

# 마황행인감초석고탕 추출물의 항염증 효과에 대한 연구

박정은 · 황형서 · 김태연<sup>1\*</sup>

세명대학교 화장품뷰티생명공학부, 1: 세명대학교 한의과대학

## Studies on Anti-inflammatory

## Effects of *Mahwanghanginamchosukgo-tang* Extracts

Jung Eun Park, Hyung Seo Hwang, Tae Yeon Kim<sup>1\*</sup>

School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University, 1: College of Korean Medicine, Semyung University

*Mahwanghanginamchosukgo-tang* (MH) is recorded as a treatment to treat exterior-related respiratory diseases in the Korean medicine. In this study, we examined the anti-inflammatory effects of MH, using MH water extract and lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. First of all, we measured the amount of nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), the products of inflammatory metabolism. Also, we measured enzymes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), as well as cytokines such as interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ), and interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ). MH suppressed the production of NO and PGE<sub>2</sub> in a dose dependent manner and reduced the amount of protein and the mRNA expression of iNOS and COX-2. Also, MH reduced the mRNA expression of IL-6, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In conclusion, MH decreased production of LPS-induced inflammatory factor, which could be a clinical basic subject for inflammatory diseases.

keywords : *Mahwanghanginamchosukgo-tang* (MH)(麻黃杏仁甘草石膏湯), Anti-inflammatory, Inflammatory factor, NO, PGE<sub>2</sub>

## 서론

염증(inflammation)은 병원균이나 상해와 같은 유해한 자극에 대한 생체의 방어 반응이다. 그러나, 상해 물질이나 자극이 제거되지 않고 지속되어 발생하는 만성 염증의 경우, 주된 염증세포인 대식세포가 분비한 물질들이 병원체뿐만 아니라 자신의 조직에도 상해를 주게 되어, 류마티스 관절염, 동맥경화증, 결핵, 그리고 폐섬유증과 같은 가장 흔한 장애성 질환 뿐만 아니라 알츠하이머병과 같은 퇴행성 병변, 악성 종양까지 초래하므로<sup>1)</sup> 염증에 대한 조기 관리는 건강한 삶을 영위하기 위한 첫걸음이라 할 수 있다.

염증의 5대 증후인 발열, 동통, 부종, 발적, 기능장애<sup>2)</sup>는 한의학에서 風邪가 表部에 襲하여 발생하는 發熱, 肌膚에 客하여 발생하는 痛·瘡·麻木, 關節에 曆하여 발생하는 歷節紅腫 疼痛不可忍의 증상들 및 전신적 火邪의 發熱, 국부적인 火邪로 초래되는 紅腫熱痛의 증상<sup>3)</sup>과 유사하다. 이를 토대로 風邪의 현대의학적 의미를 살펴보면, 외부 미생물에 의한 감염성 질환에서 인체의 면역반응에 따라 급격한 증상변화를 수반하는 경우에는 風寒, 風濕, 風熱과 같은 진단을 내릴 수 있으며, 火邪는 서양의학적 개념으로 보면 염증성(inflammatory)·화농성(purulent)·출혈성(hemorrhagic)의 병리

진행을 나타내는 특징을 갖는다고 할 수 있다<sup>3)</sup>.

따라서 한의학의 주요 病因으로 손꼽히는 風邪·火熱邪로 초래되는 일부 증상들을 염증의 관점에서 바라보고 祛風熱의 효능을 가진 다양한 한의학 처방들의 항염증 효능 평가 연구를 진행하는 것은 한의학 처방의 전통적인 효능을 과학적으로 객관화하는 기초연구의 일환으로 지속적인 수행이 필요하지만, 고서에 수록된 우수한 처방들을 방대한 숫자를 생각할 때, 실제 한의학 처방의 효과가 임상적 측면뿐만 아니라 실험적 결과까지 뒷받침된 것은 소수에 불과한 실정이다.

麻黃杏仁甘草石膏湯(*Mahwanghanginamchosukgo-tang*, MH)은 風熱邪에 의하거나, 風寒이 울체되어 熱로 化하여 肺氣의 宣發降逆작용이 원활하지 못하여 壯熱, 咳嗽痰稠黃, 氣喘 등의 風熱象이 주로 나타나는 風熱犯肺證을 치료하는 처방<sup>3)</sup>으로 임상에서는 氣管支炎, 氣管支 喘息, 肺炎 등 호흡기계 질환을 치료하는 목적으로 활용된다<sup>4)</sup>. 본 처방은 처방명에 기재된 바와 같이 麻黃·杏仁·甘草·石膏의 4종 약물로 구성되어 있는데, 麻黃은 發汗解表·宣肺平喘하며, 杏仁은 止咳定喘·潤腸通便하고, 甘草는 瀉火解毒·潤肺祛痰·緩急定痛하며 石膏는 清熱瀉火·收斂生肌하는 효능을 가지고 있어<sup>5)</sup> 肺의 風熱邪로 초래된 호흡기계 질환을 치료할 수 있는 것

\* Corresponding author

Tae Yeon Kim, College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, 27136, Korea

E-mail : violet805@hanmail.net ·Tel : +82-43-649-1339

Received : 2020/10/08 ·Revised : 2020/12/11 ·Accepted : 2020/12/23

© 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.2020.12.34.6>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr> & <http://jppkm.org>

이다.

