

Original Article / 원저

창출금련탕(蒼朮芩連湯) 추출물의 항산화 및 항염증 활성에 미치는 영향

원혜련¹ · 박혜수² · 김이화³ · 김용민⁴

¹세명대학교 한방화장품과학과 (대학원생)

²세명대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실 (수련의)

³세명대학교 한의과대학 경락경혈학교실 (교수)

⁴세명대학교 한방화장품과학과 (교수)

The anti-oxidant and anti-inflammatory Activities of Changchulgeumryeontang Extract

Hea-Ryeon Won¹ · Hye-Su Park² · Ee-Hwa Kim³ · Yong-Min Kim⁴

^{1,4}Dept. of Oriental Cosmetic Sciences, Semyung University

²Dept. of Oriental Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean Medicine, Semyung University

³Dept. of Meridian and Acupoint, College of Korean Medicine, Semyung University

Abstract

Objectives : This study investigated the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Changchulgeumryeontang (CCGRT) extract.

Methods : The macrophage cell line RAW 264.7 cells were used and MTT assay was performed to measure the cell viabilities at the various concentrations of CCGRT (25-200 μ g/ml). Nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) were measured in LPS-induced RAW 264.7 cells. Expressions of iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β and IL-6 were also performed by real-time PCR. The anti-oxidant activities of CCGRT was measured by DPPH radical scavenging activity.

- Results** : 1. there was no cytotoxicity in RAW264.7 cells treated with CCGRT compared to the control.
2. CCGRT treated group significantly inhibited NO and PGE₂ production compared to the LPS treated group.
3. CCGRT treated group significantly decreased mRNA expressions of iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β and IL-6 compared to the LPS treated group.
4. CCGTR was found to have high DPPH free radical scavenging ability.

Conclusions : According to the above results, CCGRT may be a potential choice for the treatment of inflammatory skin disease.

Key words : Anti-inflammation; Anti-oxidant; nitric oxide (NO); Prostaglandin E₂ (PGE₂);
Changchulgeumreontang (CCGRT)

I. 서 론

최근 산업화가 심화되면서 주거환경 및 식생활의 변화, 유전적 영향, 환경오염 등에 의해 발생하는 화학적, 생물학적 유해인자들의 노출로 다양한 연령층에서 면역조직 이상으로 유발된 염증 반응 및 아토피 질환과 같은 피부 염증성 질환의 발생이 크게 증가하고 있다¹⁾. 또한 산업화에 따른 현대 사회의 급격한 경제 성장으로 인해 현대인들의 삶의 질이 상승되고 건강과 미에 대한 욕구 및 노화에 대한 관심이 점차 늘어나면서 천연 자원이나 한약 추출물을 이용한 항산화 및 항염 작용에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있는 추세이다²⁾.

현대 사회에서 급증하고 있는 만성 염증성 질환 및 생활습관병 등은 생체의 대사 과정 중 산화 반응에서 발생한 활성산소류(reactive oxygen species, ROS)에 의한다고 볼 수 있다³⁾. 활성산소는 생체 내의 물질과 반응하여 산화적 스트레스를 유발하고 이러한 산화적 스트레스는 인체 내 다양한 조직 세포를 손상시켜 노화와 고혈압, 당뇨병, 동맥경화, 비만, 암, 아토피성 피부염 등 여러 만성 염증성 질환을 유발시키며⁴⁾, 이러한 만성 염증성 질환들이 임상에서 차지하는 비율이 증가함에 따라 체내에서 활성산소 소거능을 가진 항산화 물질에 대한 관심이 높아지고 있다.

활성산소의 하나이면서 고농도에서 세포의 기질적 손상을 유발하는 nitric oxide(NO)는 염증 반응 시 inducible NO synthase(iNOS)에 의해 과생성되어 부종, 발열, 조직손상 등의 염증 반응을 촉발한다⁵⁾.

염증반응은 상처나 감염 등의 외부의 자극에 의한 생체 조직의 1차적 면역 반응 과정 중의 하나로서 발열, 발진, 부종, 통증, 혈관투과성 등을 유발하는 국소적 반응으로^{3,5)}, 이러한 염증 과정 중에 iNOS에 의해 생성되는 NO와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 생성되는 prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증매개물질들은 대사 과정에서 NO 형성 과정으로 다시 이어지게 된다^{5,6)}. 또한 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6) 등의 염증 매개 cytokine 등은 nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B)라는 전사인자에 의해 합성이 조절되며, ROS의 생성을 촉진시킴에 따라 여러 염증성 질환들을 악화시킬 수 있다^{5,6)}.

