加味芷貝散의 포도상구균 감염 유방염에 대한 항균활성 및 항염 효과

대구의한대학교 한의과대학 부인과 교실

권지명, 김동철

ABSTRACT

Effect of Gamijipaesan Extracts against Mastitis Induced by *Staphylococcus aureus* Infection in a Rat Model through Anti-inflammatory and Antibacterial Effects

Ji-Myung Kwon, Dong-Chul Kim

Dept. of Oriental Obstetric & Gynecology, College of Oriental Medicine,
Daegu Haany University

Objectives: The object of this study was to observe the protective effect of Gamijipaesan aqueous extracts(GJS), which has been traditionally used in Korean medicine in obstetrics & gynecological fields as anti-infectious and anti-inflammatory agents, against mastitis induced by *Staphylococcus aureus* infection in a rat model through antibacterial, anti-inflammatory, immunomodulatory, and anti-oxidant effects.

Methods: Antibacterial activities of GJS against *S. aureus* were detected using standard agar microdilution methods, with the effects on the bacterial invasion and intracellular killing of individual test materials in human mammary gland carcinoma cell(MCF-7) and murine macrophages(Raw 264.7) at MIC1/2, MIC and MIC2 concentration levels. In addition, the effects on the cell viability, nitric oxide(NO), tumor necrosis factor(TNF)- α and interleukin(IL)-6 productions of LPS activated Raw 264.7 cells. The changes on the mammary tissue viable bacterial numbers, myeloperoxidase(MPO), inducible nitric oxide synthetase(iNOS), TNF- α and IL-6 contents were observed in the *S. aureus* in vivo intramammary infectious rat model. The anti-bacterial and anti-inflammatory effects were compared with ciprofloxacin and piroxicam, respectively in the present study.

Results: MIC of GJS and ciprofloxacin against *S. aureus* were detected as 0.860 ± 0.428 ($0.391-1.563$) mg/ml and 0.371 ± 0.262 ($0.098-0.782$) μ g/ml, respectively. In addition, GJS and ciprofloxacin were also showed marked dosage-dependent inhibition of the both bacterial invasion and intracellular killing assays using MCF-7 and Raw 264.7 cells at MIC1/2, MIC and MIC $\times 2$ concentrations, respectively. ED₅₀ against LPS-induced cell viabilities and NO, TNF- α and IL-6 releases of GJS were detected as 0.72, 0.04, 0.08 and 0.11 mg/ml, and as 19.04, 4.18, 5.37 and 4.27 μ g/ml in piroxicam, respectively. 250 and 500 mg/kg of GJS also inhibit the intramammary bacterial growth, MPO, iNOS, TNF- α and IL-6 contents in *S. aureus* in vivo intramammary infected rats, respectively. GJS 500 mg/kg showed quite similar antibacterial and anti-infectious effects as compared with ciprofloxacin 40 mg/kg and also showed similar anti-inflammatory effects as piroxicam 10 mg/kg, in *S. aureus* in vivo intramammary infectious models.

Conclusions: The results obtained in this study suggest that over 250 mg/kg of GJS showed favorable anti-infectious effects against *S. aureus* infection in a rat model through their antibacterial, anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-oxidant effects and therefore expected that GJS can be used as alternative therapies, having both anti-inflammatory and anti-infectious activities. However, more detail mechanism studies should be conducted in future with the efficacy tests of individual herbal composition of GJS and the screening of the biological active compounds in individual herbs. In the present study, GJS 500 mg/kg showed quite similar anti-infectious effects were detected as compared with ciprofloxacin 40 mg/kg treated rats, and also GJS shows quite similar anti-inflammatory effects as compared with piroxicam 10 mg/kg in *S. aureus* in vivo intramammary infectious rats, but ciprofloxacin did not showed any anti-inflammatory effects, and piroxicam did not showed anti-infectious effects in this study.

Key Words: Gamijipaesan, Mastitis, anti-inflammatory effect, antibacterial effect

I. 서 론

여성의 유방염은 *Staphylococcus aureus* 를 비롯한 다양한 균의 감염으로 인해 발생하는데, 유방 종괴, 통증 및 발진 등의 국소증상과 38.5℃ 이상의 발열, 피로, 몸살 및 두통 등의 전신증상이 동반될 때 진단할 수 있고, 임상적으로 크게 비수유기와 수유기를 구분하지만 수유 중인 임산부에게 가장 흔한 합병증이며, 그 유병율은 수유방법과 수유시기 등에 따라 다양하게 관찰된다^{1,2)}.