麻黃杏仁甘草石膏湯에 관한 실험연구로는 진통·해열·소염·거담·적출장관 및 혈압과 호흡에 미치는 영향<sup>6)</sup>, SO<sub>2</sub>로 초래된 흰쥐의 호흡기손상에 미치는 영향<sup>7)</sup>, 천식모델생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향<sup>8)</sup>, 麻杏甘石湯加減方이 천식모델 생쥐의 CD3, CD4, CD8 세포에 미치는 영향<sup>9)</sup> 등에 대한 연구가 진행되었으나, 모두 白鼠를 이용한 실험연구이며, 인간기관지 상피세포인 BEAS-2B cell을 이용한 세포실험 연구의 경우, 천식 유발에 중요한 cytokine 3종의 mRNA 발현<sup>10)</sup>만을 확인한 것으로, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 cyclooxygenase-2 (COX-2)나 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 같은 전구염증매개효소의 변화를 살펴본 연구는 진행된 바가 없는 실정이다.

따라서 본 저자는 호흡기의 염증성 질환 뿐만 아니라, 염증반응을 나타내는 여러 질환에 적용 가능할 것으로 사료되는 MH의 효능을 확인하기 위하여, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에 MH를 전처리 한 후, 자극원인 lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응을 촉진하고, 염증매개인자인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 생성, 전구염증매개효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 생성 및 mRNA 발현, 펩티드성 염증인자인 cytokines의 mRNA 발현을 확인하여, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 제조

MH 2첩(96 g)은 세명대학교 부속 한방병원에서 구매하였다. 시료를 세척하고 960 ml의 증류수를 넣은 뒤 3시간 끓여 유효성분을 추출하였다. 추출액은 원심분리기를 사용하여 침전물을 제거하고, 회전농축기를 사용하여 200 ml가 되도록 감압 농축한 뒤, -70°C 냉동고에서 동결시켰다. 이후 동결건조기를 사용하여 7일간 건조과정을 거쳐 최종적으로 10.8 g의 분말을 얻었다. 획득한 시료는 -20°C에서 보관하였다가 실험 시작 전 배지에 희석하여 사용하였다.

Table 1. Composition of *Mahwanghangingamchosukgo-tang*

Herbal name	Pharmacognostic name	Weight(g)
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	24
杏仁	<i>Ansu Semen</i>	12
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	12
石膏	<i>Cypsum Fibrosum</i>	48
	Total amount	96

### 2. 세포 배양

RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(Seoul, South Korea)에서 분양받았으며, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin (P/S)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시켰다. 세포는 주기적으로 계대배양을 함으로써 증식으로 인한 과밀도 현상을 예방하였다.

### 3. MTT assay

5 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 분포된 RAW 264.7 cell을 500 μl씩 24 well plate에 분주한 후 24시간 배양하였다. 다음날, MH를 0, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml의 농도로 희석한 배지로 교환하고 1시간 다시 배양한 후, 700 ng/ml의 농도로 LPS를 추가한 다음 하루 동안 추가 배양하였다. 5 mg/ml의 Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약을 100 μl씩 각 well에 넣고 암청색의 포마잔(formazan)이 생성되도록 3시간 배양하였다. 그 후 각 well의 배지를 제거하고, Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 500 μl씩 넣은 뒤 포마잔이 잘 녹도록 30분간 shaking 하였다. 그 후 새로운 96 well plate에 50 μl씩 옮겨 담은 뒤 570 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. NO assay

5 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 분포된 RAW 264.7 cell을 2 ml씩 6 well plate에 분주한 후 24시간 배양하였다. 다음날, MH를 0, 20, 50, 100, 200 μg/ml의 농도로 희석한 배지로 교환하여 1시간 다시 배양한 후 LPS를 700 ng/ml의 농도로 추가한 다음 하루 동안 추가 배양하였다. 그 후 새로운 96 well plate에 세포가 없는 상등액 100 μl을 각각 넣은 뒤 Nitric Oxide Detection kit (Intron Biotechnology, Korea)의 A, B 시약을 각각 50 μl씩 넣고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일 plate에 넣은 Nitrite standard의 농도별 흡광도 값을 바탕으로 표준용량곡선을 작성하고 최종적으로 질소산화물(nitrite, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 농도를 계산하였다.

### 5. PGE<sub>2</sub> assay

5 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 분포된 RAW 264.7 cell을 2 ml씩 6 well plate에 분주한 후 24시간 배양하였다. 다음날 MH를 0, 20, 50, 100, 200 μg/ml의 농도로 희석한 배지로 교환하여 1시간 다시 배양한 후 LPS를 700 ng/ml의 농도로 추가한 다음 하루 동안 추가 배양하였다. 그 후 세포가 없는 상등액을 수거하여 R&D systems (USA)의 PGE<sub>2</sub> assay kit의 지시에 따라 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동시에 측정된 PGE<sub>2</sub> standard의 흡광도 값을 바탕으로 표준용량곡선을 작성하고 최종적으로 PGE<sub>2</sub>의 농도를 계산하였다.

### 6. Western blot

5 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 분포된 RAW 264.7 cell을 10 ml씩 100 mm dish에 분주한 후 24시간 배양하였다. 다음날, 100, 200 μg/ml의 농도로 희석한 배지로 교환하여 1시간 다시 배양한 후 LPS를 700 ng/ml의 농도로 추가한 다음 하루 동안 추가 배양하였다. 그 후 세포를 수거하여 단백질을 추출·정량한 후 각각 20 μg의 단백질을 Bio-Rad Laboratories (USA)의 10-20% Mini-PROTEAN TGX™ precast gel과 NC membrane으로 분리·이송하였다. 그 후 10% skim milk에 NC membrane을 담가 blocking 과정을 거친 후, Tris-buffered saline Tween 20 (TBS-T)에 각각 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 5000으로 희석한 iNOS, COX-2, β-actin의 primary antibody를 16시간 부착시킨 뒤, TBS-T 용액에 1 :

5000으로 희석된 HRP-conjugated secondary antibody를 1시간 부착시켰다. 이후 Dogen (Korea)의 EZ-Western Detection kit를 사용하여 지시대로 처리한 후 웨스턴이미지분석시스템으로 분석하였다.