창출금련탕(蒼朮苓連湯, Changchulgeumryeontang, CCGRT)은 《張氏醫通》卷十五에 수록되어 창출, 황금, 황련, 목향, 지실, 반하, 시호, 승마, 천궁, 후박, 길경, 목통, 감초 등으로 구성되어 있고 “治瘡癰濕熱”하는 효능으로 염증성 피부 질환에 사용 가능한 처방으로 생각되나, 현재까지 본 처방에 대한 실험적 연구는 보고된 바 없었다. 이에 본 연구에서는 CCGRT가 항염증 및 항산화 작용에 어떠한 효과가 있는지 조사하기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 이용하여 세포독성, NO, PGE₂ 생성량, iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β 그리고 IL-6의 발현을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

CCGRT를 제조하기 위한 약재는 (주)HMAX(충청

Corresponding author : Yong-Min Kim, Dept. of Oriental Cosmetic Sciences, Semyung University, Jecheon, Chungbuk 27136, South Korea.

(Tel : 043-653-6303, E-mail : dragonroom@hanmail.net)

•Received 2018/10/9 •Revised 2018/11/5 •Accepted 2018/11/12

북도 제천시)에서 구입하였으며, 용량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Contents of Changchulgeumryeontang

Herbal name	Pharmacognostic Name	Weight (g)
蒼朮	<i>Atractylodes lancea D.C</i>	24g
黃芩	<i>Scutellaria baicalensis Georgi</i>	16g
黃連	<i>Coptis japonica Makino</i>	16g
木香	<i>Aucklandia lappa Decne</i>	16g
枳實	<i>Poncirus trifoliata Rafinesqui</i>	16g
半夏	<i>Pinellia ternate Breitenbach</i>	16g
柴胡	<i>Bupleurum falcatum</i>	16g
升麻	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	16g
川芎	<i>Cnidium officinale</i>	16g
厚朴	<i>Magnolia officinalis Rehder et Wilson</i>	16g
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i>	16g
木通	<i>Akebia quinata Decaisne</i>	16g
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer</i>	16g
Total		216g

2. 시료 조제

상기의 한약재들을 3차증류수 2,000ml와 함께 넣은 뒤 heating mantle를 이용하여 4시간 동안 가열하고 6시간 냉각시켜 CCGRT를 제조하였다. 추출물을 얻은 후 거즈로 1차 여과 한 후 여과지로 2차 여과를 진행하였다. 여과를 마친 후 여과액을 감압 농축하여 100 ml 농축액을 얻었다. 농축액을 -80℃ 냉동고에 얼린 후 동결건조 한 뒤 분말을 얻어 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 43g을 얻었고 수율은 약 20%이다.

3. 세포배양

본 연구에서 RAW 264.7 대식세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 배양 시 배지는 10% fetal bovine serum (FBS; GenDEPOT, USA)와 1% penicillin/streptomycin (GenDEPOT, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; GenDEPOT, USA)을 사용하였으며, 37℃, 5% CO₂ incubator (MCO-17AIC, SANYO, Japan)에

서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

CCGRT의 세포독성을 검사하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Bio basic, Canada) assay를 시행하였다. RAW 264.7 대식세포를 96 well plate에 5×10^4 cell/well의 세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 그 후 CCGRT의 농도가 25, 50, 100 및 200 µg/ml이 되도록 처리하였다. 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양 후, MTT용액 (4mg/ml)을 20 µl 가한 뒤 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 상층액을 제거하고 DMSO 100 µl를 첨가하여 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 formazan을 ELISA microplate reader (SoftMax Pro5; Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 다음의 산출식에 따라 %로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

5. RAW 264.7 대식세포에서의 NO 생성능 측정

NO의 생성량은 염증 유도 물질인 lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA)와 CCGRT를 농도별로 처리하여 RAW 264.7 대식세포 배양액 중에 존재하는 NO의 양을 Griess reagent (Sigma, USA)을 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well의 세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 그 후 CCGRT를 25, 50, 100 및 200 µg/ml와 LPS (1 µg/ml)을 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 세포의 배양액을 100 µl를 다른 96 well plate에 옮겨 준 후, Griess reagent를 100 µl 처리하였다. 실온에서 10분 동안 방치한 후, ELISA microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. PGE₂ 측정

LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 macrophage cells를 사용하여 PGE₂의 생성을 PGE₂ ELISA kit (abcam, UK)을 사용하여 측정하였다. 6 well plate에 RAW 264.7 대식세포를 5 x 10⁵ cells/well로 분주 한 뒤 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ incubator에 안정화 시켰다. 24시간 뒤 CCGRT 농도 25, 50, 100 및 200µg/ml가 되도록 LPS (1µg/ml)와 동시에 처리하고 배양하였다. 배양 후 상층액을 13,000rpm에서 15분 원심 분리하여 PGE₂ 정량에 사용하였다. Goat anti-mouse IgG가 코팅되어있는 96 well plate에 상층액을 농도 별로 각 well에 첨가하였다. PGE₂ alkaline phosphate conjugate를 50µl첨가한 뒤 PGE₂ antibody를 50µl 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 1 x wash buffer를 사용하여 2 - 3회 세척한 뒤 PnPP substrate를 200 µl 첨가 하고 실온에서 45분 배양한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 측정

