

# 烏梅丸 물추출물의 항염증 활성화에 관한 연구

김영환 · 송애진<sup>1</sup> · 성선희<sup>1</sup> · 권동렬<sup>2</sup> · 정명수<sup>1,3\*</sup>

서화건강공학연구소, 1: 원광대학교 한의과대학 예방의학교실, 2: 원광대학교 약학대학 한약학과, 3: 원광대학교 한국전통의학연구소

## Study of Anti-inflammatory Effect of *Ohmae-hwan* Water Extract

Young-Hwan Kim, Aejin Song<sup>1</sup>, Sun Heui Sung<sup>1</sup>, Dong Yeul Kwon<sup>2</sup>, Myongsoo Chong<sup>1,3\*</sup>

*Sehwa Health Engineering Research Institute, 1: Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, 2: Department of Korean Pharmacy, College of Pharmacy, 3: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University*

*Ohmae-hwan* has been used to treat the symptoms of loose stools mixed with blood accompanied by abdominal pain due to heat dysentery in Korean medicine. However, its mechanism of action on inflammatory disease using macrophages was not known. The author was to find out about the influence of *Ohmae-hwan* water extract on expressions of NO, cytokine IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW 264.7 cell, on expressions of mRNA of iNOS, IL-6 and COX-2 and on suppression of expressions of protein of iNOS and COX-2, and was to find out about the mechanism. As a result of the study, it was found that *Ohmae-hwan* suppressed generation of NO activated by LPS depending on its concentrations, suppressed expressions of cytokine IL-6, and TNF- $\alpha$  and suppressed expressions of mRNA of iNOS, IL-6, and COX-2 and suppressed expressions of protein of iNOS, COX-2. Considering the above results, it can be known that *Ohmae-hwan* water extract has anti-inflammatory effect against inflammatory response mediated by macrophages by suppressing generation of NO, TNF- $\alpha$ , and IL-6 and expressions of iNOS, COX-2 as it acts on macrophages.

keywords : *Ohmae-hwan*, Anti-inflammatory Effect, RAW 264.7 cell

### 서 론

烏梅丸은 《東醫寶鑑》에 黃連, 烏梅肉, 當歸, 枳殼으로 구성되어 있으며, 熱痢로 배가 아프면서 설사로 피가 나오는 것을 치료한다(治熱痢腹痛下純血)고 하였다<sup>1)</sup>. 熱痢란 腸胃에 열이 쌓여 발생하는 질병으로, 脈이 滑數有力하고 裏急後重하며, 煩渴로 물을 마시고 찬 것을 좋아하며, 소변이 뜨겁고 붉은 색을 띠고, 身熱, 腹痛, 舌苔黃膩 등의 증상을 수반한다<sup>2)</sup>.

炎症반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 炎症을 유발한다<sup>3)</sup>.

현재 임상에서는 염증으로 발생하는 질환을 치료하기 위해 증상을 호전시키고, 과도한 염증반응에 의한 조직 손상을 최소화하기 위하여 항염제 사용을 필요로 한다. 현재 사용되어지고 있는 강력한 항염제 중 하나인 스테로이드제는 신속한 염증 억제를 기대할 수 있으나, 감염, 골다공증, 혈압상승, 쿠싱 증후군 등의 심각한 부

작용으로 인해 장기적인 사용은 바람직하지 않다. 이처럼 최근 사용되어지는 의약품 중에서는 여러 가지 부작용이나 독성 및 내성이 심각해 문제가 제기될 수 있어 천연물로부터 의약품 개발에 관한 연구가 활발히 추진되고 있는 실정이다<sup>4)</sup>.

이에 우리는 장기복용에 의한 부작용이 적고, 효과적인 치료효과를 기대할 수 있는 새로운 항염증 물질을 찾는데 주력하였고, 그 중 예로부터 쓰이고 있는 한약처방에 초점을 두어 연구를 진행하였다. 한약처방을 이용하여 항염증에 관한 연구를 진행한 여러 논문이 보고된 바 있으나<sup>5-10)</sup>, 烏梅丸에 관한 연구는 없었다. 이에 저자는 한의학에서 염증성 질환인 이질치료에 烏梅丸이 사용되어지는 것을 볼 때, 항염증효과가 있을 것으로 사료되어 LPS로 유도한 설치류 대식세포인 RAW 264.7 cell에 烏梅丸 물추출물의 농도에 따른 염증성 인자들의 발현량을 조사하고 이를 통하여 烏梅丸이 NO 생성에 미치는 영향, 염증 관련 Cytokine IL-6의 발현, Cytokine TNF- $\alpha$ 의 발현, iNOS의 mRNA 발현, IL-6의 mRNA 발현, COX-2의 mRNA 발현, iNOS의 protein 발현, 및 COX-2의 protein 발현에 미치는 영향을 밝힘으로써 새로운 항염증제로서의 가능성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

\* Corresponding author

Myongsoo Chong, Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : neurokid@wku.ac.kr · Tel : +82-63-850-6912