7. Real Time PCR

5 × 10<sup>5</sup> cells/mL로 분포된 RAW 264.7 cell을 10 mL씩 100 mm dish에 분주한 후 24시간 배양하였다. 다음날, 100, 200 µg/mL의 농도로 희석한 배지로 교환하고 1시간 다시 배양한 후 LPS를 700 ng/mL의 농도로 추가한 다음 6시간 추가 배양하였다. 염증 관련 사이토카인의 mRNA 발현량을 비교하기 위하여 Ambion (USA)의 TRIzol reagent를 사용하여 total RNA를 추출한 뒤 Toyobo (Japan)의 Revertra ACE kit를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Corning cellgro (USA)의 Tris/EDTA buffer를 첨가하여 1/5로 희석한 후 사용하였다. RT-PCR 실험은 Applied Biosystems (USA)의 real-time PCR system과 Thermo Fisher (USA)의 Taqman probe(Table 2)를 이용하여 실시간으로 유전자별 mRNA 발현량을 분석하였다.

Table 2. Gene Name and Assay ID Number in Real Time PCR Analysis

Gene name	Assay ID
Inducible nitric oxide synthase (iNOS)	Mm00440502_m1
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	Mm00478374_m1
Interleukin 1 alpha (IL-1α)	Mm00439620_m1
Interleukin 1 beta (IL-1β)	Mm00434228_m1
Interleukin 6 (IL-6)	Mm00446190_m1
Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)	Mm00443258_m1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Mm9999915_g1

8. 통계분석

각 결과값은 SPSS 12.0 통계 프로그램을 사용하여 one way-ANOVA로 군 간 분석을 시행하였으며 유의수준은 p < 0.05로 정하였다.

결 과

1. 麻黃杏仁甘草石膏湯의 세포독성

MH의 대식세포 생존을 저해 여부를 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. MH 무처리군의 흡광도 평균을 100%의 세포 생존율로 설정한 뒤, 이를 기준으로 MH 처리군들의 흡광도 값을 계산한 결과, 0, 10, 20, 50, 100, 200 µg/mL의 농도인 MH 처리군들의 세포 생존율은 100.0 ± 7.5%, 104.8 ± 4.5%, 102.9 ± 5.0%, 105.2 ± 6.9%, 102.2 ± 8.3%, 105.0 ± 6.1%로, MH 처리군 모두에서 무처리군과의 유의미한 차이는 발생하지 않았다.

2. 麻黃杏仁甘草石膏湯의 NO 생성 및 iNOS 발현 변화

MH 및 LPS 무처리군의 NO 생성량은 6.82 ± 1.06 µm이었으며, 대조군(LPS 단독 처리)의 경우에는 37.63 ± 2.29 µm이었다. 20, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 MH를 전처리 한 후 LPS를 넣

은 실험군의 NO 생성량은 각각 31.89 ± 3.59, 27.55 ± 1.72, 24.27 ± 2.52, 19.31 ± 1.91 µm로 대조군과 비교하여 전 농도에서 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 2a).

MH의 NO 생성 억제 효과와 iNOS 간의 관련성을 확인하기 위하여 iNOS의 protein 및 mRNA 발현을 관찰하였다. 대조군(LPS 단독 처리)의 iNOS protein 생성량을 기준으로 실험군(MH 처리)들의 상대적인 생성량을 확인한 결과, 약물 및 LPS 무처리군의 경우에는 iNOS protein이 관찰되지 않았으며, 100, 200 µg/mL의 농도로 MH를 처리한 실험군의 iNOS protein 생성량은 100 ± 21.8%의 대조군과 비교하여 각각 31.25 ± 7.6%, 6.32 ± 1.7%로 모두 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 2b). iNOS mRNA의 상대적 발현은 LPS만 단독 처리한 대조군의 발현값 평균을 100%로 설정한 후, 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과, LPS 처리 후 100 µg/mL 또는 200 µg/mL의 농도로 MH를 처리한 실험군의 발현값을 확인한 결과, 각각 0.1 ± 0.0%, 53.0 ± 6.0%, 37.0 ± 8.0%로 모든 실험군에서 농도 의존적이며 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 2c).

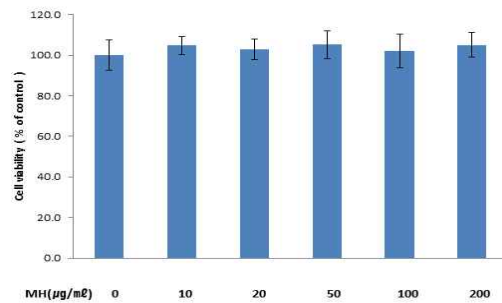
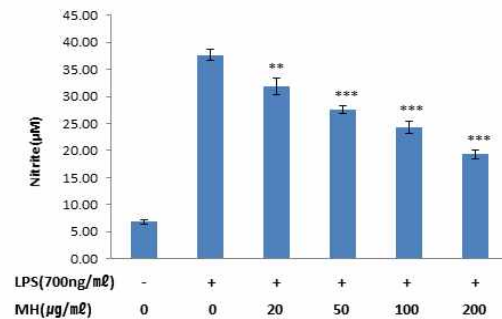
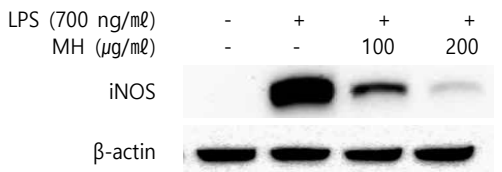


Fig. 1. Effects of MH on the cell viability of RAW 264.7 cells. Cells were treated with 10, 20, 50, 100 and 200 µg/mL of MH extracts for 24 h. The amount of viable cells were determined by MTT assay. There were no significant differences between non-treated group and MH extracts treated groups.

