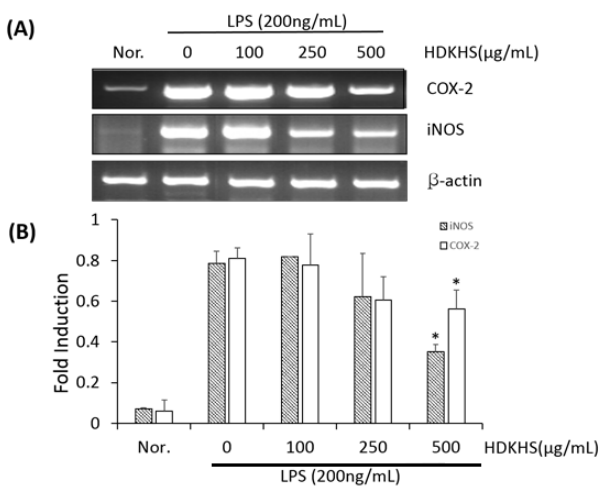


Fig. 5. Effect of HDKHS on the mRNA expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with HDKHS as indicated concentrations for 30 minutes, and then incubated with or without LPS (200 ng/mL) for 24 hours. iNOS and COX-2 mRNA transcription level was assessed by RT-PCR. Date are mean \pm SD values of triplicate determinations from three separate experiment. * P < 0.05, when compared to the LPS treated group.

6. IL-6 생성에 대한 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 억제 효과

RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때 약물처리군의 경우 정상대조군에 비해 IL-6 생성량이 급격히 증가하였다. HDKHS를 처리하였을 때 IL-6의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 6).

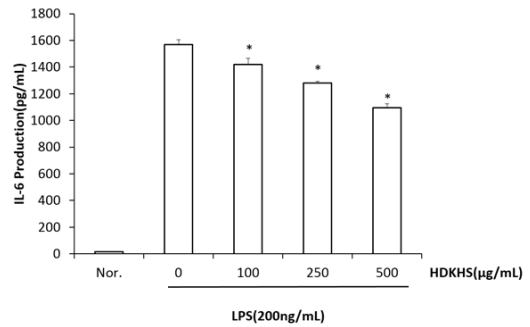


Fig. 6. Effect of HDKHS on the productions of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were treated with HDKHS at indicated concentrations for 30 minutes, and then incubated with 200 ng/mL LPS for 18 hours as described in materials and methods. Date are mean \pm SD values of triplicate determinations from three separate experiment. * P < 0.05, when compared to the LPS treated group.

7. IL-6의 mRNA 발현에 대한 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 억제 효과

HDKHS의 IL-6의 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 IL-6의 mRNA 발현은 약물 처리 시 농도 의존적으로 억제되는 양상을 보였으며 500 µg/mL으로 처리 시 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 7).

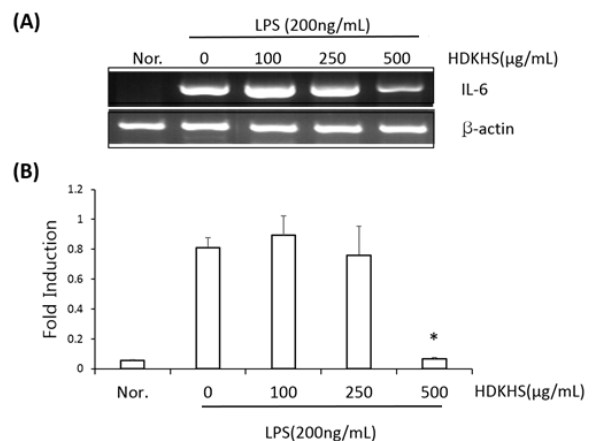


Fig. 7. Effect of HDKHS on the mRNA expression of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with HDKHS as indicated concentrations for 30 minutes, and then incubated with or without LPS (200 ng/mL) for 24 hours. IL-6 mRNA transcription level was assessed by RT-PCR. Date are mean \pm SD values of triplicate determinations from three separate experiment. * P < 0.05, when compared to the LPS treated group.

8. MAPKs의 인산화에 대한 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 억제 효과

MAPKs는 세포의 성장과 분화 및 cytokines과 스트레스 제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 HDKHS의 억제 메커니즘이 MAPKs를 경유하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에 HDKHS를 100, 250, 500 µg/mL을 처리한 경우 ERK 1/2의 인산화를 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 8). 그러나 JNK 1/2와 p38의 인산화에는 영향이 없는 것을 확인할 수 있었다.

