

# 桂枝甘草湯 추출물의 抗炎症 효과에 대한 연구

김태연 · 조나영\*

세명대학교 한의과대학

## Studies on Anti-inflammatory Effects of *Gyejigamcho-tang* Extracts

Tae Yeon Kim, Na Young Jo\*

College of Korean Medicine, Semyung University

*Gyejigamcho-tang* (GG) is documented as a treatment for abnormal heart palpitations in Korean medicine. In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of a water extract of GG on lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. We first measured the levels of nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), which are key products involved in inflammatory processes. Additionally, we assessed the levels of enzymes, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), and cytokines, including interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and interleukin 1 beta (IL-1β). Our results showed that GG suppressed the production of NO and PGE<sub>2</sub> in a dose-dependent manner and reduced both the protein levels and mRNA expression of iNOS and COX-2. Furthermore, GG decreased the mRNA expression of IL-6, TNF-α, and IL-1β. In conclusion, GG demonstrated the ability to reduce the production of LPS-induced inflammatory factors, suggesting its potential for clinical research into the treatment of inflammatory diseases.

keywords : Gyejigamcho-tang (GG), Anti-inflammatory, Inflammatory factor, NO, PGE<sub>2</sub>

### 서론

염증(inflammation)은 화학적 또는 물리적 손상에 대한 생물체의 반응으로, 급성 염증과 만성 염증으로 나눌 수 있다. 이 중 만성 염증은 외부 위험이 없는 경우에도 지속적으로 염증 세포를 보내는 특징이 있어 지속적인 숙주 조직 손상으로 이어지게 되며, 그 결과로 심혈관 질환, 동맥경화증, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 신경 퇴행과 같은 다양한 병리학적 상태가 발생할 수 있다<sup>1)</sup>. 세계보건기구(WHO)에 따르면, 현재 인류 건강에 가장 큰 위협은 만성 질환으로 전 세계적으로 5명 중 3명이 뇌졸중, 만성 호흡기 질환, 심장 질환, 암과 같은 만성 염증성 질환으로 사망한다<sup>2)</sup>.

현재 염증 치료에 사용되고 있는 약물에는 비타민 A·비타민 C·비타민 D·아연과 같은 식품 보충제, 아스피린·인도메타신·이부프로펜·케토프로펜·플루비프로펜·디클로페낙과 같은 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs), 스테로이드 주사 등이 있다. 하지만 비스테로이드성 항염증제의 뛰어난 항염증 효과는 위장의 궤양·천공·폐쇄·출혈과 같은 심각한 부작용을 동반하며, 코르티코스테로이드 주사의 경우 혈당 상승·피부 변색 뿐만 아니라 면역 억제·연골 손상·인대 약화·골다공증 등의 잠재적 위험을 초래할 수 있어 연간 3~4회로 사

용이 제한되므로<sup>3,4)</sup>, 우수한 항염증 효과와 만족스러운 내약성(tolerability)을 가진 대체 치료법을 탐색하고, 염증 관련 질환에 대한 효과적인 장기 전략을 개발하는 것이 필요하다.

桂枝甘草湯(*Gyejigamcho-tang*, GG)은 發汗過度로 인해 心臟의 陽氣가 虛損되어 발생한 心悸를 치료하는 처방<sup>5)</sup>으로 『傷寒論』에서 처음 언급되었으며, 임상에서는 부정맥 관련 질환에 활용된다<sup>6)</sup>. GG는 桂枝와 甘草로 구성되어 있는데, 전통적으로 桂枝는 發汗解肌·溫經通脈·助陽化氣하여 風寒感冒·關節痠痛 등을 치료하며, 甘草는 和中緩急·潤肺·解毒·調和諸藥하는 효능으로 생용 시 咽喉腫痛, 消化性潰瘍, 癰疽瘡瘍 등을 치료하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 현대적으로 桂枝는 진정, 진통, 해열, 소염, 항균, 항바이러스, 항암, 건위, 강심, 이뇨, 지해의 약리활성을 가진 것으로 알려져 있으며<sup>8)</sup>, 甘草의 경우에도 항궤양, 항암, 항균, 항바이러스, 항당뇨, 항알러지, 항혈전, 항염증 효과가 확인되어<sup>9)</sup> 桂枝와 甘草 모두 항염증제로의 개발 가능성이 확인되었다. 그러나 GG에 대해서는 네트워크 약리학 방법을 통해 심부전 치료 매커니즘을 분석한 연구<sup>10)</sup>와 혈압 및 심박동수 상승, 항혈전 효과에 대한 연구<sup>11)</sup>와 같이 심장기능과 연관된 GG의 전통적인 효능을 과학적으로 객관화하는 연구만 진행되었을 뿐 항염증 효과 및 그 기전을 확인하는 연구는 진행되지 않았다.