A



B



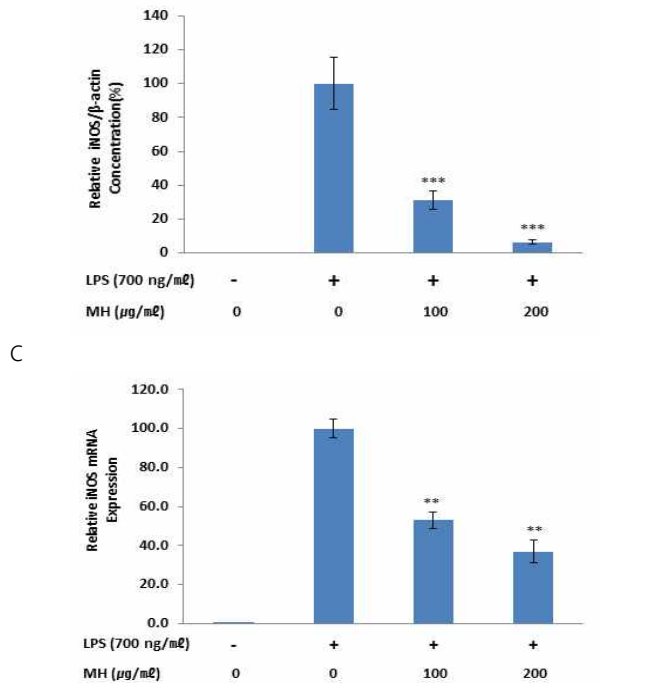


Fig. 2. Effects of MH on LPS-stimulated NO production and iNOS protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were co-treated with MH extracts (20, 50, 100 and 200  $\mu$ g/mL) and LPS (700 ng/mL) for 24 h. Levels of NO in culture supernatants was determined by the Griess reaction. (b) Cells were co-treated with MH extracts (100 and 200  $\mu$ g/mL) and LPS (700 ng/mL) for 24 h. Total iNOS proteins were isolated and analyzed by Western blot. (c) Cells were co-treated with MH extracts (100 and 200  $\mu$ g/mL) and LPS (700 ng/mL) for 6 h. The mRNA level of iNOS was evaluated by real time PCR. GAPDH was used as an internal control for realtime PCR. Data were presented as the means  $\pm$  SEM of triplicate experiments (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the LPS alone treated group).

### 3. 麻黃杏仁甘草石膏湯의 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현 변화

MH 및 LPS 무처리군의 PGE<sub>2</sub> 생성량은 563  $\pm$  108 pg/mL이였으며, 대조군의 경우에는 1924  $\pm$  108 pg/mL이었다. 20, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL의 농도로 MH를 처리한 실험군의 PGE<sub>2</sub> 생성량은 각각 1802  $\pm$  175, 1649  $\pm$  133, 1618  $\pm$  105, 1476  $\pm$  67 pg/mL로 대조군과 비교하여 100, 200  $\mu$ g/mL의 농도로 MH를 처리한 실험군에서 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 3a).

또한 PGE<sub>2</sub> 생성 과정에 기여하는 COX-2 효소와의 관련성을 확인하고자 COX-2의 protein 및 mRNA 발현을 관찰하였다. 대조군의 COX-2 protein 생성량을 기준으로 실험군들의 상대적인 생성량을 확인한 결과, 무처리군의 경우에는 COX-2 protein이 관찰되지 않았으며, 100, 200  $\mu$ g/mL의 농도로 MH를 처리한 실험군의 COX-2 protein 생성량은 100  $\pm$  7.2%의 대조군과 비교하여 각각 59.51  $\pm$  12.4, 39.32  $\pm$  16.4%로 모두 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 3b). COX-2 mRNA의 상대적 발현은 LPS만 단독 처리한 대조군의 발현값 평균을 100%로 설정한 후, 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과, LPS 처리 후 100  $\mu$ g/mL 또는 200  $\mu$ g/mL의 농도로 MH를 처리한 실험군의 발현값을 확인한 결과, 각각 0.0  $\pm$  0.0%, 85.4  $\pm$  5.1%, 55.1  $\pm$  4.2%로 실험군에서 농도 의존적인 감소 양상을 보였으며, 특히 200  $\mu$ g/mL의 실험군에서는 대

조군과 비교하여 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 3c).