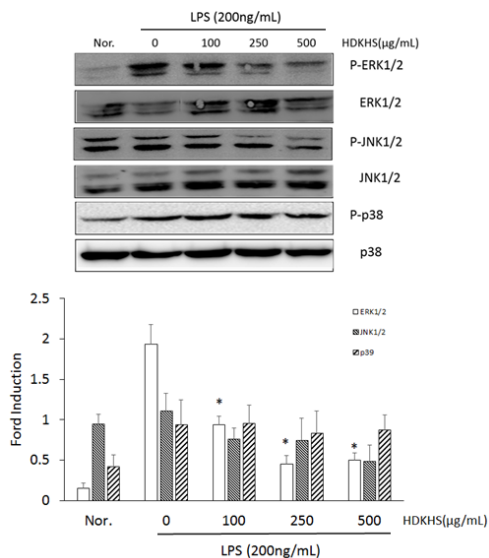


Fig. 8. Effect of HDKHS on the phosphorylation (P-) of MAPKs in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of HDKHS for 30 minutes before being incubated with LPS (200 ng/mL) for 30 minutes. Data are mean \pm SD values of triplicate determinations from three separate experiment. $P < 0.05$, when compared to the LPS treated group.

고찰

解毒金花散은 元代의 丹溪心法 19편 痢에 처음 수록된 처방으로 下痢 膿血毒을 치료하는데 사용되었으며 東醫寶鑑 내 경편에서는 熱毒으로 인한 膿血痢를 치료한다고 되어있다^(6,7). 解毒金花散은 각종 出血, 鬱血에 사용하여 高血壓, 코피, 전체적인 熱感, 옷이 울랐을 때, 紅疫 등과 같은 일체 열독에 사용할 수 있는 黃連解毒湯과 일체 泄瀉에 쓰는 三白湯이 大腸濕熱로 인한 膿血痢를 淸熱시키고 燥濕시켜서 치료하는 것이다. 黃連, 黃芩, 黃柏은 淸熱燥濕藥에 속하고, 白朮은 補氣藥, 赤茯苓은 利水退腫藥, 赤芍藥은 淸熱涼血藥에 속한다. 즉, 黃連, 黃柏, 黃芩, 赤芍藥으로 熱을 꺼주고 濕을 없애며, 白朮과 赤茯苓으로 물길을 바로잡아 濕의 산물인 水腫을 없애주는 것이다.

대식세포는 면역기능을 조절하고 이에 따른 염증반응에 관여하는 생체 방어체계의 주요 요소로서, 외부의 항원과 자극에 의해 활성화되어 성장인자, cytokines, PGE₂와 lipid mediator 및 NO를 다량 분비하여 그 역할을 수행한다⁽¹¹⁾. 그러나 대식

세포가 과도하게 활성화되면 염증매개물질 분비를 증가시켜 염증을 심화시킴으로서 천식, 기관지염, 관절염, 다발성경화증, 동맥경화증, 뇌졸중, 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성뇌질환 및 바이러스 감염으로 인한 염증질환 등을 유발하고, 질환을 악화시키는 데 기여하게 된다^(12,13).

LPS는 대표적인 외부 자극원 중의 하나로 그람음성균의 세포 표면을 구성하는 물질로서 대식세포와 같은 염증성 세포를 활성화시켜 선천 면역뿐만 아니라 적응 면역 등에 관여하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁴⁾. 또한 대식세포에서 염증성 반응을 연구할 때 중요한 자극원으로 사용되는 LPS는 설치류 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포에서 TLR4를 통한 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 신호전달계를 활성화 시키고 IL-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2/ PGE₂ 등과 같은 염증성 매개물의 발현 및 탐식능력을 증가시키는 것으로 알려져 있다⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

NO는 혈관내피세포에서 분비되어 인접 근세포를 자극하여 혈관을 이완시키고 혈류를 조절하는 signaling molecule로서 혈관계에 작용하며, 면역계에 있어서는 염증의 발현과 해소에 관여하는 면역조절자로서 활성화된 대식세포 등 면역세포에 의해 생성되어 외부에서 침입한 미생물이나 내부에서 발생한 종양세포의 사멸에 영향을 주는 immune defence molecule로서 보고되어 있다⁽¹⁹⁾.

하지만 과량이 방출될 경우 NO를 생성하는 세포 자신과 주위의 정상 세포 및 조직, 기관에 손상을 초래하며 병리적 원인에 의해 과도하게 분비된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키고⁽²⁰⁾, 이로 인해 많은 염증성 질환 및 만성적 질환을 유발하여 유해한 작용을 나타 낼 수 있다고 보고되어 있다^(21,22).