\* Corresponding author

Na Young Jo, College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, 27136, Korea

E-mail : cswcny2@hanmail.net Tel : +82-43-649-1825

Received : 2025/02/18 Revised : 2025/04/21 Accepted : 2025/04/21

© 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.2025.04.39.2.47

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

따라서 본 저자는 염증반응을 나타내는 다양한 질환에 손쉽게 적용 가능할 것으로 사료되는 GG의 효과를 증명하기 위하여, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포가 부착된 웰 플레이트(well plate)에 GG를 먼저 처리한 후, 염증 유발원인 리포다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 염증반응을 촉진하여 염증매개인자인 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 생성, 전구염증매개효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 단백질 생성과 mRNA 활성화, 염증인자인 사이토카인의 mRNA 활성을 확인하여, 유의미한 결과를 얻어 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 제조

GG 5첩 분량(90 g, Table 1)은 세명대학교 부속 한방병원에서 구매하였다. 시료를 세척한 뒤 900 mL의 증류수를 넣고 2시간 동안 전탕하여 유효 물질을 추출하였다(Table 1). GG 열수추출액은 원심분리기를 사용하여 고형물을 침전시켜 제거하였고, 감압농축기를 사용하여 100 mL가 될 때까지 감압 농축한 뒤, -70°C 냉동고에서 동결시켰다. 이후 동결건조기를 사용하여 8일의 건조과정을 거쳐 최종적으로 GG 열수추출물을 획득하였으며, 해당 시료는 -20°C에서 보관하였다가 실험 시작 전 생리식염수에 용해하여 사용하였다.

Table 1. Composition of Gyejigamcho-tang

Korean name (Chinese name)	Pharmacognostic name	Weight (g)
Gye Ji (Gui Zhi)	Cinnamomi Ramulus	60
Gam Cho (Gan Cao)	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	30
	Total amount	90

All constituent drugs were purchased at Semyung university Korean medicine hospital (Jecheon, Republic of Korea). That sold by OmniHurb(Uiseong, Republic of Korea) were produced in China.

### 2. 세포 배양

RAW 264.7 세포는 세명대학교 황형서 교수님으로부터 분양받았으며, 돌베코 변형 이글 배지에 페니실린-스트렙토마이신과 우테아 혈청을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양시켰다. 세포는 2~3일에 한 번씩 계대 배양함으로써 증식으로 인한 과밀도 현상이 발생하지 않도록 하였다.

### 3. MTT assay

$4 \times 10^5$  개/mL의 밀도로 희석된 RAW 264.7 세포를 500  $\mu$ L씩 24웰 세포 배양 플레이트에 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 다음날, 0, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu$ g/mL 농도의 GG 희석 배지를 제작하여 4웰씩 동일 농도의 배지로 교환하고 1시간 동안 재차 배양한 후, 배지 내 농도가 최종 1  $\mu$ g/mL가 되도록 LPS를 처리한 다음 하루 동안 추가 배양하였다. 5 mg/mL 농도의 Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약을 100  $\mu$ L씩 각 웰에 넣고 보라색의 포마잔이 생성되도록 4시간 동안 배양하였다. 그 후 각 웰의 배지를 제거하고, 500  $\mu$ L Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣은 뒤 포마잔이 잘 녹도록 40분

동안 교반하였다. 그 후 포마잔이 녹은 DMSO를 50  $\mu$ L씩 새로운 96웰 세포 배양 플레이트에 옮겨 담아 570 nm 조건의 마이크로플레이트 리더에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. NO assay

$4 \times 10^5$  개/mL의 밀도로 희석된 RAW 264.7 세포를 2 mL씩 6웰 세포 배양 플레이트 3판에 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 다음날, 0, 100, 200, 400, 800  $\mu$ g/mL 농도의 GG 희석 배지로 교환하고 1시간 동안 재차 배양한 후, 배지 내 농도가 최종 1  $\mu$ g/mL가 되도록 LPS를 처리한 다음 16시간 동안 추가 배양하였다. 그 후 새로운 96웰 세포 배양 플레이트에 세포가 없는 배지 상등액을 웰당 100  $\mu$ L씩 떠서 넣은 뒤, NO 측정 키트(Intron Biotechnology, Korea)의 설명서대로 A, B 시약을 각각 50  $\mu$ L씩 넣고 540 nm 조건의 마이크로플레이트 리더에서 흡광도를 측정하였다. 동일 플레이트에 넣은 Nitrite standard의 농도별 흡광도 수치를 바탕으로 표준용량곡선을 작성하고 최종적으로 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 농도를 산출하였다.

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

$4 \times 10^5$  개/mL의 밀도로 희석된 RAW 264.7 세포를 2 mL씩 6웰 세포 배양 플레이트 3판에 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 다음날, 0, 100, 200, 400, 800  $\mu$ g/mL 농도의 GG 희석 배지로 교환하고 1시간 동안 재차 배양한 후, 배지 내 농도가 최종 1  $\mu$ g/mL가 되도록 LPS를 처리한 다음 하루 동안 추가 배양하였다. 그 후 세포가 없는 배지 상등액을 수거하여 PGE<sub>2</sub> 검사 키트(R&D systems, USA)의 설명서대로 처리한 후 450 nm 조건의 마이크로플레이트 리더에서 흡광도를 측정하였다. 동시에 측정된 PGE<sub>2</sub> standard의 흡광도 수치를 바탕으로 표준용량곡선을 작성하고 최종적으로 PGE<sub>2</sub>의 농도를 산출하였다.