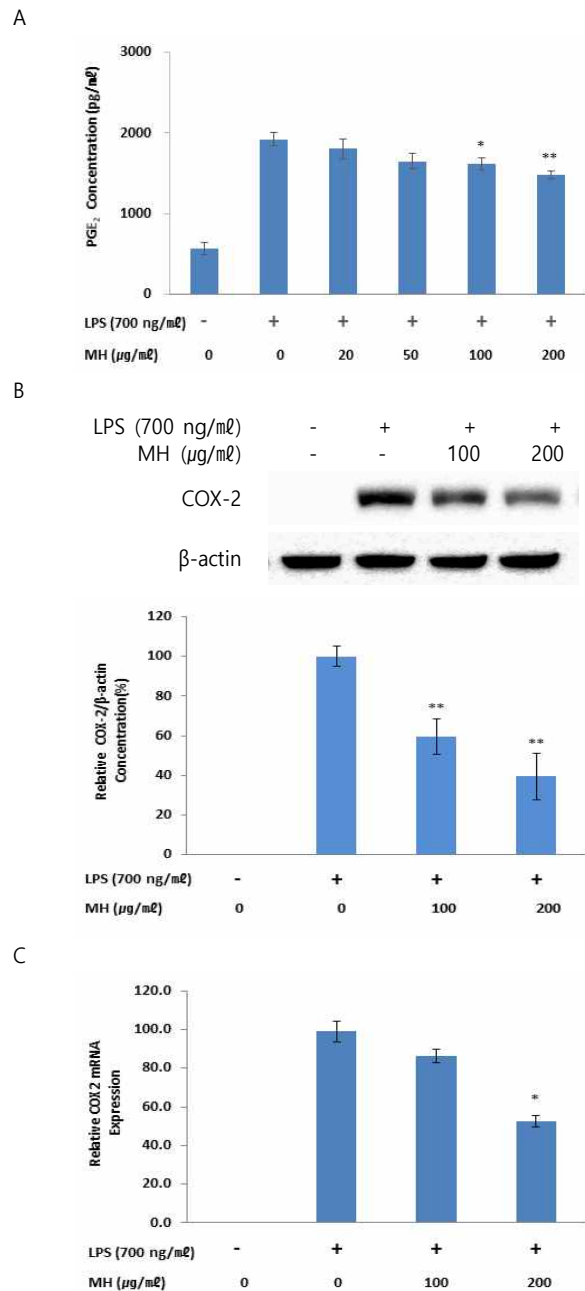


Fig. 3. Effects of MH on LPS-stimulated PGE<sub>2</sub> production and COX-2 protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were co-treated with MH extracts (20, 50, 100 and 200  $\mu$ g/mL) and LPS (700 ng/mL) for 24 h. Levels of PGE<sub>2</sub> in culture supernatants were measured by ELISA. (b) Cells were co-treated with MH extracts (100 and 200  $\mu$ g/mL) and LPS (700 ng/mL) for 24 h. Total COX-2 proteins were isolated and analyzed by Western blot. (c) Cells were co-treated with MH extracts (100 and 200  $\mu$ g/mL) and LPS (700 ng/mL) for 6 h. The mRNA level of iNOS was evaluated by real time PCR. GAPDH was used as an internal control for realtime PCR. Data were presented as the means  $\pm$  SEM of triplicate experiments (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the LPS alone treated group).

### 4. 麻黃杏仁甘草石膏湯의 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 발현 저해 MH가 대식세포에서의 pro-inflammatory cytokine 발현에

어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RT-PCR 실험을 진행하였다. IL-1 $\alpha$  mRNA의 상대적 발현은 LPS만 단독 처리한 대조군의 발현값 평균을 100%로 설정한 후, 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과, LPS 처리 후 100  $\mu$ g/ml 또는 200  $\mu$ g/ml의 농도로 MH를 처리한 실험군의 발현값을 확인한 결과, 각각 0.0  $\pm$  0.0%, 76.6  $\pm$  7.8%, 32.3  $\pm$  4.2%로 모든 실험군에서 농도 의존적이며 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 4a). IL-1 $\beta$  mRNA의 상대적 발현은 LPS만 단독 처리한 대조군의 발현값 평균을 100%로 설정한 후, 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과, LPS 처리 후 100  $\mu$ g/ml 또는 200  $\mu$ g/ml의 농도로 MH를 처리한 실험군의 발현값을 확인한 결과, 각각 0.1  $\pm$  0.0%, 88.4  $\pm$  3.8%, 41.5  $\pm$  3.5%로 실험군에서 농도 의존적인 감소 양상을 보였으며, 특히 200  $\mu$ g/ml의 실험군에서는 대조군과 비교하여 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 4b). IL-6 mRNA의 상대적 발현은 LPS만 단독 처리한 대조군의 발현값 평균을 100%로 설정한 후, 약물 및 LPS를 처리하지 않은 무처리군과, LPS 처리 후 100  $\mu$ g/ml 또는 200  $\mu$ g/ml의 농도로 MH를 처리한 실험군의 발현값을 확인한 결과, 각각 0.0  $\pm$  0.0%, 85.6  $\pm$  5.8%, 26.5  $\pm$  3.1%로 실험군에서 농도 의존적인 감소 양상을 보였으며, 특히 200  $\mu$ g/ml의 실험군에서는 대조군과 비교하여 유의성 있는 감소 양상을 보였다(Fig. 4c).