*S. aureus*는 그람양성의 균으로 최근 ciprofloxacin³⁾을 비롯한 항균제 내성의 빈도가 증가하고 있는데, 특히 메치실린 내성 포도상구균(methicillin resistant *S. aureus*, MRSA)은 전세계적으로 중증의 질병과 사망을 일으키는 주요 병원성 세균이다⁴⁻⁷⁾.

또한, 대표적인 NSAIDs인 piroxicam은 위궤양 등의 부작용이 여전히 문제시되고 있고⁸⁾, 과도한 염증반응도 인체에 치명적인 결과를 초래할 수도 있으므로 항염효과가 우수하면서 상대적으로 부작용이 적은 천연물 신약 개발 관련 연구가 활발하게 이루어지고 있다^{9,10)}.

한의학에서는 乳癰, 乳疽, 乳發, 乳癰 및 乳癰 등의 병증이 유방염의 범주에 해당하는데¹¹⁾, 그 중 乳癰은 “核久乃作痛 外腫堅硬 手不可近 謂之乳癰”¹²⁾이라 하여 유방의 紅腫堅硬疼痛 등의 국소증상과 煩渴 嘔吐 增寒 發熱 頭痛 腋窩淋巴線腫痛¹³⁻²¹⁾ 등의 전신증상을 나타내는 질환으로 吹乳, 妬乳, 奶瘡, 發乳 및 乳毒^{12,15)} 등의 명칭을 사용하기도 한다.

加味芷貝散은 〈萬病回春〉²²⁾에 처방명

없이 약물만 처음 기재되었고, 처방명은 〈東醫寶鑑〉²⁰⁾에 처음 기술되었으며, 주로 여성 유방의 염증성, 감염성 질환에 다용된 처방으로 다양한 문헌적 연구, 실험적 연구 및 임상적 연구 등이 이루어져 왔으나²³⁻³⁰⁾ 항생제와 NSAIDs와 비견할 수 있을 정도의 효능에 대한 자세한 연구가 부족한 실정이기에 加味芷貝散의 유선염에 대한 항균, 항염효과를 세밀하게 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 *S. aureus* 세균주를 이용하여 MIC를 측정된 후 사람 유방암상피세포 유래인 MCF-7 세포와 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포에서 *S. aureus* 침투율과 GJS의 탐식세포내 사멸효과를 통한 항균력을 평가하였고, LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 세포 생존율, NO, TNF-α 및 IL-6 등의 분비를 분석하여 항염 및 염증관련 cytokine의 발현에 대한 영향을 평가하였으며, *S. aureus*을 유방 조직내 감염시킨 rat에서 조직내 생균수, 유방조직내 MPO, iNOS, TNF-α 및 IL-6 함량 변화를 각각 관찰함으로써 加味芷貝散의 항균 및 항염 효과를 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용된 모든 약제는 제천한방약초(제천, 한국)에서 구입하고 엄선하여 사용하였다.

2) 실험액 제조

본 실험에 사용된 加味芷貝散의 처방

구성은 방약합편³¹⁾에 준하였으며 그 내용과 분량은 다음 표와 같다. 加味芷貝散의 구성 약제 2첩 분량(67.5 g)을 정제수 1000 ml에 혼합하여 80℃에 3시간 동안 3번 가열 추출한 후 동결 건조시켜 총 14.63 g(수율 21.67%)의 갈색의 加味芷貝散 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 동결건조 추출물은 -20℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용한 반면에 ciprofloxacin과 piroxicam은 4℃의 냉장고에 보관한 후 사용하였고, 동결건조 추출물은 사용한 용매인 증류수에 50 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었으며, ciprofloxacin 및 piroxicam은 각각 4 mg/ml 및 1 mg/ml 까지 비교적 잘 용해되었다(Table 1).