### 6. Western blot

$4 \times 10^5$  개/mL의 밀도로 희석된 RAW 264.7 세포를 10 mL씩 100 mm 디쉬 12개(군당 3개씩)에 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 다음날, 400, 800  $\mu$ g/mL의 농도의 GG 희석 배지로 교환하고 1시간 동안 재차 배양한 후, 배지 내 농도가 최종 1  $\mu$ g/mL가 되도록 LPS를 처리한 다음 하루 동안 추가 배양하였다. 그 후 세포를 수거하여 단백질을 추출 정량한 후 각각 20  $\mu$ g의 단백질을 Mini-PROTEAN TGX™ precast gel (Bio-Rad Laboratories, USA)로 분리한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(Bio-Rad Laboratories, USA)으로 이송 하였다. 그 후 10% 탈지유에 니트로셀룰로오스 멤브레인을 담가 1.5시간 동안 blocking 한 뒤, Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T)에 각각 1 : 1500, 1 : 1500, 1 : 5000으로 희석한 iNOS, COX-2,  $\beta$ -actin의 1차 항체를 16시간 동안 부착시킨 뒤, TBS-T에 1 : 5000으로 희석된 HRP-conjugated 2차 항체를 1시간 동안 부착시켰다. 이후 EZ-Western 검사 키트 (Dogen, Korea)의 설명서대로 처리한 후, Fusion FX(vilber, France)의 웨스턴이미지분석시스템으로 분석하였다.

7. Real-time PCR

4 × 10<sup>5</sup> 개/ml의 밀도로 희석된 RAW 264.7 세포를 10 ml씩 100 mm 디쉬 12개(군당 3개씩)에 분주한 후 하루 동안 배양하였다. 다음날, 400, 800 µg/ml의 농도의 GG 희석 배지로 교환하고 1시간 동안 재차 배양한 후, 배지 내 농도가 최종 1 µg/ml가 되도록 LPS를 처리한 다음, 추가로 6시간 동안 배양하였다. 염증 관련 사이토카인의 mRNA 발현량을 비교하기 위하여 RNeasy protect mini kit (Quagen, Germany)를 사용하여 total RNA를 추출한 뒤, AccuPower RT Primix (Bioneer, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 1/10로 희석한 후 QGreenBlue 2X qPCR Master Mix (CellSafe, Korea)와 염증 관련 사이토카인의 primer (Table 2)를 사용하여 real-time PCR을 시행하였다. 유전자별 mRNA 발현량은 Applied Biosystems (USA)의 QuantStudio™ Design & Analysis Software를 이용하여 실시간으로 분석하였다.

Table 2. The Primer for Real-time PCR Analysis

Gene name	Strand	Oligonucleotide sequences(5' to 3' direction)
iNOS	Sense	GGAGAGATCCGATTTAGAG
	Antisense	TCAGACTTCCCTGTCTCAGTA
COX-2	Sense	GGACTCACTCAGTTTGTGAG
	Antisense	TATTTTCATCTCTGCTCTGG
TNF-α	Sense	CCTCCCTCTCATCAGTTCTAT
	Antisense	CCACTAGTTGGTTGCTTTGA
IL-1β	Sense	CCTGTCCTGTGTAATGAAAGA
	Antisense	CCACTTTGCTCTTGACTTCTA
IL-6	Sense	GTTCTCTCTGCAAGAGACTT
	Antisense	CCGACTTGTGAAGTGGTATAG
GAPDH	Sense	CATTGACCTCAACTACATGGT
	Antisense	ATTTGATGTTAGTGGGGTCTC

8. 통계분석

각 결과값은 means ± standard deviation으로 표시하였으며, Student's t-test를 진행한 후 p < 0.05인 것을 통계적 유의성을 가지는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 桂枝甘草湯의 세포독성

MTT assay를 실시하여 GG의 대식세포 증식 저해 여부를 확인하고자 GG 무처리군의 흡광도 평균을 100% 세포 생존율로 설정하고 GG 처리군들의 흡광도 평균을 비율화하였다. 0, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml의 농도인 GG 처리군들의 세포 생존율은 100.0 ± 11.7%, 105.0 ± 19.7%, 101.1 ± 15.9%, 100.8 ± 15.6%, 105.9 ± 14.4%, 107.5 ± 17.4%로, GG 처리군 모두 무처리군과 비교하여 통계적 유의성을 보이지 않았다.

2. 桂枝甘草湯의 NO 생성 및 iNOS 발현 변화

무처리군(GG & LPS untreated)의 NO 생성량은 8.23 ± 0.47

µm이었으며, 대조군(LPS alone)의 경우에는 38.77 ± 1.20 µm이었다. GG가 100, 200, 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군(GG & LPS treated)의 NO 생성량은 각각 29.85 ± 0.99, 24.58 ± 0.82, 20.87 ± 1.08, 12.98 ± 1.08 µm로 대조군과 비교하여 모두 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 2a).

GG의 NO 생성 저해 효과가 iNOS와 관계되는지를 확인하기 위하여 iNOS의 단백질 및 mRNA 발현을 관찰하였다. 대조군의 iNOS 단백질 생성량을 기준으로 실험군의 상대적인 생성량을 관찰한 결과, 무처리군의 경우에는 iNOS 단백질이 6.0 ± 0.00%로 관찰되었으며, GG가 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군의 iNOS 단백질 생성량은 100 ± 20.8%의 대조군과 비교하여 각각 10.1 ± 4.9%, 9.2 ± 3.3%로 모두 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 2b). iNOS mRNA의 상대적 발현은 대조군의 발현값 평균을 1로 설정한 후, 무처리군과 GG가 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군의 발현값을 확인한 결과, 각각 0.001 ± 0.0, 0.342 ± 0.13, 0.231 ± 0.08로 모든 실험군에서 농도 의존적으로 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 2c).