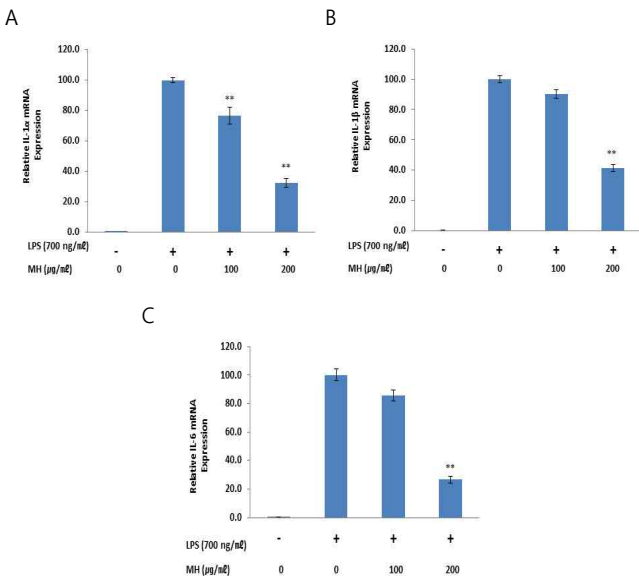


Fig. 4. Effects of MH on LPS-stimulated IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression in RAW 264.7 cells. Cells were co-treated with MH extracts (100 and 200  $\mu$ g/ml) and LPS (700 ng/ml) for 6 h. The mRNA levels of IL-1 $\alpha$  (a), IL-1 $\beta$  (b) and IL-6 (c) were evaluated by real time PCR. GAPDH was used as an internal control for realtime PCR. Data were presented as the means  $\pm$  SEM of triplicate experiments (\*\* p < 0.01 vs. the LPS alone treated group).

## 고찰

麻黃杏仁甘草石膏湯(Mahwanghangingamchosukgo-tang, MH)은 漢代 張仲景의 傷寒論에 最初로 수록된 처방으로 解散表邪·清肺定喘하는 효능을 가지고 外感表證에 汗法이나 下法을 쓴

후 邪熱이 肺에 壅滯되어 숨이 가쁘게 되는 경우에 사용<sup>4)</sup>되는 것으로 알려져 있으며, 임상에서는 氣管支炎, 氣管支 喘息, 肺炎 등 호흡기계 질환을 치료할 뿐만 아니라<sup>11)</sup>, 고지혈증<sup>12)</sup>, 비만<sup>13)</sup>, 아토피 피부염 및 건선<sup>14)</sup>의 치료에도 활용되는 것으로 보고되어 있다.

본 처방의 구성 약물은 麻黃, 杏仁, 甘草, 石膏의 총 4종이다. 개별 약물의 효과를 살펴보면, 麻黃(*Ephedrae Herba*)의 경우, 한의학적으로 散寒解表·宣肺平喘·利水消腫의 효능을 가지며<sup>15)</sup>, 실험적 연구를 통해 adjuvant 유도성 관절염 또는 LPS로 유도된 염증을 억제하는 마황 약침의 효과 또한 확인되었다<sup>16)</sup>. 또한 麻黃의 주요 성분인 ephedrine은 일반적으로 체온 상승을 유도하나, 麻黃이 石膏와 配伍되어 있는 MH에서는 체온을 상승시키지 않는다는 것이 확인되었다<sup>17)</sup>. 杏仁(*Ansu Semen*)은 止咳平喘·潤腸通便의 효능을 가지며<sup>15)</sup>, 알레르기성 천식 마우스 모델에서 기관지 수축 및 염증 증상을 약화시키는 것으로 확인<sup>17)</sup>되었다. 杏仁에 3% 정도를 차지하는 amygdalin의 경우에도 항염증 효과가 보고<sup>18)</sup>되었으며, 50% 정도를 구성하는 지방유에서도 진통 및 항염 작용이 있다고 보고<sup>19)</sup>되었다. 甘草(*Cypsum Fibrosum*)는 清熱解毒·潤肺止咳·補神益氣·調和諸藥의 효능이 있으며<sup>15)</sup>, 신장염(nephritis)에 대한 개선 작용이 보고<sup>20)</sup>되었다. 또한 gel 형태로 제형화한 甘草 추출물은 아토피성 피부염 환자에게 효과를 보였으며<sup>21)</sup>, 甘草에서 분리한 18-a-glycyrrhetic acid는 정상 쥐 및 부신을 제거한 쥐에서 당질 코르티코이드와 유사한 항염증성 작용을 나타내는 것으로 확인<sup>22)</sup>되었다. 95% 이상이 CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O로 이루어져 있는 石膏(*Cypsum Fibrosum*)는 清熱瀉火·清肺脾胃·收斂生肌의 효능이 있으며<sup>15)</sup>, 석고 煎湯液을 발열 모델의 토끼에 투여 시 체온 조절 중추의 항진을 억제하여 해열작용을 나타낼 뿐만 아니라, 흡수된 Ca<sup>2+</sup>의 작용에 의해 모세혈관 투과성 항진을 감소시켜 항염증 작용을 나타내는 것으로 확인<sup>23)</sup>되었다.

이와 같이 MH는 구성 약물 각각의 한의학적 효능 및 상호 배합을 통해 解散表邪·清肺定喘의 효능을 가질 뿐만 아니라, 개별 약물 전체 또는 추출 성분을 가지고 실험한 결과 상에서도 각각 항염 효능을 가지고 있으므로, MH 또한 현대의학적으로는 항염증 효과를 지닐 것으로 사료되어, 본 처방의 효능에 대한 세포수준에서의 기전을 확인하고자 RAW 264.7 cell을 이용하여 염증매개인자 및 전구염증매개효소의 분자생물학적 변화를 관찰하는 본 실험을 진행하였다.

RAW 264.7 cell은 BALB/c 마우스 유래 대식세포 유사 세포주로, 다양한 약물들의 세포유래 염증매개물질의 생성 및 염증 신호전달체계 조절 여부를 확인하는 항염증 실험의 기초 모델로서 염증 감소 효능 약물을 밝혀내기 위하여 다용되고 있다<sup>24,25)</sup>. 본 연구에서 실험하고자 하는 MH의 농도에서 RAW 264.7 cell의 생존율이 저해되는지 여부를 확인한 결과, MH 처리군은 200  $\mu$ g/ml 이하의 전 농도에서 세포생존율에 영향을 받지 않음이 관찰되었다.