PGE₂는 NO와 마찬가지로 손상된 부위나 조직에서 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로서 COX-2에 의해 합성되며, 혈관의 확장과 혈관 벽의 투과성을 높이고 염증부위로 면역세포들이 모이게 할 뿐만 아니라 IL-6와 같은 염증성 cytokines의 분비를 촉진시킨다. PGE₂ 역시 과량 생산되면 과도한 면역반응을 야기하며 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 각종 염증성 질환을 유발시키게 된다. 따라서 염증질환의 치료에 있어서 NO와 PGE₂는 염증과 통증을 효과적으로 완화시키는 주요 표적으로 유효하다고 알려져 있다⁽²³⁾.

IL-6는 처음에 B세포에 성장인자로서 작용하며 immunoglobulin의 생성을 유도하는 인자로서 알려져있고⁽²⁴⁾, 단핵구나 대식세포에서 생성되어 초기의 감염성 염증반응에서 발현되어 주변의 면역세포를 활성화시키며 병원균에 대한 방어체계로서 작용한다⁽²⁵⁾. 또한 T세포에 작용하여 다른 염증성 cytokines들의 분비를 촉진한다. 이처럼 면역반응 전반에 걸쳐 작용하여 방어체계로서의 기능을 나타내지만 과량 분비될 경우 류마티스 관절염과 같은 자가 면역질환의 발현을 유도하는 등의 병리적 작용을 나타낸다⁽²⁶⁾.

MAPKs는 p38, ERK 1/2, JNK 1/2의 3가지 단백질로 구성되어있으며, 세포의 성장 및 분화뿐만 아니라 cytokines의 생성과 같은 염증성 반응에 있어서도 중요한 역할을 수행하는 인산화-매개 기전이다. LPS등의 자극원에 의해 MAPKs가 활성화 되면 단백질의 인산화가 진행되며, 염증성 전사인자들

활성화 시키고 cytokines의 생성을 촉진한다²⁷⁾.

ERK는 MEK와 매개하여 iNOS나 COX와 같은 하위의 염증성 인자의 발현에 직·간접적으로 관여한다. 활성화된 ERK는 염증발현의 주요 기전으로 밝혀진 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 유발하여 염증의 발현을 조절하게 된다. 이전의 연구에서 볼 수 있듯이 cytokines을 비롯한 NO, PGE₂와 같은 염증성 인자들의 분비를 조절하기 위해 그 상위 기전으로서 MAPKs의 활성화를 억제하는 것이 효과적임이 알려져 있다²⁸⁾.

이번 연구는 전통적으로 감염성질환에 사용되어온 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)을 이용하여 쥐에서 분리한 대식세포를 LPS로 자극하여 만든 염증모델에 대한 HDKHS의 항염증 효과를 실험적으로 입증하고 그 기전을 확인하기 위해 진행되었으며, 실험 결과 LPS로 자극한 대식세포를 이용한 염증모델에서 NO, PGE₂, iNOS, COX-2, IL-6와 같은 염증성 인자와 관련 전사인자의 발현을 억제하였음을 확인하였고, LPS 자극에 의해 급격히 인산화 되었던 ERK 1/2가 HDKHS 전 처리를 통해 억제되는 것은 HDKHS의 항염증 활성 주요기전이 MAPK의 활성화를 억제함으로써 나타나는 것임을 알 수 있다.

결론

설치류의 대식세포주인 RAW 264,7 세포를 LPS로 자극하였을 때 HDKHS의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HDKHS는 대식세포에서 LPS 자극에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 발현을 억제한다.
2. 이를 통해 하위 염증성 인자인 NO, PGE₂, IL-6의 분비를 억제한다.
3. 또한 병원균에 의한 자극을 핵 내로 전달하는 MAPKs의 발현을 억제하는 것이 HDKHS의 항염증활성의 주요기전으로 생각된다.

이러한 결과로 미루어 보아 解毒金花散 물 추출물 (HDKHS)의 염증 치료효과가 실험적으로 유효함을 확인하였고 그 기전을 입증하였다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2013R1A1A2064673)), by the Korea government (MSIP)(2008-0062484).