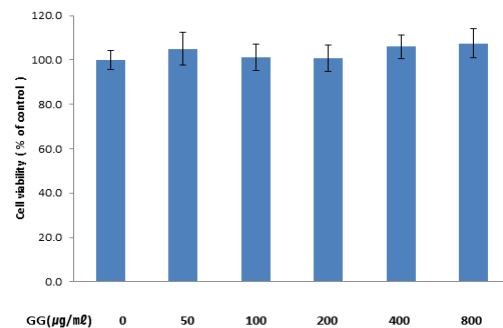
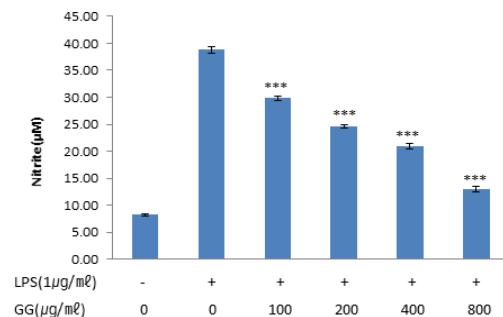
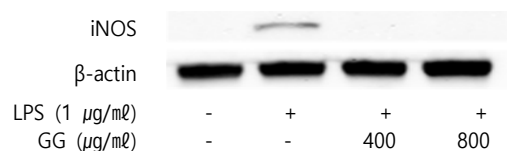


Fig. 1. Effects of GG on the viability of RAW 264.7 cells. Cells were treated with GG extracts at concentrations of 50, 100, 200, 400, and 800 µg/ml for 24 hours. The number of viable cells was determined using the MTT assay. Results are expressed as means ± standard deviation of quadruplicate experiments. No significant differences were observed between the non-treated group and the GG extract-treated groups.

(a)



(b)



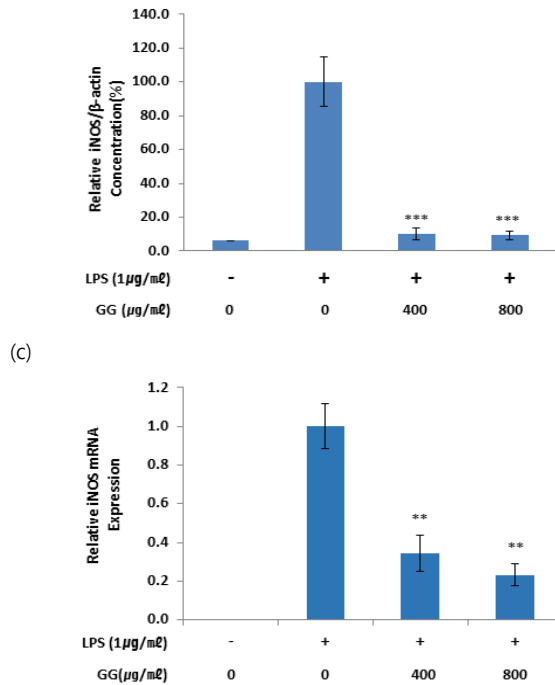


Fig. 2. Impact of GG on LPS-induced NO production and iNOS protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were simultaneously exposed to GG extracts (100, 200, 400, and 800 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 24 hours. NO concentrations in culture supernatants were determined by the Griess reaction. (b) Cells were co-treated with GG extracts (400 and 800 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 24 hours. Total iNOS proteins were extracted and analyzed via Western blot. (c) Cells were treated concurrently with GG extracts (400 and 800 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 6 hours. The mRNA level of iNOS was assessed using real-time PCR. GAPDH served as an internal control for real-time PCR. Results are expressed as means ± standard deviation of triplicate experiments (\*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 vs. the LPS-alone treated group).

### 3. 桂枝甘草湯의 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현 변화

무처리군(GG & LPS untreated)의 PGE<sub>2</sub> 생성량은 222.4 ± 147.5 pg/ml이었으며, 대조군(LPS alone)의 경우에는 1705.2 ± 277.2 pg/ml이었다. GG가 100, 200, 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군(GG & LPS treated)의 PGE<sub>2</sub> 생성량은 각각 1514.1 ± 395.4, 555.6 ± 253.4, 271.6 ± 146.0, 185.0 ± 109 pg/ml로 대조군과 비교하여 GG가 200, 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군에서 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 3a).

GG의 PGE<sub>2</sub> 생성 저해 효과가 COX-2와 관계되는지를 확인하기 위하여 COX-2의 단백질 및 mRNA 발현을 관찰하였다. 대조군의 COX-2 단백질 생성량을 기준으로 실험군의 상대적인 생성량을 관찰한 결과, 무처리군의 경우에는 COX-2 단백질이 1.1 ± 0.0%로 관찰되었으며, GG가 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군의 COX-2 단백질 생성량은 100 ± 6.2%의 대조군과 비교하여 각각 78.0 ± 10.7, 64.1 ± 12.7%로 모두 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 3b). COX-2 mRNA의 상대적 발현은 대조군의 발현값 평균을 1로 설정한 후, 무처리군과 GG가 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군의 발현값을 확인한 결과, 각각 0.001 ± 0.0, 0.921 ± 0.085, 0.749 ± 0.09로 모든 실험군에서 농도 의존적인 감소가 확인되었으며, 특히 800 µg/ml의 실험군에서는 대조군과 비교하여

유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 3c).