Received : 2016/07/15 · Revised : 2016/08/24 · Accepted : 2016/08/24

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.08.30.4.266>

Available online at <http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm>

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

LPS (*E. coli* lipopolysaccharide), RPMI-1640 배지는 Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, FBS (Fetal bovine serum, ) 및 항생제는 Gibco BRL (USA)로부터 구입하였다. 조직배양 플레이트와 직경 100 mm 페트리접시는 Nunc Inc. (Naperville, USA)로부터 구입하여 사용하였다. TNF- $\alpha$ , IL-6은 효소결합면역측정 (ELISA) 키트를 R&D Systemsinc. (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였으며, COX-2, iNOS, MAPKs (ERK) 단일세포 항체 및 peroxidase conjugated된 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, USA)에서 구입하였다.

#### 2) 약재

烏梅丸은 《동의보감》처방 구성에 의거하여 휴먼허브(Daegu, Korea)에서 유통하는 황련(黃連), 오매육(烏梅肉), 당귀(當歸), 지각(枳殼)은 대한한약국 (Iksan, Korea)에서 구입하였다(Table 1).

Table 1. The composition of *Ohmae-hwan*

藥物	生藥名	用量
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	6g
烏梅肉	<i>Mume Fructus Praeparatum</i>	4g
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4g
枳殼	<i>Aurantii Fructus Pericarpium</i>	4g

#### 3) Primer 준비

RT-PCR을 위해 여러 개의 primer를 사용하였다. Primer의 구성은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Primer sequences for RT-PCR

	cDNA	Primer sequence
iNOS	forward	5'-AGCCCAACAATACAATGACCCTA-3'
	reverse	5'-TTCCTGTTGTTTCTATTTCCCTTGT-3'
COX-2	forward	5'-CACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'
	reverse	5'-GATTAGTACTGTAGGGTAAATG-3'
IL-6	forward	5'-CATGTTCTCTGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACTAGGTTTCCGAGTA-3'
$\beta$ -actin	forward	5'-ATGAAGATCCTGACCGAGCGT-3'
	reverse	5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

### 2. 방법

#### 1) 시료의 조제방법

烏梅丸 물추출물은 烏梅丸(18g)을 distilled water (D.W.)를 용매로 하여 2시간 2회 열수 추출하였다. 추출액을 0.45  $\mu$ m 필터로 여과한 후에 감압농축 하여 동결건조를 시켰으며, 5.1 g (28.3%)이 얻어져 4°C에 보관하였다. 실험에 쓰인 추출물은 PBS (phosphate buffered saline)에 녹여 사용하였다.

#### 2) 세포배양

설치류 대식 세포주 (murine macrophage cell line, RAW 264.7)는 한국 세포주 은행으로부터 구입하여 사용하였다 (Korea

Research Institute of Bioscience and Biotechnology American Tissue Culture Collection). RAW 264.7 세포는 항생제 및 항균제(100 U/mL의 penicillin G, 100 U/mL의 streptomycin)를 첨가하고 10%의 열처리 우태아 혈청 (heat inactivated FBS)을 첨가한 완전한 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>의 습한 대기, 37°C의 온도조건으로 배양하였다.

#### 3) 세포생존력 측정

세포 생존력은 MTS assay를 이용하였다. 烏梅丸을 처리한 세포에 20  $\mu$ L의 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, 5 mg/mL) 용해액을 첨가한 후 37°C에서 1시간 보존한 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) NO 생성량 측정

烏梅丸(50, 100, 250, 500  $\mu$ g/mL)의 농도로 전처리하고 여기에 LPS (200 ng/mL)를 각각 주입한 다음 RAW 264.7 세포를 24 시간 배양하였다. 그 상층액에 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. 아질산의 농도는 570 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 세포가 없는 배양액은 아질산이 0-70  $\mu$ M로 나타나, 이 값을 표준으로 하여 여러 실험군 흡광도 값을 통해 아질산 값을 계산하였다.

#### 5) Cytokine 정량

먼저 RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 烏梅丸 (50, 100, 250, 500  $\mu$ g/mL)를 1시간 동안 처리한 후, 그람-음성 박테리아 내독소인 LPS (200 ng/mL)로 RAW 264.7 세포를 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 TNF- $\alpha$ , IL-6을 ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법에 의하여 정량해 분석하였다.