RAW 264.7 대식세포에서의 CCGRT가 갖는 iNOS, NF-κB, IL-1α, IL-1β 그리고 IL-6 발현 억제 효과를 확인하기 위해 realtime PCR 분석을 진행하였다. 6 well plate에 5 x 10⁵ cells/well로 분주한 뒤 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 안정화시켰다. 24시간 뒤 CCGRT 최종 농도가 25, 50, 100 및 200µg/ml가 되도록 LPS (1µg/ml)와 동시에 처리하고 배양하였다. 24시간 뒤 Trizol reagent

(Ambion, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC treated-water; Sigma, USA)로 용해하여 사용하였고, cDNA 합성 kit (Revetra ACE-α-; Toyobo, Japan)를 통해 total RNA (2µg)으로 cDNA를 합성하여 사용하였다. cDNA 합성 후 유전자들의 상대적인 양은 Tagman master mix (Thermo fisher, USA) 10µl, 멸균수 4µl, primer 1µl, cDNA 5µl를 혼합하여 iNOS, NF-κB, IL-1α, IL-1β, IL-6를 실시간으로 유전자별 mRNA분석에 사용하였다. 실험에 사용된 probe들은 Table 2에 나타났다.

8. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능을 측정하기 위해 시료와 DPPH assay을 실시하였다. 96 well plate에 CCGRT를 25, 50, 100 및 200µg/ml의 농도로 MeOH (Methanol)에 희석하여 100µl씩 처리하고, DPPH (250µm) 용액 100µl을 처리하였다. 실온에서 빛을 차단하고 30분 반응시킨 후 microplate reader을 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control은 ascorbic acid (200µm)를 사용하였다.

9. 통계처리

실험결과는 SPSS 12.0 version (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였다. 모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, CCGRT의 효과를 판정하기 위한 통계학적 분석은 독립 표본 t-test (independent t-test)를 통하여 비교 분석하

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

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1
iNOS	Inducible nitric oxide synase	Mm00440502_m1
IL-1α	Interleukin 1 alpha	Mm00439620_m1
IL-1β	Interleukin 1 beta	Mm004344228_m1
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
NF-κB	Nfkb1	Mm00476361_m1

였다. 시료의 농도는 각각 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 했을 때를 대조군과 비교하였다.

III. 결 과

1. 세포 생존률

CCGRT를 각각 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 배양한 RAW 264.7 대식세포의 생존율을 관찰한 결과, control군에 비해서 $96.86 \pm 5.62\%$, $95.56 \pm 3.42\%$, $99.15 \pm 4.62\%$ 및 $104.4 \pm 3.45\%$ 로 나타났다. 이러한 결과, CCGRT는 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 범위에서 RAW 264.7 대식세포에서 통계학적으로 유의하게 독성이 없음을 확인하였다 ($p > 0.05$)(Fig. 1).

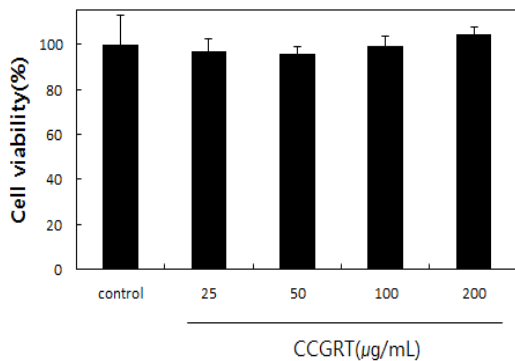


Fig. 1. Effect of Changchulgeumryeontang (CCGRT) on the Toxicity of RAW 264.7 Cells.

Control: untreated group; 25, 50, 100, 200: treated with various concentrations of CCGRT ($\mu\text{g}/\text{mL}$). values are represented to the mean \pm SD.

2. NO생성에 미치는 영향

RAW 264.7 대식세포에서의 NO 생성에 대한 CCGRT의 저해효과를 측정하였다. LPS 단독 처리한 군의 NO 생성율은 $389.71 \pm 9.35\%$ 로 증가하였다. 한편 LPS와 CCGRT를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 군에서는 $364.27 \pm 6.75\%$, $335.31 \pm 13.2\%$, $326.6 \pm 5.65\%$ 및 $294.69 \pm 7\%$ 로 나타나 LPS 처리군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였

다(Fig. 2).

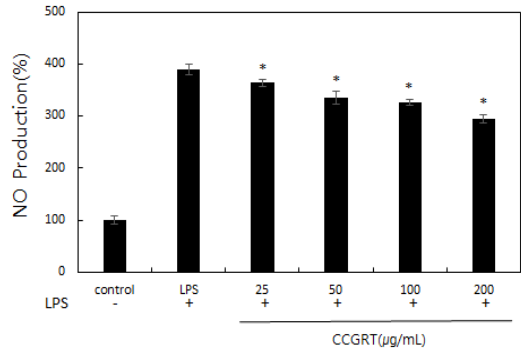


Fig. 2. Effect of CCGRT the NO Production in RAW264.7 cells.

control: untreated group; LPS: treated with LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$); 25, 50, 100 and 200: treated with LPS and CCGRT ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Values are relative to the control. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS.