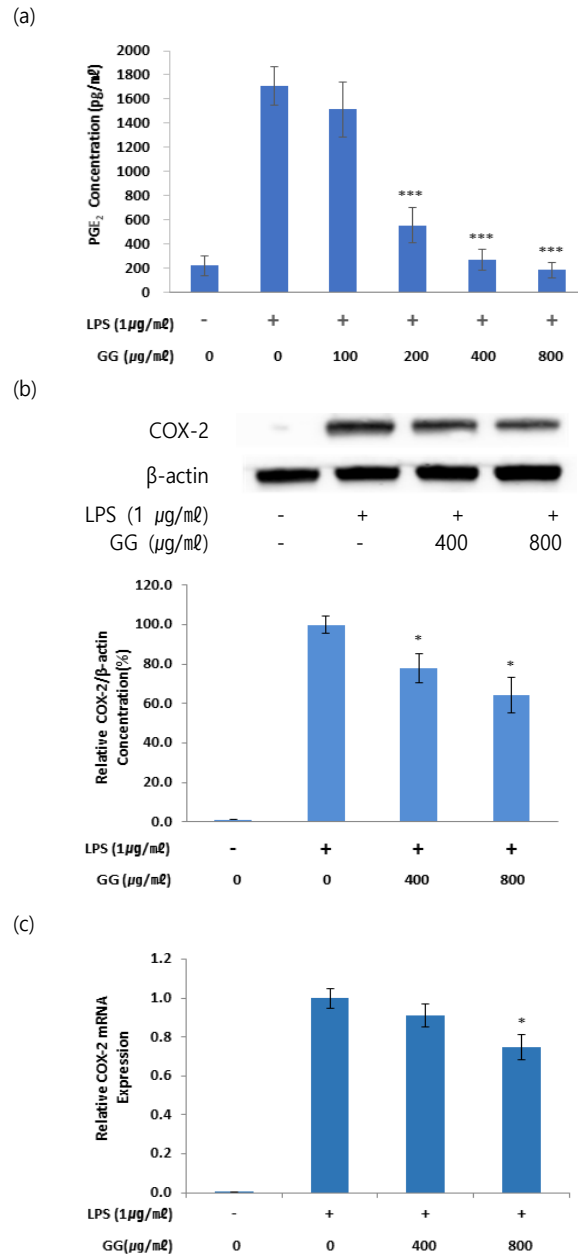


Fig. 3. Impact of GG on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (a) Cells were simultaneously exposed to GG extracts (100, 200, 400, and 800 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 24 hours. PGE<sub>2</sub> concentrations in culture supernatants were quantified using ELISA. (b) Cells were co-incubated with GG extracts (400 and 800 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 24 hours. Total COX-2 proteins were extracted and analyzed via Western blot. (c) Cells were treated concurrently with GG extracts (400 and 800 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 6 hours. The mRNA expression of COX-2 was assessed using real-time PCR. GAPDH served as an internal control for real-time PCR. Results are expressed as means ± standard deviation from triplicate experiments (\* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 vs. the LPS alone treated group).

### 4. 桂枝甘草湯의 TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 발현 저해

GG가 대식세포에서의 pro-inflammatory 사이토카인 발현에 관계되는지를 확인하기 위하여 real-time PCR 실험을 진행하였다.

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA의 상대적 발현은 대조군의 발현값 평균을 1로 설정한 후, 무처리군과 GG가 400, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리된 실험군의 발현값을 확인하였다.

TNF- $\alpha$  mRNA의 상대적 발현은 무처리군의 경우  $0.012 \pm 0.002$ , 실험군의 경우 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  또는 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각  $0.936 \pm 0.209$ ,  $0.760 \pm 0.115$ 로 농도 의존적인 감소가 확인되었고, 특히 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 실험군에서는 대조군과 비교하여 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 4a). IL-1 $\beta$  mRNA의 상대적 발현은 무처리군의 경우  $0.002 \pm 0.000$ , 실험군의 경우 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  또는 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각  $0.624 \pm 0.173$ ,  $0.484 \pm 0.064$ 로 대조군과 비교하여 농도 의존적이며 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 4b). IL-6 mRNA의 상대적 발현은 무처리군의 경우  $0.253 \pm 0.0049$ , 실험군의 경우 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  또는 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각  $0.586 \pm 0.298$ ,  $0.207 \pm 0.041$ 로 대조군과 비교하여 농도 의존적이며 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 4c).

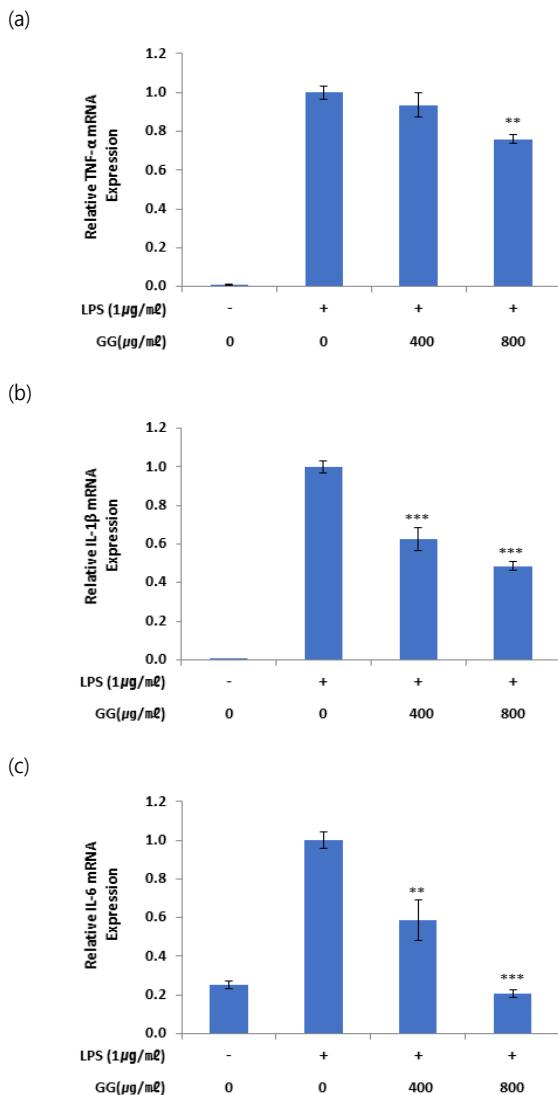


Fig. 4. Impact of GG on LPS-induced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 mRNA expression in RAW 264.7 cells. Cells were simultaneously treated with GG extracts (400 and 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 6 hours. The