#### 6) RNA 분리 및 RT-PCR

烏梅丸에 의한 염증인자 NO의 억제와 iNOS 및 COX-2의 mRNA발현과의 상관성을 알아보기 위하여 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 조사하였다. RNA 및 RT-PCR RNA 세포의 준비는 100 mm 세포배양 접시에 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL 세포로 분주한 다음, 하루 밤 동안 안정화 시켰다. 이 세포에 烏梅丸을 처리한 후, LPS로 처리하고 24시간 후에 세포를 모아 PBS로 세척하여 easy blue(Intron co.) 1 mL를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200  $\mu$ L를 넣고 다시 교반하여 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액 400  $\mu$ L에 이소프로판올을 가하여 다시 원심 분리하여 RNA 펠렛을 얻었다. 여기서 얻어진 RNA에 MuLV reverse transcriptase, 1 mM dNTP 0.5  $\mu$ g을 넣어 cDNA를 만들었다. 여기에 iNOS, IL-6, COX-2,  $\beta$ -actin primer를 넣고 thermal cycler를 이용하여 증폭시켰다. 이때 iNOS는 94°C에서 45초, 60°C에서 45초, 70°C에서 1분 동안 27 cycle로 반응시켰고, IL-6는 94°C에서 45초, 60°C에서 45초, 70°C에서 1분 동안 27

cycle로 반응시켰고, COX-2는 94°C에서 30초, 57°C에서 45초, 72°C에서 30초 동안 36 cycle로 반응시켰고,  $\beta$ -actin은 94°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 30 cycle로 반응시켰다. 만들어진 RNA를 2% 아가로스 겔에 전기 영동시켜 UV 검출기로 확인하였다.

#### 7) Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 수집하여 2-3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20-30  $\mu$ g의 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 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1:1000) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2 (1:1000) (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 반응 후 ImageQuant LAS 4000 Mini Biomolecular Imager (GE Healthcare)를 통해 확인하였다.

#### 8) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 실시하였으며, 실험결과는 Student's t-test 분석법을 이용하여 각 항목에 따라 평균치 $\pm$ 표준오차(S.E.M)를 구하여 신뢰수준 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ 에서 통계적 유의성을 검증하였다.

## 결 과

#### 1. 烏梅丸이 세포독성에 미치는 영향

烏梅丸이 세포독성에 영향을 주는지에 대하여 알아보기 위해 MTS 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 烏梅丸을 50, 100, 250, 500  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 때 측정한 결과 烏梅丸 50, 100, 250, 500  $\mu$ g/mL 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

#### 2. 烏梅丸이 NO 생성에 미치는 영향

NO 생성에 대한 烏梅丸의 효과를 알아보기 위해 Griess assay 방법을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>-의 형태로 측정하였다. 烏梅丸을 50, 100, 250, 500  $\mu$ g/mL 처리하였을 때 NO생성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 관찰하였다. 특히 烏

梅丸 250, 500  $\mu$ g/mL로 처리한 경우, NO 생성이 정상세포와 유사한 양상을 보였다(Fig. 2).

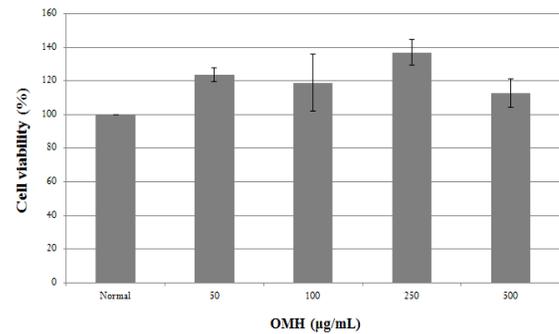


Fig. 1. Effect of *Ohmae-hwan* on cell viability in RAW 264.7 cells. Cell viability was evaluated with the MTS assay. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. of duplicate determinations from three separate experiments.

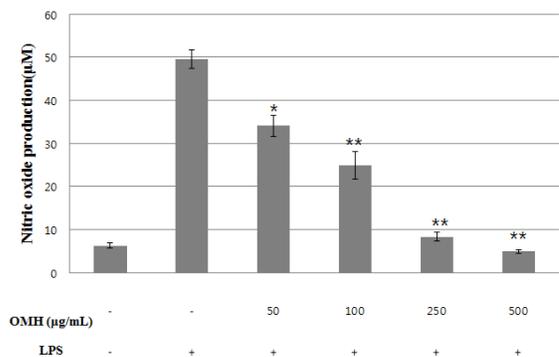


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by *Ohmae-hwan*. The cells were treated with *Ohmae-hwan* at indicated concentration for 1 h, and then stimulated with 200 ng/mL LPS for 24 h. NO release was measured by the method of Griess assay. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Statistical significance: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

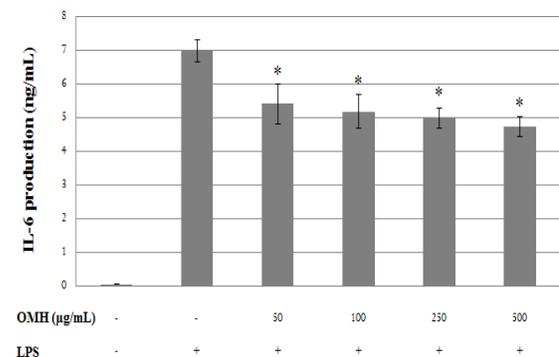


Fig. 3. Effect of *Ohmae-hwan* on the productions of IL-6 in RAW264.7 cells stimulated with LPS. The cells were treated with *Ohmae-hwan* at indicated concentrations for 1h, and then incubated with 200 ng/mL LPS for 18 h as described in materials and methods. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Statistical significance: \* $P < 0.05$ , when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

3. 烏梅丸이 염증 관련 Cytokine IL-6의 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때, 정상세포에 비하여 IL-6의 생성량이 급격히 증가하였다. 烏梅丸을 50, 100, 250, 500 µg/mL 처리한 후에는 IL-6의 생성량이 LPS를 처리한 세포보다 감소하는 양상을 확인하였다(Fig. 3).