3. PGE₂ 생성 저해 효과

CCGRT의 NO 생성 저해능을 확인하고 또 다른 염증 유발 매개체인 PGE₂의 생성 억제 효능을 평가하였다. LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 PGE₂의 생합성이 증가함을 확인하였다. LPS 처리 군에서 PGE₂의 농도는 $602.22 \pm 2.907\text{pg}/\text{mL}$ 로 증가하였다. 또한 CCGRT (25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리군에서 PGE₂ 농도는 594.5 ± 5.34 , $592.78 \pm$

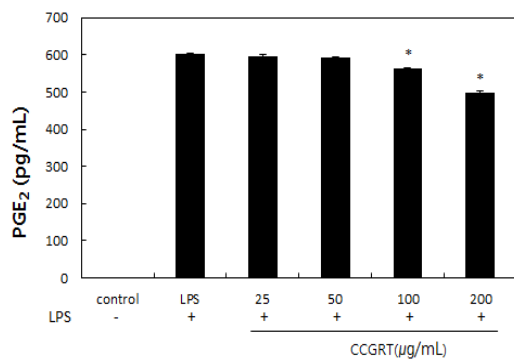


Fig. 3. Effect of CCGRT the PGE₂ Production in RAW 264.7 cells.

Control: untreated group; LPS: treated with LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$); 25, 50, 100 and 200: treated with LPS and CCGRT(25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Values are relative to the control. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS.

2.12, 564.78 ± 0.39 및 498.78 ± 4.64 pg/ml로 나타나 CCGRT는 LPS로 유도된 PGE₂의 생성이 농도 의존적으로 억제됨을 볼 수 있었다(Fig. 3).

4. iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β 그리고 IL-6의 mRNA 수준에서 미치는 영향

CCGRT가 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포에

서 갖는 iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β 그리고 IL-6의 mRNA발현 효과를 분석하였다. iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β and IL-6의 발현은 LPS 처리 군과 비교하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 CCGRT는 염증매개물질 발현 저해를 통한 항염증 효능이 있음을 나타냈다(Fig. 4).