mRNA levels of TNF- $\alpha$  (a), IL-1 $\beta$  (b), and IL-6 (c) were assessed using real-time PCR. GAPDH served as an internal reference for real-time PCR normalization. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation from triplicate experiments (\*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 vs. the LPS alone treated group).

## 고찰

桂枝甘草湯(*Gyejigamcho-tang*, GG)은 漢代 張仲景의 『傷寒論』에서 “發汗過多, 其人叉手自冒心, 心下悸欲得按者, 桂枝甘草湯主之.”이라 하여, 발한약을 복용한 후 흘린 땀의 양이 지나치게 많으며, 가슴이 두근거리며 불안하여 두 손을 교차시켜 자신의 심흉부를 누르는 증상을 치료하는 처방<sup>5)</sup>으로 기술되어 있다. 補益心陽의 효능을 가지고 있어 心陽虛로 인한 心悸를 치료하며<sup>5)</sup> 임상에서는 부정맥 관련 심장 질환에 활용되고 있으나<sup>10)</sup> 悸와 관련된 현대 질환의 범주에 동기능부전증후군·기외수축·심방세동·방실차단·서맥·빈맥 등에서 나타나는 부정맥, 동맥폐색·정맥혈전·관상동맥질환·혈관염·버거씨병과 같은 혈관 질환, 고혈압·저혈압 등의 혈압 이상과 그 외 심부전, 협심증, 심근경색, 심근염, 심근병증, 심낭삼출 등의 심장 질환 뿐만 아니라 우울증·신경증·불안신경증·심장신경증·갑상선기능저하증·갑상선기능항진증과 같이 심리 변화와 관련된 질환 및 약물중독, 빈혈, 발열 등도 포함되어 있으므로<sup>6)</sup> 실제로는 다양한 염증성 질환에도 폭넓게 활용 가능할 것으로 사료되는 처방이다. GG의 구성 약물은 桂枝, 甘草 2종으로 현대적으로 밝혀진 구성 약물들의 효능을 살펴보면, 桂枝(*Cinnamomi Ramulus*)는 활성 T세포의 IFN- $\gamma$  발현 억제를 통한 면역 조절 효과<sup>12)</sup>, LPS로 염증을 유발한 동물의 혈청 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 강하 및 IkB $\alpha$ 의 분해와 JNK, p38, ERK1/2의 활성 억제를 통한 항염증 효과<sup>13)</sup>, 혈전증과 고점도혈증 개선 효과<sup>14)</sup>, 혈액순환 개선 및 혈압강하 효과<sup>15)</sup>가 있는 것으로 밝혀졌으며, 桂枝를 포함한 혼합물의 항관절염 및 항염 효과<sup>16)</sup>, 혈소판응집 및 혈관신생 억제 효과<sup>17)</sup> 등이 확인되었다. 甘草(*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*)는 마늘의 갈변 저해 효과<sup>18)</sup>, 궤양성 대장염 억제 효과<sup>19)</sup>, 멜라닌 생합성에 관여하는 핵심 효소인 티로시나아제 활성 억제 효과<sup>20)</sup>, 항균 활성 및 방부 효과<sup>21)</sup>, 항산화 효과<sup>22)</sup>, 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포 보호 및 항염·항알레르기·항균 효과에 대한 연구<sup>23)</sup>들이 보고되었다.

이와 같이 GG의 개별 약물에 대한 연구에서 桂枝와 甘草 모두 항염증 효능을 가지고 있으므로, GG 또한 현대의학적으로는 항염증 효과를 가질 것으로 생각되어, RAW 264.7 세포를 이용하여 GG의 염증매개인자 및 전구염증매개효소의 분자생물학적 변화를 확인하는 본 실험을 진행하였다.

염증(inflammation)은 상처를 초래할 수 있는 자극에 대한 생체 방어 반응으로, 염증반응에서는 미소혈관 확장, 조직간극에 혈액성분 유출, 염증 부위로 백혈구 유주, 조직의 변성, 섬유화 등이 연쇄적으로 일어나게 된다. 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애의 5가지 증상이 나타나며 자유 라디칼, 리소좀 효소, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), 사이토카인 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다<sup>24)</sup>. 즉 세포에 염증반응을 일으킬 수 있는 외부 자극이 가해지면 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 등의 전염증성 사이토카인 발현이 유도되

고, 유도된 전염증성 사이토카인이 호중구를 활성화하여 염증 부위로 이동시키고, inducible nitric synthase (iNOS), cyclooxygenases-2 (COX-2)를 코딩하는 유전자의 발현을 자극함으로써 염증반응에 관여하는 nitric oxide (NO), PGE<sub>2</sub> 등의 염증매개물질을 생성하게 하여 염증반응이 일어나는 것이다<sup>25)</sup>.