4. 烏梅丸이 염증 관련 Cytokine TNF-α의 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때, 정상세포에 비하여 TNF-α의 생성량이 급격히 증가하였다. 하지만, 烏梅丸을 50, 100, 250, 500 µg/mL 처리하였을 때 TNF-α의 생성량이 LPS를 처리한 세포보다 농도 의존적으로 감소하는 양상을 확인하였다(Fig. 4).

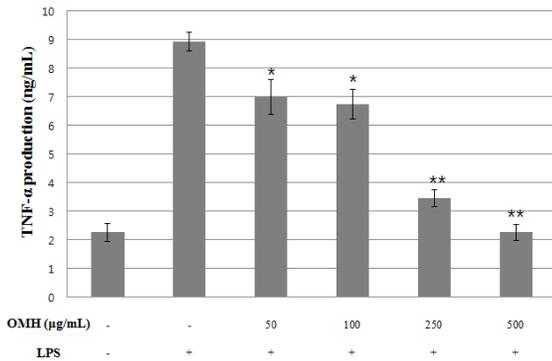


Fig. 4. Effect of *Ohmae-hwan* on the productions TNF-α of in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. The cells were treated with *Ohmae-hwan* at indicated concentrations for 1h, and then incubated with 200 ng/mL LPS for 18 h as described in materials and methods. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Statistical significance: \*P<0.05, \*\*P<0.005, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

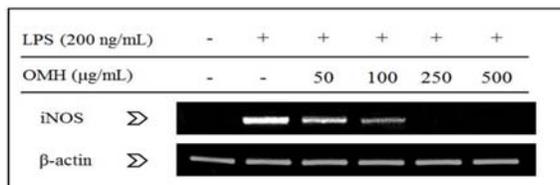
5. 烏梅丸이 iNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향

烏梅丸의 iNOS의 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 iNOS의 mRNA 발현은 烏梅丸을 50, 100, 250, 500 µg/mL 처리하였을 때 억제되는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

6. 烏梅丸이 IL-6의 mRNA 발현에 미치는 영향

烏梅丸이 IL-6의 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과, LPS 처리에 의해 증가된 IL-6의 mRNA 발현은 烏梅丸을 50, 100, 250, 500 µg/mL 처리하였을 때 약간 감소하는 양상을 보였으며, 특히 烏梅丸250, 500 µg/ml 에서 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

A



B

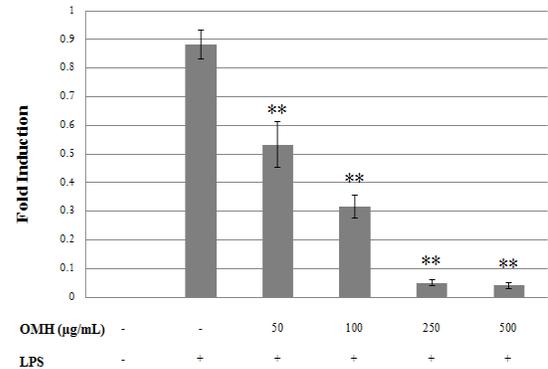


Fig. 5. Effect of *Ohmae-hwan* on the mRNA expression of iNOS in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with *Ohmae-hwan* as indicated concentrations for 1h, and then incubated with or without LPS (200 ng/ml) for 24h. The mRNA transcription of iNOS level was assessed by RT-PCR. representative RT-PCR data of at least three separate experiments are shown. \*\*P<0.005, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

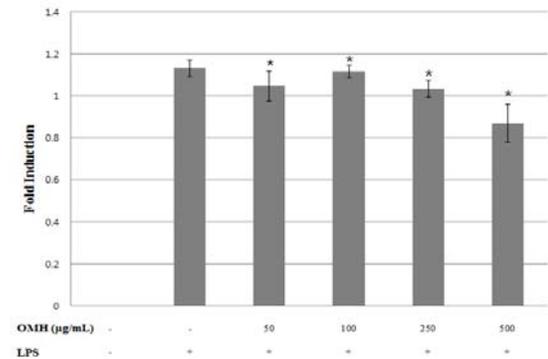


Fig. 6. Effect of *Ohmae-hwan* on the mRNA expression of IL-6 in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with *Ohmae-hwan* as indicated concentrations for 1h, and then incubated with or without LPS (200 ng/ml) for 24h. The mRNA transcription of IL-6 level was assessed by RT-PCR. Representative RT-PCR data of at least three separate experiments are shown. \*P<0.05, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