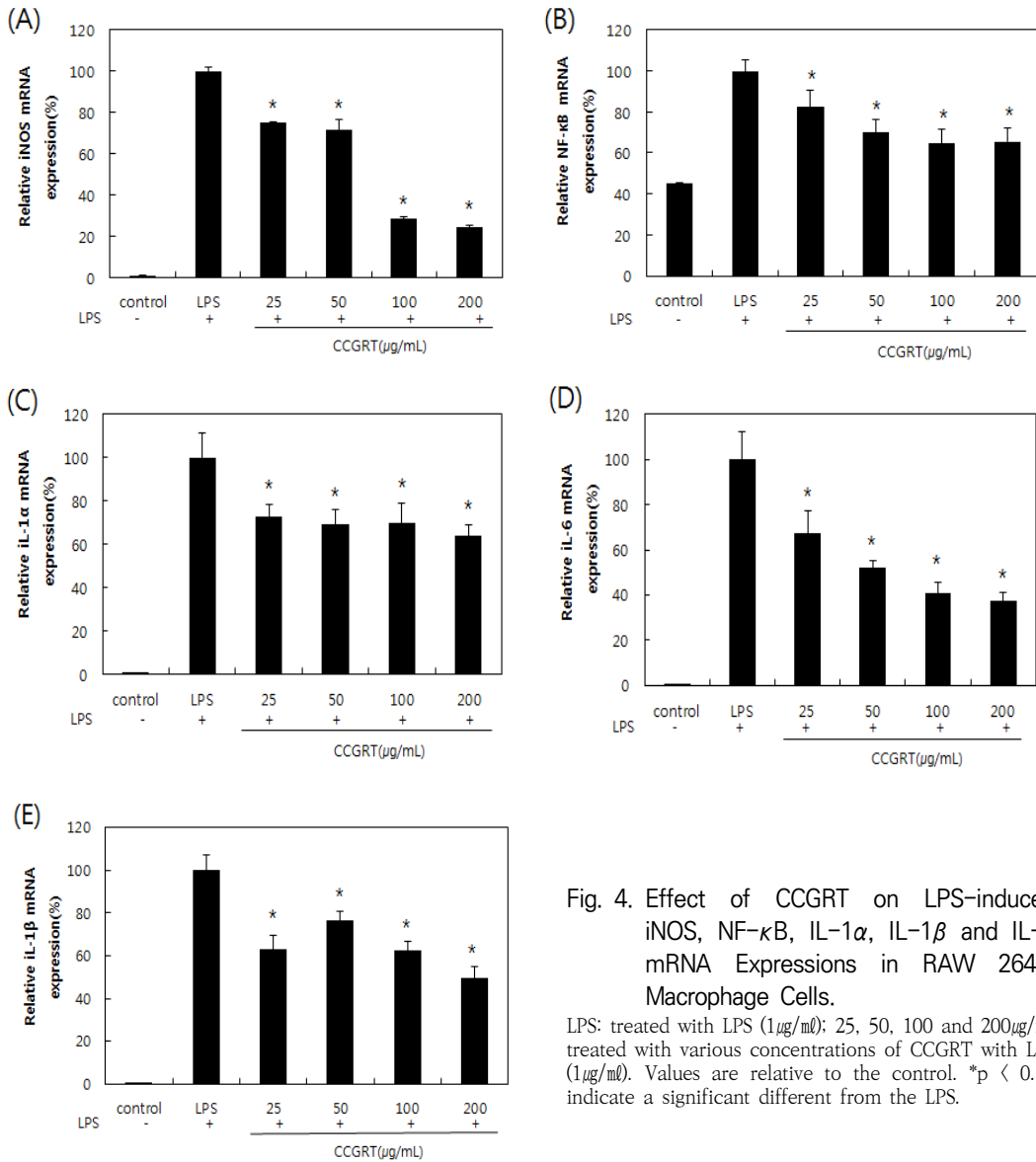


Fig. 4. Effect of CCGRT on LPS-induced iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β and IL-6 mRNA Expressions in RAW 264.7 Macrophage Cells.

LPS: treated with LPS (1 μ g/ml); 25, 50, 100 and 200 μ g/ml: treated with various concentrations of CCGRT with LPS (1 μ g/ml). Values are relative to the control. *p < 0.05 indicate a significant different from the LPS.

5. DPPH radical 소거능

CCGRT의 의한 free radical 소거능을 통하여 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH assay를 수행하였다. 또한 CCGRT를 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위로 처리한 군에서는 DPPH free radical 소거능이 $8.156 \pm 0.14\%$, $27.33 \pm 1.01\%$, $46.853 \pm 1.35\%$ 및 $72.532 \pm 2.69\%$ 로 나타났다. 이러한 결과 CCGRT의 농도 의존적인 free radical 소거능을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

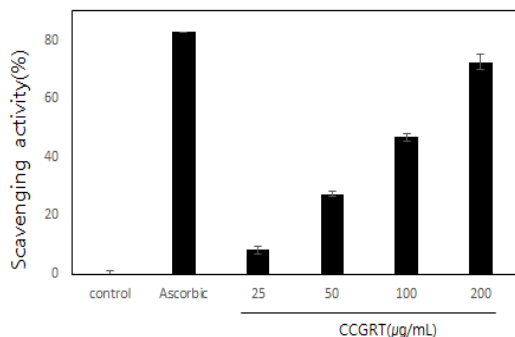


Fig. 5. DPPH Free Radical Scavenging Capability of Extract.

Ascorbic: treated with ascorbic acid (200 μm). 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$: treated with various concentrations of CCGRT.

IV. 고 찰

피부 염증반응은 생체조직에 물리작용이나 화학 물질, 세균 감염 등 어떠한 기질적 변화가 가해질 때, 이에 대해 방어할 수 있도록 다양한 작용 기전이 빠르게 활성화되는 숙주의 방어작용이다. 이러한 반응은 대식세포 (macrophage)에서 유도되는 면역반응에서 가장 중요한 반응으로 알려져 있다⁸⁾. 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 nuclear transcription factor-kappa B(NF- κ B)는 다양한 사이토카인 합성을 조절하는 전사 인자이다⁹⁾. NF- κ B는 핵 안으로 들어가 전사인자로서 작용하여 interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β) 등 염증관련

cytokine을 합성하고^{10,11)}, nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 다양한 염증성 매개물질들이 생성한다.

구체적으로 살펴보면, NO는 체내 방어 기능, 신호 전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있으며, 3종류 NOS인 neuronal nitric oxide synthase (nNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 합성 되고, 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다¹²⁾. iNOS는 외부 자극을 받으면 대식세포 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생산한다고 보고되고 있다¹³⁾. PGE₂는 혈관의 확장과 혈관 벽의 투과성을 높이고 염증부위로 면역세포들이 모이게 할 뿐만 아니라 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시킨다¹⁴⁾.

생화학적 산화 반응은 생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 끊임없이 일어나며 이 과정에서 항상 발생하는 활성산소를 생성하는데¹⁵⁾, 활성산소는 정상적인 대사과정에서도 소량씩 생성되며 세포 기능 유지에 필요한 물질이지만 환경오염이나 화학물질에 대한 노출, 스트레스, 비만 등에 의하여 생성량이 증가하거나 제거시스템의 기능이 약화되는 경우 활성산소가 세포 구성성분과 강하게 반응하여 세포와 조직에 손상을 가한다¹⁶⁾. 또한 활성산소에 의한 세포 외 조직의 지속적인 손상은 DNA 변성¹⁷⁾, 단백질 분해¹⁸⁾, 이온수송계 손상¹⁹⁾, 압²⁰⁾, 노화²¹⁾ 등을 초래하게 되며, 활성산소는 NF- κ B를 활성화시켜 여러 조직에서 iNOS, IL-1 그리고 IL-6 등의 염증 촉진물질들을 증가하게 한다^{22,23)}.