NO (nitric oxide)는 산화질소합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 L-아르지닌으로부터 합성된다. NOS에는 내피세포성(endothelial, eNOS), 신경성(neuronal, nNOS) 유도성(inducible, iNOS)의 3가지 종류가 존재하는데, 이 중 iNOS는 그람음성 세균의 세포벽 구성성분 중 하나인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 미생물 생성물이나 사이토카인(cytokines) 등에 의해

대식세포가 활성화될 때 유도되어 NO 생성을 초래한다<sup>26,27</sup>. NO 및 이의 유도체들은 살균성을 가지고 있어서 감염에 대한 숙주의 방어적 매개체로 작용하지만, NO로부터 유래되는 자유라디칼은 세포 독성을 초래하여 숙주에 손상을 입힌다<sup>28</sup>.

본 연구에서 MH의 NO 생성에 미치는 효과를 확인한 결과, LPS만 단독 처리한 대조군과 비교하여 MH를 처리한 모든 실험군에서 유의성 있는 NO 생성 저해 효과가 관찰되었으며, 또한 100, 200 µg/ml의 농도로 MH를 처리한 실험군에서 유의성 있는 iNOS protein 생성 저하 및 iNOS mRNA 발현 억제도 나타났다.

염증의 혈관 및 전신반응에 관여하는 프로스타글란딘(prostaglandins, PGs)은 아라키돈산(arachidonic acid, AA) 대사 물질로 대식세포, 비만세포, 내피세포 및 다양한 세포들에서 분비되는데 cyclooxygenase (COX) 효소의 작용에 의해 합성된다. COX는 인체 내에서 항상 발현되는 COX-1과 다양한 염증 자극에 의해 유도되는 COX-2의 2가지 형태로 존재하는데, 이 중 COX-2는 LPS, 박테리아 독소, 사이토카인 등의 염증 자극 인자나 매개 물질로 인하여 촉진되어 대량의 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 생산케 한다<sup>29-32</sup>. 본 연구에서 MH의 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 효과를 확인한 결과, LPS만 단독 처리한 대조군과 비교하여 100, 200 µg/ml 농도의 MH 처리군에서 PGE<sub>2</sub> 생성 저하 효과가 유의성 있게 관찰되었으며, COX-2의 단백질 생성 저하는 100, 200 µg/ml 농도, mRNA 발현 억제는 200 µg/ml 농도의 MH 처리군에서 유의성 있게 나타났다.

NO, PGE<sub>2</sub>와 더불어 염증반응에서 주요 세포-유래 매개물질 중 하나인 사이토카인(cytokines)은 오랫동안 세포 면역반응에 관여하는 것으로 알려진 폴리펩티드로 급성 및 만성 염증 모두에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 급성 염증에서는 interleukin (IL)-1α, IL-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α 등이, 만성 염증에서는 interferon-γ와 IL-12가 대표적인 사이토카인이다<sup>26,33</sup>. 이 중 본 연구에서는 RAW 264.7 cell에서의 IL-1α, IL-1β, IL-6 mRNA 발현 변화를 관찰하여, 염증성 질환에 대한 MH의 효과를 확인하고자 하였다.

실험 결과, MH는 100, 200 µg/ml의 농도에서 LPS로 촉진된 IL-1α, IL-1β, IL-6 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 효과를 보였으며, IL-1α는 100, 200 µg/ml의 농도에서, IL-1β와 IL-6는 200 µg/ml의 농도에서 유의성 또한 확인되었다. 이는 MH가 염증반응에서 세포-유래 매개물질의 생성에 관여하는 세포 내 신호회로를 조절함으로써 염증 억제 효능을 가진다는 것을 시사하고 있는 것이다.

상기 결과들을 통해 MH는 NO 및 PGE<sub>2</sub> 발생 억제, iNOS 및 COX-2의 protein 생산과 mRNA 발현 저하, IL-1α, IL-1β, IL-6의 mRNA 발현 저하를 바탕으로 항염증 효과를 갖고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 MH는 염증성 질환의 치료제 및 다양한 기능성 제품의 유효성분으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

MH의 항염증 효과를 확인하고자 LPS로 자극한 RAW 264.7

cell을 이용하여 NO 및 PGE<sub>2</sub> 발생, COX-2 및 iNOS의 protein 생산과 mRNA 발현, 주요 사이토카인인 IL-1α, IL-1β, IL-6의 mRNA 발현에 대하여 실험한 결과, 다음과 같은 결론에 도달하였다.

MH는 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제한다.

MH는 COX-2 및 iNOS의 protein 생산과 mRNA 발현을 감소시킨다.

MH는 IL-1α, IL-1β, IL-6의 mRNA 발현을 감소시킨다.