7. 烏梅丸이 COX-2의 mRNA 발현에 미치는 영향

烏梅丸의 COX-2의 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과, LPS 처리에 의해 증가되어진 COX-2의 mRNA 발현은 烏梅丸을 50, 100, 250, 500 µg/mL 처리 시에 억제되는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

8. 烏梅丸이 iNOS의 protein 발현에 미치는 영향

烏梅丸의 iNOS의 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 Western blotting을 수행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의하여 증가되어진 iNOS의 발현은 烏梅丸을 50, 100, 250, 500 µg/mL 처리 시에 농도 의존적으로 억제되는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

9. 烏梅丸이 COX-2의 protein 발현에 미치는 영향

烏梅丸의 COX-2의 발현에 미치는 영향을 보기 위하여

Western blotting을 시행하였다. 그 결과, LPS 처리에 의하여 증가된 COX-2의 발현은 烏梅丸을 50, 100, 250, 500 µg/mL 처리 시에 감소양상을 나타냈으며, 특히 烏梅丸 500 µg/ml 급격히 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

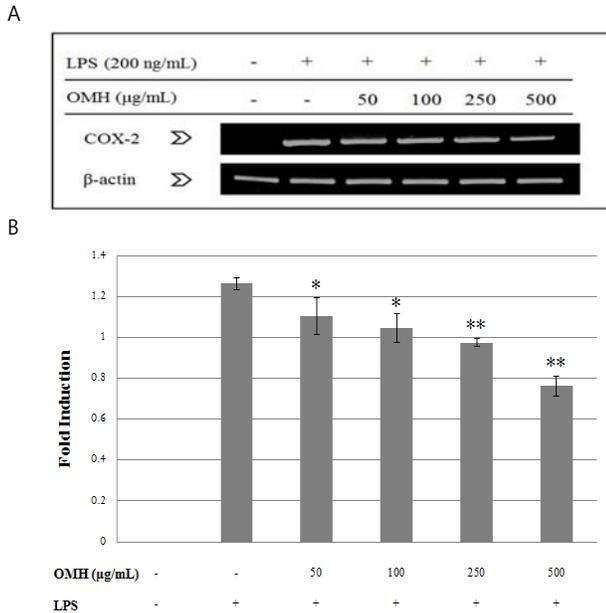


Fig. 7. Effect of *Ohmae-hwan* on the mRNA expression of COX-2 in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with *Ohmae-hwan* as indicated concentrations for 1h, and then incubated with or without LPS (200 ng/ml) for 24h. The mRNA transcription of COX-2 level was assessed by RT-PCR. Representative RT-PCR data of at least three separate experiments are shown. \*P<0.05, \*\*P<0.005, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

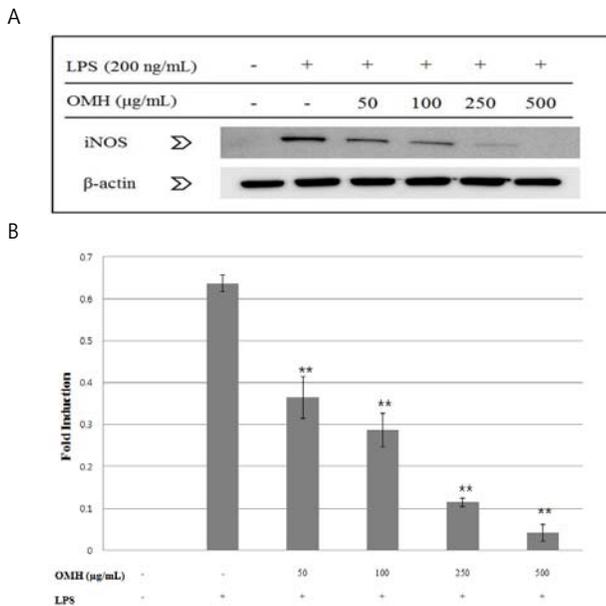


Fig. 8. Effect of *Ohmae-hwan* on protein expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cell were pretreated with *Ohmae-hwan* for 1h, and then incubated with LPS (200 ng/ml) for 24h. Detail methods were described in Materials and Methods. Representative

Western blots of at least three separate experiments are shown. \*\*P<0.005, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