References

1. Wang HT, Fang YQ, You P, Bao XC, Yuan HR, Ma

- J, Wang FF, Li KC. Expression changes of inflammatory factors in the rat lung of decompression sickness induced by fast buoyancy ascent escape. *Undersea Hyperb Med*, 2015 ; 42(1) : 15-22.
2. Lomba KS, de Souza Breves Beiler TF, Sete MR, Pires FR, da Silva Figueredo CM. Use of minimally invasive gingival biopsies in the study of inflammatory mediators expression and their correlation with gingival fluid in patients with chronic periodontitis. *Indian J Dent Res*. 2015 ; 26(2) : 126-30.
3. Bae BC. Commentary on Nei-Jing. Seoul : Sungbosa, 200, 725-8.
4. Donguihak Dictionary Compilation Committee. *New donguihak Dictionary*. seoul : Yeo Gangchulpansa, 2003 : 218.
5. Mum RM. Documentary Consideration about Stress. *J Orient Neuropsychiatry*. 1991 ; 2(1) : 38-50.
6. Ju JH. *Shinpyeon Dangyesimbeopbuyeo(sang)*. seoul : Dae Seong munhwasa. 1993 : 255.
7. Heo J. *Donguibogam*, 9th ed. Seoul : Namsandang, 2009 : 188.
8. Heo J. *Donguibogam*, 9th ed. Seoul : Namsandang, 2009 : 396.
9. Heo J. *Donguibogam*, 9th ed. Seoul : Namsandang, 2009 : 182.
10. Lee HI, Lee SK, Kwon YM, Song YS. Antibacterial effect of Haedokgeumhwa-san against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Orient Rehabilitation Med*. 2015 ; 25(2) : 1-13.
11. McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity*. 2014 ; 41(1) : 36-48.
12. Predonzani A, Cali B, Agnellini AH, Molon B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. *World J Exp Med*. 2015 ; 5(2) : 64-76.
13. Lee JK. Analgesic and anti-inflammatory effect of *Scutellaria baicalensis*. Kyung Won University, 2008.
14. Puddu P, Latorre D, Valenti P, Gessani S. Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals*. 2010 ; 23(3) : 387-97.
15. Fang H, Pengal RA, Cao X, Ganesan LP, Wewers MD, Marsh CB, Tridandapani S. Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J Immunol* 2004 ; 173 : 360-6.
16. Jang SI, Kim BH, Lee WY, An SJ, Choi HG, Jeon BH, Chung HT, Rho JR, Kim YJ, Chai KY. Stylopine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264,7 cells. *Arch Pharm Res*. 2004 ; 27(9) : 923-9.
17. Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, Seo EK, Lee KT. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin

- through the NF- κ B inactivation in RAW 264,7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull* 2007 ; 30(12) : 2345-51.
18. Aalaei-andabili SH, Rezaei N. Toll like receptor (TLR)-induced differential expression of microRNAs (MiRs) promotes proper immune response against infections: a systematic review. *J Infect*, 2013 ; 67(4) : 251-64.
 19. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, 2015 ; 5(2) : 472-84.
 20. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res*, 2003 ; 17(5) : 485-9.
 21. Radulovic M, Bauman WA, Wecht JM, LaFountaine M, Kahn N, Hobson J, Singh K, Renzi C, Yen C, Schilero GJ. Biomarkers of inflammation in persons with chronic tetraplegia. *J Breath Res*, 2015 ; 9(3) : 036001.
 22. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*, 2010 ; 88(6) : 1157-62.
 23. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer letters*, 2004 ; 203 : 127-37.
 24. Ishikura H, Nakamura Y, Kawano Y, Tanaka J, Mizunuma M, Ohta D, Nishida T, Murai A. Intravenous immunoglobulin improves sepsis-induced coagulopathy: A retrospective, single-center observational study. *J Crit Care*, 2015 ; 30(3) : 579-83.
 25. van de Vyver M, Engelbrecht L, Smith C, Myburgh KH. Neutrophil and monocyte responses to downhill running: Intracellular contents of MPO, IL-6, IL-10, pstat3, and SOCS3. *Scand J Med Sci Sports*, 2015 ; doi: 10.1111/sms.12497.
 26. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest*, 2011 ; 121(9) : 3375-83.
 27. Han JM, Jin YY, Kim HY, Park KH, Lee WS, Jeong TS. Lavandulyl flavonoids from *Sophora flavescens* suppress lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinases in RAW264,7 cells. *Biol Pharm Bull*, 2010 ; 33(6) : 1019-23.
 28. Su YW, Chiou WF, Chao SH, Lee MH, Chen CC, Tsai YC. Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264,7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Int Immunopharmacol*, 2011 ; 11(9) : 1166-72.