상기의 결과를 바탕으로 MH는 항염증 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2020학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

## References

1. Vinay K, Abul A, Nelson F, Jon A. Robbins & Cotran Pathologic Basis of disease. 8th ed. Amsterdam:Elsevier Inc;2011. p. 69.
2. Choi BG. Free radicals and diseases. Seoul:Shinil books;2004. p. 214.
3. Textbook Compilation Committee of Pathology in Korean Medicine. Pathology in Korean Medicine. Yongin:Hanuimunhwasa;2019. p. 41-3, 64, 66, 440.
4. Moon JJ, An GS, Kim JB, Park WS, Park JH, Kim DH et al. Precise Interpretation of 'Treatise on Cold Damage Diseases'. Yongin:Hanuimunhwasa;2014. p. 162-4, 338-9.
5. National College of Korean Medicine Collaborative Textbook Compilation Committee. Herbology. Seoul:Younglim Publishing Inc;2000. p. 121, 160, 478, 540.
6. Hong ND, Jeong GM, Moon JH, Joo SM. Effects of Mahaengkamsuk-tang on Analgesic, Antipyretic, Antiinflammatory, Secretion of Respiratory Tract, Isolated Ileum and Blood Pressure. Kor. J. Pharmacogn. 1986;17(3):223-32.
7. Lee JH, Jung SG, Rhee HK. Effect of Mahwanghangingamchosukgo tang & Mahwanghangingamchosukgotang gamibang on the Pulmonary Function of SO<sub>2</sub>-Exposed Rats. K. H. Univ. O Med. J. 1993;16:85-105.
8. Lee JG, Koo YS, Lee YG, Park YC. Effect of Mahaenggamseok-tang-gagambang on CD3, CD4, CD8 Cells in OVA-induced Asthmatic Mice. Journal of Oriental Medicine Research Institute in Daejeon University. 2008;17(1):67-74.
9. Park GB, Park YC. Effects of Mahaenggamseok-tang-gagambang on Immune Cells and Cytokines in OVA-Induced Asthmatic Mice. Korean J. Oriental



- Physiology & Pathology. 2009;23(3):590-8.
10. Park SH, Jeong HJ, Jeong SG, Lee HG. The Inhibitory Effects Mahaenggamseok-Tang and Platycodi Radix on the Cytokines of Human Epithelial Cells. *K. H. M.* 2001;17(2):230-41.
  11. Lee YB, Jeong AR. Mahaenggamsuktang for treating Mycoplasma pneumonia in Children: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials (RCTs). *J Pediatr Korean Med.* 2020;34(2):86-104.
  12. Jang JT, Seo IB, Kim JB. Effects of Gamimahaenggamseok-tang and Typhae Pollen on Body Weight and Lipid Metabolism of Rats with Obesity induced by High Fat Diets. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2003;17(1):190-202.
  13. Cho JH. Effect of Mahaenggamseok-Tang(Mahuangjiazhu-tang) on Anti-Obesity in High Fat Diet-induced Obese Sprague-Dawley Rat. *Naju:Dongshin University;*2011. p. 42.
  14. Noh HM, Park SG, Kweon SH, Jo EH, Park MC. Case Report of the Patient with the Atopic Dermatitis, Psoriasis Treated with Mahaenggamseog-tang. 2018;32(1):80-7.
  15. Textbook Compilation Committee of Herbal Pharmacology. *Herbal Pharmacology.* 3rd ed. Seoul:Sinil books;2010. p. 116-7, 182-4, 273-7, 328-30.
  16. Yeom MJ, Lee HC, Kim GH, Lee HJ, Shim IS, Oh SK, Kang SK, Hahm DH. Anti-arthritic Effects of Ephedra sinica STAPF Herb-Acupuncture: Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Adjuvant-Induced Polyarthritis. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(1):41-50.
  17. DO JS, Hwang JK, Seo HJ, Woo WH, Nam SY. Antiasthmatic activity and selective inhibition of type 2 helper T cell response by aqueous extract of semen armeniacae amarum. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2006;28(2):213-38.
  18. Yang HY, Chang HK, Lee JW, Kim YS, Kim H, Lee MH, Shin HS, Ham DH, Park HK, Lee HJ, Kim CJ. Amygdalin suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. *Neurol Res.* 2007;29(1):59-64.
  19. Zhu YP. *Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and applications.* The Netherlands: Harwood Academic Publishers;1998. p. 496-8.
  20. Fukai T, Satoh K, Nomura T, Sakagami H. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from Glycyrrhiza glabra. 2003;74(7):624-9.
  21. Saeedi M, Morteza-Semnani K, Ghoreishi MR. The treatment of atopic dermatitis with licorice gel. 2003;14(3):153-60.
  22. Amagaya S, Sugishita E, Ogihara Y, Ogawa S, Okada K, Aizawa T. Comparative studies of the stereoisomers of glycyrrhetic acid on anti-inflammatory activities. *J Pharmacobiodyn.* 1984;7(12):923-8.
  23. Masayasu K. *Herbal Pharmacology.* Tokyo:Namsandang ;1997. p. 132-3.
  24. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Innate immunity : Tenney S. Kuby Immunology.* 6th ed. New York:Freeman press;2007. p. 52-73.
  25. Kim BH, Lee YT, Kang KH. Codonopsis Lanceolata Inhibits Inflammation through Regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Physiol Pathol Korean Med.* 2010;24(1):80-4.
  26. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain:The free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 1992;32:297-311.
  27. Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur J Neurosci.* 2002;16(11):2103-12.
  28. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002;40(2):140-55.
  29. Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene.* 2001;20(29):3921-6.
  30. Marina L, Kamal RM, Andrew F, Gary B, Jeremy S, Andrew RC. Regulation of Cyclooxygenase 2 mRNA Stability by the Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Signaling Cascade. *Mol Cell Biol.* 2000;20(12):4265-74.
  31. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2 :regulation and relevance in inflammation. *Biochemical Pharmacology.* 1995;50(10):1535-42.
  32. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, Van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):4-13.
  33. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 1998;273(2):974-80.