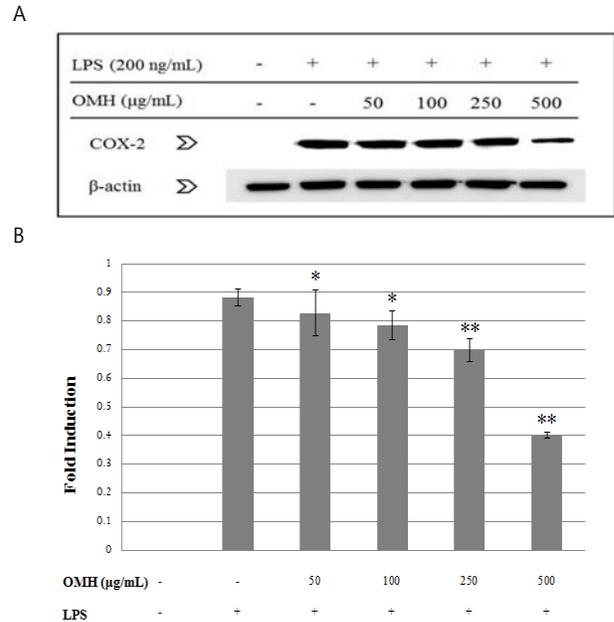


Fig. 9. Effect of *Ohmae-hwan* on protein expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cell were pretreated with *Ohmae-hwan* for 1h, and then incubated with LPS (200 ng/ml) for 24h. Detail methods were described in Materials and Methods. Representative Western blots of at least three separate experiments are shown. \*P<0.05, \*\*P<0.005, when compared to the LPS treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test.

## 고찰

炎症반응은 면역세포의 활성화에 의해서 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균이나 바이러스 등의 미생물 및 생체내의 이물질 등을 인식하면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발한다<sup>11)</sup>.

염증반응은 계통 발생론적으로 가장 오래된 방어기전으로 cytokines, NO, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 염증반응에서 TNF-α, IL-6의 분비 등은 염증을 개시하고 유지시키기 위한 중요한 요소이며 이들의 분비량과 활성화에 대한 조절은 항염증 효과를 파악하는 기준이 된다<sup>12)</sup>.

따라서 cytokines 분비와 NO 생성 저해제는 septic shock, 다발성 경화증, 류마티스 관절염과 같은 각종 염증성 질환의 염증반응 조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>5-10)</sup>.

烏梅丸은 金元四大家의 한 사람인 주진형의 《丹溪心法》에 소개된 처방으로 黃連, 烏梅肉, 當歸, 枳殼으로 구성되어 있으며<sup>1)</sup>, 熱痢를 치료하는 방제로 사용되었다. 한의학적으로 熱痢란 腸胃에 열이 쌓여 발생하는 痢疾로서 脈이 滑數有力하고 裏急後重하며, 煩渴로 물을 마시고 찬 것을 좋아하고 뜨거운 것을 싫어하며 소변

이 뜨겁고 붉은 색을 띠며 마치 물고기의 뇌처럼 끈적거리면서 더러운 적색의 下痢을 하는 것으로 항상 身熱, 腹痛, 舌苔黃膩 등의 증상이 수반되며, 清熱解毒, 消蕩積滯하여 치료해야 하며, 세균성 이질, 궤양성 결장염 등에서 나타난다고 하였다<sup>2)</sup>.

烏梅丸에 대한 국내의 직접적인 실험적 연구는 미미하나 그 구성약재인 黃連, 烏梅, 當歸, 枳殼에 대한 실험적 연구는 많이 이루어져 있다. 黃連의 주요 성분은 berberine, coptisine, worenine, palmatine 등<sup>13)</sup>이며, 실험적 연구로는 *Helicobacter pylori*에 대한 항균 효과<sup>14)</sup>, 항산화 효과<sup>15)</sup> 등이 있으며, 특히 해독의 효능이 부각되어 최근 이를 바탕으로 황련의 항염증효과에 대한 연구가 지속적으로 보고되고 있다<sup>16)</sup>. 烏梅는 citric acid, malic acid, 호박산, 탄수화물, sitosterol, oleic acid 등의 성분을 함유하고 있으며, 실험적 연구로는 항균작용, 항진균작용<sup>14)</sup>, 염증성 장질환에서의 효과<sup>17)</sup>, 항염증 및 항알러지 효과<sup>18)</sup> 등이 연구되어 보고된 바 있다. 當歸는 정유와 sucrose, vitamin B12, Vitamin A 류 물질 등을 함유하고 있으며, 자궁에 대한 작용, 물질대사 및 내분비에 대한 영향, 순환계통에 대한 영향, 항균작용 등의 약리효과가 있는 것으로 보고되고 있으며<sup>13)</sup>, 실험적 연구 결과로는 當歸의 약리 작용으로는 항산화<sup>19)</sup>, 항암<sup>20)</sup>, 항염증<sup>21)</sup> 등이 있는 것으로 알려져 있으며, 枳殼은 정유와 플라보노이드 배당체 등을 함유하고 있으며<sup>13)</sup>, 항산화 및 항염증효과에 관한 연구<sup>22)</sup>, 알레르기 반응에 대한 효과<sup>23)</sup> 등이 보고되고 있다. 이와 같이 단일 한약재가 나타내는 항염증효과를 감안할 때, 혼합처방인 烏梅丸이 염증에 대해 억제활성을 가진다는 사실을 유추할 수 있다.