이러한 과정에 의해 다양한 만성 염증성 질환이 유발되는데, 현대 사회의 서구화로 인해 아토피성 피부염, 압, 당뇨병, 비만 등 다양한 만성 염증성 질환이 증가하고 있고 급격한 경제 성장으로 인한 삶의 질 향상 및 미에 대한 욕구와 웰빙(well-being) 문화가 확산되고 있는 추세에 따라 노화 방지와 활성산소 소거

능이 있는 항산화 물질 및 항염 작용을 갖는 생리활성 물질 등을 천연물이나 한약재에서 찾는 연구가 활발하게 이루어지고 있다²⁻⁶⁾.

본 연구에서 사용된 창출금련탕(蒼朮芩連湯)은 한의 학 고서인 《張氏醫通》에 수록되어 있는 처방 중에 하나로 약재는 창출(蒼朮), 황금(黃芩), 황련(黃連), 목향(木香), 지실(枳實), 반하(半夏), 시호(柴胡), 승마(升麻), 후박(厚朴), 길경(桔梗), 목통(木通), 감초(甘草), 천궁(川芎) 으로 구성되어 있으며, “治瘡癰濕熱”이라 하여 체내에 濕熱과 같은 山嵐瘴氣 및 外邪 등이 피부 사이에 침투함으로 인해 염증 질환 발생 시 정기를 보존하고 邪氣를 몰아내어 소염시키는 작용을 가진다⁷⁾.

구성 약재 중에서 균약으로 사용되는 창출은 박 등²⁴⁾에 의해 소염 및 항산화 활성 작용을 갖는 것으로 연구되었으며, 황금은 윤 등²⁵⁾이 LPS로 유도된 대식 세포의 cytokine과 염증 인자 생성을 유의하게 억제함을 보고하였고, 황련은 이 등²⁶⁾이 항염 효과를, 김 등²⁷⁾이 항산화 활성 효과를 보고한 바 있다. 또한 목향은 항염, 항균작용 및 iNOS 생성 억제 등으로 항산화 효능이 있음이 보고되었으며²⁸⁾, 길경은 김 등²⁹⁾의 연구에 의해 부종 억제를 통한 급성 염증에 항염 효과가 있음이 밝혀졌고, 감초 또한 박 등³⁰⁾의 연구에서 NO생성에 영향을 미쳐 항염증 효과가 있다고 보고된 바 있다. 이외에도 지실은 항균 및 항산화 효과^{31,32)}, 반하는 cytokine을 억제하는 항염 효과³³⁾, 시호는 염증성 대장염에 대한 치료 효과 등³⁴⁾이 보고되었고, 승마는 항알레르기 효과³⁵⁾, 후박은 항산화 및 항암 효과³⁶⁾, 목통은 항산화 및 항균 활성 효과³⁷⁾, 천궁은 항산화 및 항당뇨 활성 효과 등³⁸⁾을 가지는 것으로 연구된 바 있다.

이를 통해 창출금련탕은 균약인 창출을 비롯해 항염, 항균, 항산화 작용 등을 가진 여러 약재들로 구성되어 있다고 볼 수 있으나, 현재 이러한 항산화 활성 및 항염증 효과가 있다고 보고되어 온 약재로 구성된 창출금련탕에 대한 항염증 및 항산화 작용과 관련된 연구는 전무한 실정이다.

이에 저자는 CCGRT의 항염증 및 항산화 효과를 알아보기 위해서 세포 생존율에 미치는 영향, 항산화 활성에 미치는 영향, NO생성에 미치는 영향, PGE₂ 생성, realtime PCR을 통한 iNOS, NF-κB, IL-1α, IL-1β 및 IL-6 mRNA 발현량 등에 대해 실험하였다.

실험에 앞서 CCGRT의 세포독성 평가를 위해 RAW 264.7 대식세포의 생존율을 측정하였다. RAW 264.7 대식세포의 생존율 측정에서 CCGRT 25, 50, 100 및 200μg/ml농도 별로 처리한 결과 모두 대조군과 비교하여 세포 생존율에 유의한 차이가 없었다 (Fig. 1). 따라서 CCGRT는 200μg/ml의 농도까지 RAW 264.7 대식세포에서 통계학적으로 유의한 독성이 없음을 확인하였다(p<0.05).

CCGRT의 항염증 효과를 입증하기 위하여 NO 생성, PGE₂ 생성에 미치는 효과를 조사하였다. NO 생성 실험결과 LPS를 처리한 군은 대조군에 비해서 유의하게 증가하였고 (p<0.05), CCGRT 200μg/ml는 LPS처리 군과 비교하였을 때 약 35% 감소하였다 (Fig. 2). PGE₂의 생성 또한 CCGRT는 LPS 처리 군에 비해서 약 19% 감소하였다(Fig. 3).

위의 사실을 기초로 하여 NO의 생성 저해 기전을 알아보기 위한 realtime PCR을 수행하였다. iNOS, NF-κB, IL-1α, IL-1β 및 IL-6 mRNA발현을 분석한 결과 iNOS 발현억제는 NO의 생성억제와 유사한 경향을 보였으며, NO의 생성억제는 iNOS의 발현저해에 기인하여 나타난 것임을 알 수 있었다. NF-κB, IL-1α, IL-1β 그리고 IL-6의 발현은 또한 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

CCGRT의 항산화 효과를 입증하기 위하여, DPPH 소거 활성을 조사하였다. 본 실험에서는 DPPH시약을 사용하여 CCGRT를 25, 50, 100 및 200μg/ml 농도 별로 항산화 효과를 측정된 결과, CCGRT의 농도 의존적으로 높은 활성을 보여 항산화 효과가 뛰어난 것을 확인하였다(Fig. 5).