이와 같은 염증매개물질이 과도하게 생산되면, 지나친 면역반응이 초래되어 각종 염증성 질환이 유발되고 악화된다. 특히 만성염증에서는 NOS, COX와 같은 효소 및 신호 단백질의 상승 조절 작용을 일으켜, NO와 prostaglandins (PGs)를 다량 생산하게 되고, 이는 다발성 경화증, 대장암 뿐만 아니라 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환의 병인이 된다. 따라서 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제하고, iNOS, COX-2 효소의 발현을 억제할 수 있는 약물을 발견한다면, 각종 염증성 질환 치료에 큰 도움이 될 것이다<sup>25)</sup>.

RAW 264.7 세포는 BALB/c 마우스 유래 대식세포 유사 세포주로, 다양한 약물들의 세포 유래 염증매개물질의 생성 및 염증 신호전달체계 조절 여부를 확인하는 항염증 실험의 기초 모델로서 염증 감소 효능 약물을 찾아내기 위하여 활용되고 있다<sup>26,27)</sup>. 본 연구에서 GG가 RAW 264.7 세포의 증식을 저해하는지 관찰한 결과, GG 처리군은 800 µg/ml 이하의 전 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

혈관 확장 및 조직 손상에 주로 관여하는 nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-Arginine으로부터 합성되는데, 3종류의 NOS 중 하나인 inducible NOS (iNOS)는 LPS나 사이토카인 등에 의해 대식세포가 활성화될 때 유도되어 NO 생성을 야기한다<sup>28,29)</sup>. NO 및 유도체들은 살균성을 가지고 있어서 감염에 대한 숙주의 방어적 매개체로 작용하지만, NO로부터 유래되는 자유 라디칼은 세포 독성을 초래하여 숙주에 손상을 초래한다<sup>30)</sup>. 본 연구에서 NO 생성에 대한 GG의 작용을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 GG를 처리한 실험군 모두에서 NO 생성 저해 효과가 유의성 있게 관찰되었으며, 또한 400, 800 µg/ml의 농도로 GG를 처리한 실험군에서 iNOS 단백질 생성 저하 및 iNOS mRNA 발현 억제 효과도 유의성 있게 관찰되었다.

혈관 및 전신의 염증반응에 관여하는 prostaglandins (PGs)는 arachidonic acid (AA) 대사물질로 cyclooxygenase (COX) 효소의 작용에 의해 합성되며 대식세포, 비만세포, 내피세포 및 다양한 세포들에서 분비된다. COX는 인체 내에서 항상 발현되는 COX-1과 다양한 염증 자극으로 유도되는 COX-2의 2종으로 존재하는데, 이 중 COX-2는 박테리아 독소, LPS, 사이토카인 등의 염증자극인자나 염증매개물질에 의해 촉진되어 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 과량 생산케 한다<sup>31-34)</sup>. 본 연구에서 PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 GG의 작용을 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 200, 400, 800 µg/ml의 농도로 GG를 처리한 실험군에서 PGE<sub>2</sub> 생성 저하 효과가 유의성 있게 확인되었으며, 400, 800 µg/ml의 농도로 GG를 처리한 실험군에서 COX-2의 단백질 생성 저하 및 mRNA 발현 억제 효과도 유의성 있게 확인되었다.

NO, PGE<sub>2</sub>와 더불어 염증반응에서 주요 세포유래 매개물질 중 하나인 사이토카인은 장시간의 세포 면역반응에 관여하는 폴리펩티드로 급성 및 만성 염증 모두에서 중요한 역할을 담당하고 있다.

급성 염증에서는 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1α, IL-1β, IL-6 등이, 만성 염증에서는 IL-12와 interferon-γ가 대표적인 사이토카인이다<sup>28,35)</sup>. 본 연구에서는 대식세포에서의 TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 발현 정도를 관찰하여, 염증성 질환에 대한 GG의 효능을 확인하고자 하였다.

실험 결과, TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA의 상대적 발현은 GG가 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군에서 농도 의존적으로 감소되었으며, TNF-α는 800 µg/ml, IL-1β와 IL-6는 400, 800 µg/ml의 농도로 처리된 실험군에서 유의성 있는 감소가 나타났다. 이는 GG가 염증반응에서 세포유래 매개물질의 생성에 관여하는 세포 내 신호회로를 조절하여 염증 억제 효능을 가진다는 것을 보여주는 것이다.

상기 결과들을 통해 GG는 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6의 활성을 감소시키고 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하는 항염증 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 한약재는 항염증 잠재력을 가진 화학 물질의 귀중한 원천으로 부작용이 거의 없거나 전혀 없어 민간에서뿐만 아니라 한의학에서 환자 치료를 위해 오랜 시간 동안 다양하게 활용되어 왔다. 특히 GG는 한방 처방에서 빈용되는 桂枝와 甘草 2가지 약재로 구성된 소방(小方)인 만큼, 약재 수급·조제·전탕이 용이하여 환자 내원 시 빠른 시간 내에 투약이 가능하므로 염증성 질환에 쉽고 빠르게 대처할 수 있고, 10가지 이상의 약재가 들어가는 대방(大方)과 비교해 비용적인 측면에서 장점이 있다. 따라서 GG의 항염증 효과는 경제적인 이점과 결합하여 효과적이면서도 접근 가능한 새로운 항염증 약물 및 다양한 기능성 제품의 개발 가능성을 시사하는 것으로 사료된다. 다만, GG의 유효 성분 분석 및 GG의 항염증 효과가 면역체계조절 및 염증 반응조절 등에 관련된 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자인 NF-κB의 신호 경로에 관여하는지에 대한 연구와 염증 및 암 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 입증된 Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 신호전달 경로의 조절에 따른 것인지에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 여겨지며, 항염증 효과가 밝혀진 다른 처방들과의 비교 연구 또한 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

GG의 항염증 효과를 확인하고자 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서의 항염 작용 실험을 수행한 결과로 다음과 같은 결론을 얻었다.