본 연구에서는 烏梅丸 물추출물이 LPS로 자극된 설치류 대식세포주 RAW 264.7 세포에서 염증 매개물질의 생성과 발현의 억제를 실험하였다.

그 결과 烏梅丸 추출물은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 IL-6와 TNF- $\alpha$  발현이 현저하게 줄어들었으며, 용량 의존적으로 억제되는 양상을 보였다. 이는 염증 매개물질인 IL-6와 TNF- $\alpha$  발현 억제를 통하여 항염 효능을 시사한다고 볼 수 있다.

이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다<sup>25)</sup>. 일반적으로 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다<sup>26-28)</sup>.

RAW 264.7 세포에서 烏梅丸의 NO 생성 저해정도를 관찰한 결과 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성이 농도 의존적으로 크게 억제되었다.

NO를 생성하게 하는 iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다<sup>28,29)</sup>.

이에 따라 iNOS의 mRNA와 protein의 발현을 알아보기 위하여 Western blot을 수행한 결과 LPS 처리에 의해 형성되는 iNOS mRNA와 protein 발현은 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 이는 염증매개물질인 iNOS의 발현을 억제하여 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 억제하고 생합성을 억제하여 염증을 치료한다고 할 수 있다.

COX는 중요한 생물학상 매개체인 prostaglandins, prostacyclin, thromboxanes 등을 포함하는 prostanoids 형성에 관여하는 효소이다. COX에는 COX-1과 COX-2가 존재하는데 COX-1은 항상성을 조절하기 위한 prostaglandin 합성에 관여하고 COX-2는 염증반응 부위에서 활성화된 대식세포에 의해 염증반응을 매개하는 prostaglandin 합성에 관여한다<sup>30,31)</sup>. 본 연구에서는 LPS로 처리된 RAW 264.7 세포에서 烏梅丸은 COX-2의 mRNA와 protein의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 양상을 관찰하였다. 이는 염증관련 매개물질 합성을 억제하여 항염증효능을 가짐을 시사하고 있다.

결론적으로 烏梅丸 물추출물은 세포내의 전염증성 인자들을 현저하게 억제하는 효과가 있어 烏梅丸의 항염증효과를 확인할 수 있었다. 이에 烏梅丸은 만성 염증질환의 치료에도 응용할 수 있는 우수한 후보 물질임을 알 수 있으며, 이에 대한 심도 깊은 연구가 필요하리라 생각된다.

## 결론

烏梅丸의 효능을 알아보기 위하여 LPS로 유도된 대식세포에서 항염증효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

烏梅丸 물추출물은 LPS로 유도된 대식세포에서 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.

烏梅丸 물추출물은 LPS로 유도된 대식세포에서 cytokine IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하였다.

烏梅丸 물추출물은 LPS로 유도된 대식세포에서 iNOS, IL-6, COX-2의 mRNA 발현을 억제하였다.

烏梅丸 물추출물은 LPS로 유도된 대식세포에서 iNOS, COX-2의 protein 발현을 억제하였다.

이와 같은 결과로 보아 烏梅丸 물추출물은 대식세포에 작용하여 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6의 생성과 iNOS, COX-2 발현을 억제함으로써 대식세포를 매개로 한 염증반응에 항염증효과가 있음을 알 수 있다.

## References

1. Heo, J., Committee for Korean Translation of Dongeuijogam. Daeyeok Dongeuijogam. Seou. Bubin Books. pp 454-455, 2002.
2. Institute of Traditional Medicine. The Encyclopedia of Oriental Medicine. Seoul. Seongbosa Publisher. p 1520, 2000.
3. Tizard, I.R. Immunology, An introduction inflammation.