이상의 결과는 CCGRT가 LPS 유도성 염증 모델에 있어서 항염증 효과가 있었고, 또한 DPPH 소거 활성

을 통해 항산화 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 CCGRT를 항후 급성 또는 만성 염증성 피부 질환에 활용할 수 있을 것으로 판단되나, 본 연구에서는 CCGRT가 어떠한 기전으로 항염증 및 항산화 효과를 발휘하였는지에 대해서는 밝히지 못하였기에 차후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증반응에 대한 CCGRT의 항염증 및 항산화 작용을 규명하기 위해 CCGRT의 NO, PGE₂ 생성조절 및 DPPH free radical 소거능, realtime PCR에 대한 영향을 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CCGRT는 RAW264.7 대식세포에서 MTT에 의한 세포독성을 관찰한 결과 25-200 μ g/ml에서 세포독성이 없었다.
2. NO, PGE₂ 생성을 측정된 결과 CCGRT는 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NO생성과 PGE₂ 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.
3. LPS에 의해 유도된 iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β 그리고 IL-6 mRNA 발현 또한 유의하게 감소시켰다(p < 0.05).
4. DPPH free radical 소거능을 관찰한 결과 CCGRT의 농도가 높아질수록 높은 항산화 효과가 나타났다.

이상의 실험결과 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 NO, PGE₂ iNOS, NF- κ B, IL-1 α , IL-1 β 그리고 IL-6를 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 확인되었으며, 또한 DPPH free radical을 감소시킴으로써 항산화 효과를 내었다.

*이 논문은 세명대학교 석사학위 졸업논문임.

ORCID

- Hea Ryeon Won
(<https://orcid.org/0000-0001-7407-8140>)
- Hye Su Park
(<https://orcid.org/0000-0003-2430-532X>)
- Ee Hwa Kim
(<https://orcid.org/0000-0003-0400-9056>)
- Yong Min Kim
(<https://orcid.org/0000-0002-3064-9412>)

References

1. Lee JY, Yoo DH, Joo DH, Kim SR, Jo HS, Joo SH, et al. Anti-inflammatory effects of *amelanchier asiatica* fruits ethanol extract. J Soc Cosmet Sci Korea. 2017;43(1):19-26.
2. Yoon JM, Kim DI, Lee JH, Han SJ, Kim HE, Kim HJ, et al. Study on Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activity of Eggplant-cheongyeolsodokum. J Soc Cosmet Sci Korea. 2017;43(2):125-35.
3. Jeong SI, Kim HS, Jeon IH, Kang HJ, Mok JY, Cheon CJ, et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from *Perilla frutescens*. KOREAN J FOOD SCI TECHNOL Korea. 2014;46(1):87-93.
4. Oh HK. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Eugenia caryophyllata* Thunb. J Korean Soc Food Cult Korea. 2016;31(5):481-8.
5. Yi MR, Kang CH, Bu HJ. Antioxidant and anti-inflammatory Activity of extracts from kohlrabi(*Brassica Oleracea* var. *Gonglodes*). J of Korean Oil Chemists' Soc Korea. 2017;

- 34(2):189-202.
6. Yi MR, Jeon AL, Kang CH, Bu HJ. Antioxidant, Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities of Essential Oil from *Erigeron annuus* L. Flower. J of Korean Oil Chemists' Soc Korea. 2016; 33(4):717-25.
 7. Jangro. Jangssiuitong. Iljunga. Seoul, p.495, 1992.
 8. Kim MK, Kim DY. Anti-inflammatory effect of barley leaf ethanol extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage. Korean J Food Preserv. 2015;22(5):735-43.
 9. Lee HN, Kim JK, Kwon GT, Shim JH, Kim JD, Park HY. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from bark of *acer barbinerve* Maxim. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2012;49(9):1242-7.
 10. Ghosh S, Hayden HS. New regulators of NF- κ B in inflammation. Nat Rev Immunol. 2008;8:837-48.
 11. Jeong DH, Kang BY, Kim KBWR, Kim MJ, Ahn DH. Anti-inflammatory activity of *Sargassum micracanthum* water extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2014;57(3): 227-34.
 12. Won SJ, Park HJ, Lee KT. Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by salidroside through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 cells. Korean J Pharmacogn. 2008;30(12):110-7.
 13. Lee KH, Yoon WH. Effect of protein-bond polysaccharide isolated from *Acanthopanax senticosus* in reducing the toxic effect of cisplatin. Korean J Pharmacogn. 2007;38 (2):1-17.
 14. Choi WS, Kwon HS, NO RH, Choi GP, Lee HY. Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*. J Soc Cosmet Sci Korea. 2013;39(4):303-11.
 15. Kim DH, Park SR, Debnath T, Hasnat A, Pervin M, Percin M, et al. Evaluation of the antioxidant activity and anti-inflammatory effect of *Hericium erinaceus* water extract. Kor J Med Crop Sci. 2013;21(2):112-7.
 16. Kim SH, Choi JH, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. Cytoprotective effect of antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. Korean J Food Sci Technol. 2008;40(6):696-701.
 17. Wakamatsu TH, Dogru M, Ayako I, Takano Y, Matsumoto Y, Ibrahim OM, et al. Evaluation of lipid oxidative stress status and inflammation in atopic ocular surface disease. Mol Vis. 2010;16:2465-75.
 18. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutr. 2002;18: 872-9.
 19. Kastle M, Grune T. Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system. Curr Pharm Des. 2011;17:4007-22.
 20. Fridovich I. Superoxide dismutases: An adaptation to a paramagnetic gas. J Biol Chem. 1989;264(14):7761-4.
 21. Shon MS, Song JH, Kim JS, Jang HD, Kim GN. Anti-oxidant activity of oil extracted from Korean Red Ginseng and its moisturizing function. Kor J Aesthet