GG는 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제한다.

GG는 COX-2와 iNOS의 단백질 생산과 mRNA 발현을 저하시킨다.

GG는 TNF-α, IL-1β, IL-6의 mRNA 발현을 저하시킨다.

이러한 결과로 GG는 항염증 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2022학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

## References

1. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019;25:1822-32.
2. Rocha DHA, Pinto DCGA, Silva AMS. Macroalgae Specialized Metabolites: Evidence for Their Anti-Inflammatory Health Benefits. *Mar Drugs.* 2022;20(12):789.
3. Rebecca R, Doss A, Praveen RP, Satheesh S. Phytochemical and anti-inflammatory properties of green macroalga *Codium tomentosum*. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2022;45:102492.
4. Inotai A, Hankó B, Mészáros Á. Trends in the non-steroidal anti-inflammatory drug market in six Central-Eastern European countries based on retail information. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2010;19:183-90.
5. Textbook Compilation Committee of Pathology in Korean Medicine. *Pathology in Korean Medicine.* Yongin:Hanuimunhwasa;2019. p. 164.
6. Park MS, Kim YM. Study on Diseases Scope of Prescriptions Related with the Palpitation in 『Shanghanlun』. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2015;29(1):1-10.
7. Textbook Compilation Committee of Herbal Pharmacology. *Herbal Pharmacology.* 3rd ed. Seoul:Sinil books;2010. p. 155, 577.
8. Seoul:Jipmoon-dang;2001. p. 66-7.
9. Koo HS. Theoretical Review on Biopharmacological Efficacy of *Glycyrrhizae Radix*[master's thesis]. Busan:Dong Eui University;2005.
10. Zhao Y, Zhao X, Zhu Q, Zhu B, Zhang Z, Chen J. Therapeutic mechanism of Guizhi Gancao Decoction for heart failure: a network pharmacology-based analysis. *Journal of Southern Medical University.* 2023;43(5):772-82.
11. Park JH. Studies on the Biopharmacological Efficacy of Water Extracts from *Radix Glycyrrhizae*, *Radix Glycyrrhizae preparata* and various kinds of *Gyejigamchotang*[dissertation]. Busan:Dong Eui University;2005.
12. Lee BJ, Kim YJ, Cho DH, Sohn NW, Kang H. Immunomodulatory effect of water extract of cinnamon on anti-CD3-induced cytokine responses and p38, JNK, ERK1/2 and STAT4 activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011;33(4):714-22.
13. Hong JW, Yang GE, Kim YB, Eom SH, Lew JH, Kang H. Anti-inflammatory activities of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:237.
14. Ahn KS, Jung CG, Moon JJ. Study on the Effects of *Astragali Radix*, *Cinnamomi Ramulus* and *Carthami Flos* on Thrombosis and Elevated Blood Viscosity. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 1989;4:74-92.
15. Kim JB, Shin HM. Vasodilation of Ethanol Extract of *Cinnamomi Ramulus* via Voltage Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Blockage. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2010;24(4):592-7.
16. Lee JW. Anti arthritic and anti-inflammatory effects of the mixture of Cinnamon Cortex, *Persica Semen* and *Mirabilite*[dissertation]. Seoul:Kyung Hee University;2013.
17. Park SD, Park WH, Kim JG. Effect of *Geijibokryunghwan* and each constituent herb on inhibition of platelet aggregation. *J Dongguk Orient Med Res Inst.* 2000;8(2):128-9.
18. Hwang TY, Sohn KH, Lim JH, Moon KD. Antibrowning effect of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extracts on chopped garlic. *Korean J Food Preserv.* 2010;17:160-4.
19. Lee KH, Rhee KH. Anti-inflammatory effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne extract in a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *Korean J Food Nutr.* 2010;23:435-9.
20. Lee JS, Kim JA, Cho SH, Son AR, Jang TS, So MS, et al. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Korean J Pharmacogn.* 2003;34:33-9.
21. Kim HJ, Jang HN, Bae JY, Ha JH, Park SN. Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active ingredients. *Microbiol Biotechnol Lett.* 2014;42:386-92.
22. Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, et al. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J Soc Cosmet Sci Korea.* 2013;39:1-8.
23. Kim KS, Ryu MJ. Physiological Activity of the *Glycyrrhiza uralensis* Extracts as a Cosmetic Product. *Asian J Beauty Cosmetol.* 2017;15(1):11-22.
24. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl Int.* 1994;7(1):647-9.
25. Park HJ, Lee JS, Lee JD, Kim NJ, Pyo JH, Kang JM, et al. The Anti-inflammatory Effect of *Cinnamomi Ramulus*. *J*

- Korean Med. 2005;26(2):140-51.
26. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Innate immunity : Tenney S. Kuby Immunology. 6th ed. New York:Freeman press:2007. p. 52-73.
  27. 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.
  28. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain:The free radical, nitric oxide. Ann Neurol. 1992;32:297-311.
  29. 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.
  30. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. Glia. 2002;40(2):140-55.
  31. 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.
  32. 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.
  33. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2:regulation and relevance in inflammation. Biochemical Pharmacology. 1995;50(10):1535-42.
  34. 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.
  35. 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.