- 2nd ed., Saunders College Publishing, New York, NY, USA, pp 423-441, 1986.
4. Jo, I.J., Choi, M.O., Park, M.C., Song, H.J., Park, S.J. Anti-Inflammatory Effect of Aqueous Extract of *Scolopendrea* Corpus in RAW 264.7 Cells. *Kor J Herbology*. 26(3):23-29, 2011.
  5. Seo, Y.H., Kang, O.H., Kwon, D.Y., Lee, J.S., Han, J.H., Lee, K.N., Chong, M.S. Study on the Anti-inflammatory Effect of *Jakyak-tang* Water Extract. *KJOMPP*. 25(3):503-509, 2011.
  6. Kim, J.H., Lee, J.S., Kang, O.H., Kwon, D.Y., Lee, K.N., Chong, M.S. Study on the Anti-inflammatory Effect of *Yeonguemjiri-tang* Water Extract. *KJOMPP*. 25(6):1032-1038, 2011.
  7. Ko, H.J. Anti-inflammatory Effect of *Yanggyeok-san* in RAW 264.7 Cells. Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University. 2012.
  8. Park, J.H., Kwon, D.Y., Lee, S.K. Effects of *Hoesaeng-san* Ethanol Extract on the Human Mast cell-mediated Inflammatory Responses. *KJOMPP*. 28(1):45-52, 2014.
  9. Park, W.B. The Study of Anti-inflammatory Effect of *Jakyakbaekpihwan* Water Extract. Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University. 2013.
  10. Ahn, H.K. Anti-inflammatory Effect of *Yuksin-hwan* Ethanol Extract in RAW 264.7 Cells. Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University. 2014.
  11. Park, S.J., Song, H.J. Anti-inflammatory effect of extract of *Pulsatilla koreana* NAKAI in LPS-stimulated Murine peritoneal macrophage. *Kor J Herbology* 22(1):111-117, 2007.
  12. Lim, J.H. Anti-inflammatory effects of the *Gamroem* in vivo and in vitro. Graduate school of Daegu Haany University. 2008.
  13. Kim, C.M., Shin, M.K., An, D.G., et. al. The Encyclopedia of Oriental Herbal Medicine, Seoul, Jeongdam Books. pp 887-895, 3053-3057, 3922-3926, 5024-5042, 1997.
  14. Shin, J.I., Seo, U.K. Antibacterial effects of *Corptis japonica* against *Helicobacter pylori*. *J Kor Orient Internal Med*. 2003; 24(2):269-282, 2003.
  15. Choi, J.L. Prevention of ROS production and MMP dissipation by *Coptidis Rhizoma* in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Graduate School of Dongguk University. 2005.
  16. Kim, H.K. The anti-inflammatory effects of *Huang-Lyun*(*Coptidis Rhizoma*, CR) on injured tissue after burn elicitation. Graduate School of Dongguk University. 2009.
  17. Kim, E.S., Shin, M.K., Kim, T.R., Shin, M.H., Lee, Y.S. Effect of *Ohmaehwan* and *Mume Fructus* on DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease in Mice Model System. *J Kor Orient Internal Med*. 36(3):284-296, 2015.
  18. Seo, C.S., Ha, H.K., Lee, H.Y., Lee, J.K., Jung, D.Y., Lee, J.A., Shin, H.K. Simultaneous Analysis and Anti-allergic Effect of *Mume Fructus*. *Kor. J. Pharmacogn*. 43(4):279-285, 2012.
  19. Kang, S.A., Han, J.A., Jang, K.H., Choue, R.W. DPPH radicalscavenger activity and antioxidant effects of *Cham-Dang-Gui* (*Angelica gigas*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33: 1112-1118, 2004.
  20. Park, K.W., Choi, S.R., Shon, M.Y., Jeong, I.Y., Kang, K.S., Lee, S.T., Shim, K.H., Seo, K.I. Cytotoxic effects of *decursin* from *Angelica gigas* Nakai in human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1385-1390, 2007.
  21. Shin, S., Jeon, J.H., Park, D., Jang, J.Y., Joo, S.S., Hwang, B.Y., Choe, S.Y., Kim, Y.B. Anti-inflammatory effects of and ethanol extract of *Angelica gigas* in a carrageenan-air pouch inflammation model. *Exp Anim* 58: 431-436, 2009.
  22. Kim, S.J., Park, S.K. Antioxidative and anti-inflammatory effects of *Aurantii Fructus Immaturus* Pharmacopuncture. *Kor J Acupuncture*. 27(1):13-16, 2010.
  23. Aeom, Y.D., Kim, D.H., Jeong, J.G., Shin, M.K., Song, H.J. The Comparative Study of *Fructus Immaturus* *Ponciri* and *Fructus Ponciri* Effect on Allergic Reaction. *J Kor Oriental Med*. 22(4):10-21, 2001.
  24. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *P Soc Exp Biol Med*. 211: 24-32, 1996.
  25. Weisz, A., Cicatiello, L., Esumi, H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide, and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J*. 316: 209-215, 1996.
  26. Ryu, J.H., Ahn, H., Kim, J.Y., Kim, Y.K. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res*. 17: 485-489, 2003.
  27. Mu, M.M., Chakravorty, D., Sugiyama, T., Koide, N., Takahashi, K., Mori, I., Yoshida, T., Yokochi, T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res*. 7:

- 431-438, 2001.
28. Tezuka, Y., Irikawa, S., Kaneko, T., Banskota, A.H., Nagaoka, T., Xiong, Q., Hase, K., Kadota, S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. *J Ethnopharmacol.* 77: 209-217, 2001.
29. Kim, R.G., Shin, K.M., Chun, S.K., Ji, S.Y., Seo, S.H., Park, H.J., Choi, J.W., Lee, K.T. In vitro antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji.* 46: 343-347, 2002.
30. Sarkar, D., Saha, P., Gamre, S., Bhattacharjee, S., Hariharan, C., Ganguly, S., Sen, R., Mandal, G., Chattopadhyay, S., Majumdar, S., Chatterjee, M. Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- $\kappa$ B pathway. *INT Immunopharmacol.* 8(9):1264-1291, 2008.
31. Wang, M.T., Honn, K.V., Nie, D. Cyclooxygenases, prostanoids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 525-534, 2007.