- Cosmetol. 2013;11(3):489-94.
22. Boden G. 45Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18(2):139-43.
 23. Park HR, Kim KY. Inhibition effect of TNF- α , IL-1 α production and TNF- α , IL-1 α mRNA expression from *chenopodium album* ethanol extract. *J Korean Soc Cosmetol.* 2017;23(5):971-7.
 24. Park MH, Kim MR. Analysis of Antioxidant Activity and Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines of Extracts from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum* Mycelium. *Korean J Food Nutr Korea.* 2017;30(3):454-63.
 25. Yoon SB, Han HS, Lee YJ. Effect of *Scutellariae Radix* extract on the proinflammatory mediators in RAW 264.7 cells induced by LPS. *Kor J Herbology.* 2011;26(2):75-81.
 26. Lee JW, Han HS, Lee YJ. Anti-inflammatory Effects of *Coptidis Rhizoma* Extract. *Kor J Herbology Korea.* 2014;29(5):83-90.
 27. Lee YJ, Lee MJ, Park JW, Kim JK, Choi DY, Kim CH. Antioxidant Activity of Water-Extrat from *Coptis chinensis* Franch. *Korean Journal of Life Science.* Korea. 2000;10(3):241-6.
 28. Song JW, Min KJ, Cha CG. Antioxidative and Antitumor Activity of Extracts from *Saussurea lappa*. *J Env Hlth Sci.* 2008; 34(1):55-61.
 29. Kim SY, Lee EB, Jeong EJ. Anti-inflammatory action of the fractions of *platycodi radix*. *Kor J Food Nutr.* 2009;22(4):618-24.
 30. Bak JP, Son JH, Kim YM, Lee EY, Leem KH, Kim EH. Suppression of inflammatory macrophage response *Glycyrrhiza Uralensis herbal acupuncture* extract. *Kor J Acupuncture.* 2011;28(4):49-58.
 31. Yang HO, Oh HJ, Park NK, Choi EY, Lee HO, Yang EY, et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of the Extract of *Poncirus trifoliata*. *Kor J Oriental Preventive Medical Society.* 2000;4(2):235-41.
 32. Ryu JY, Cho HK, Yoo HR, Seol IC, Kim YS. The Effects of *Artemisiae Iwayomogii Herba*, *Curcumae Radix*, and *Aurantii Fructus Immaturus* Complex Extract (ACA) on Dyslipidemia-related Factor Expression and Anti-oxidation in HepG2 Cells. *J Int Korean Med.* 2017;38(3):367-75.
 33. Song JJ, Park YC. Effects of *Pinelliae Rhizoma* on immunocyte and cytokine production in asthma model mouse. *Korean J Orient Int Med.* 2005;26(1): 156-68.
 34. Cho SW, Kim YK. Studies on Protective Effect of *Bupleurum falcatum* Extract (SHI-1909) against Experimental Inflammatory Bowel Disease Model. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society.* 2009;10(3):613-9.
 35. Jung HS, Kang KH, Choi YH, Choi BT, Lee YT. Anti Allergic Effects of *Cimicifuga Racemosa* on Allergic Models. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2006; 20(2):404-9.
 36. Shon MY. Antioxidant and Anticancer Activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* Fermented with Mycelial Mushrooms. *Food Industry and Nutrition.*

2007;12(2):51-7.

37. Kim JG, Kang YM, Eum GS, Ko YM, Kim TY. Antioxidative Activity and Anti-microbial Activity of Extracts from medicinal plants(*Akebia quinata* Decaisn, *Scirusfluviatilis* A. Gray, *Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* Makino). *J Agriculture & Life Sciences*. 2003;37(4):69-75.
38. Yong SE, Park PS, Lim JM, Kwon HJ, Choi JH, Choi YH, et al. Studies on Antioxidant and Antidiabetic Effects of Fermented *Cnidium officinale* Makino. *Kor J Herbology*. 2011;26(4):109-13.