Table 1. Composition of Gamijipaesan Used in This Study

Korean name	Herbs	Amounts (g)
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	3.75
貝母	Fritillariae Bulbus	3.75
天花粉	Trichosanthes Radix	3.75
金銀花	Lonicerae Flos	3.75
皂角刺	Gleditsiae Spina	3.75
穿山甲 (土炒)	Manitis Squama	3.75
當歸尾	Angelicae Gigantis Radix	3.75
瓜蒌仁	Trichosanthes Semen	3.75
甘草節	Glycyrrhizae Radix	3.75
Total	9 types	33.75

3) 균주, 세포주 및 배지

S. aureus ATCC 25923(American Type Culture Collection Center, VA, USA)은 동결건조 상태에서 BHI 배지에 녹인 후 BHI agar에 2-3회 계대배양한 후 사용

하였으며, MH agar 또는 broth에서 유지시켰다. 또한 사람 유방암상피세포 유래인 MCF-7 세포 및 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포는 각각 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 MCF-7 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 계대배양하여 유지하였으며, Raw 264.7 세포는 DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cell은 80-90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

4) 실험동물의 사양 및 관리

본 실험에 사용된 모든 실험동물은 “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals³²⁾” 및 대구한의대학교 실험동물 윤리위원회의 기준에 준하여 취급하였다.

280 마리의 임신 암컷 Sprague-Dawley rat(9-wks old upon receipt, body weight 170-180 g; SLC, Japan)를 임신 14일에 구입하여 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도(20-25℃)와 습도(30-35%)가 조절된 무균 사육실에서 polycarbonate 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기(light : dark cycle)는 12 시간 주기로 조절하였으며, 멸균 사료(Samyang, Korea)와 멸균 증류수는 자유롭게 공급하였다.

5) 시약 및 기기

배지 및 시약으로 사용된 BHI, MH agar 및 broth, DMEM은 Difco(MI, USA)

에서 각각 구입하였으며, MTT, LPS, 대조약물인 ciprofloxacin hydrochloride는 Hangzhou Tacon Co.(China)에서, piroxicam은 Aldrich-Sigma(MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 또한 96 well plate는 Greiner(Germany)에서 구입하였으며, MPO, iNOS 측정 kit, TNF- α 와 IL-6의 ELISA Kit는 BD Biosciences/Pharmingen(CA, USA)에서 구입하여 사용하였고, 이외 대부분의 시약은 Aldrich-Sigma(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 항균활성의 측정

(1) 생균수의 측정

정확한 흡광도(Optical Density: OD)와 세균수의 상관관계를 알아보기 위하여 정량 평판법(Quantitative Plating Methods, Standard Plate Count)을 이용하여 균수를 측정하였다³³⁾. *S. aureus*를 spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 20D: Milton Roy Company, PA, USA)를 이용하여 600 nm (OD_{600})에서의 흡광도를 0.5 Mcfarland standard와 같은 탁도로 조정된 다음, 균액을 10 , 10^2 , 10^3 및 10^4 배 등으로 단계희석하여 균의 농도가 1×10^4 CFU/ml이 되도록 만들어 MH agar에 접종하여 37°C , 10% CO_2 조건에서 24시간 배양한 후 조직배양접시에 형성된 집락(colony) 수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% barium chloride dihydrate($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.05 ml와 1% sulfuric acid(H_2SO_4) 9.95 ml를 혼합하여 준비하였다³⁴⁾.

(2) 항균활성도 측정

GJS의 *S. aureus*에 대한 최소저지농도를 표준 액체배지 희석법³⁵⁾을 이용하여

측정하였다. 즉, GJS를 25 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 mg/ml 등의 총 10 가지 농도를 준비하고 각각 멸균된 96 well plate에 100 μl 씩 분주한 뒤, 여기에 *S. aureus*의 단일집락을 MH broth배지에 접종한 지 48시간 후 OD_{600} 을 spectrophotometer로 측정하여 1.5×10^6 cell이 들어가도록 준비한 cell suspension 100 μl 를 분주한 다음 37°C 에서 48시간 배양하였다. Ciprofloxacin도 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 총 10 가지 농도를 준비하고 동일한 방법으로 bacteria suspension (1.5×10^6 CFU/ml)을 첨가한 후 37°C 에서 48시간 동안 배양하였다. Pfaller et al.³³⁾의 방법에 따라 MIC는 각각의 growth control well(시료를 첨가하지 않고 균만 배양한 well)과 시료가 함유된 well의 *S. aureus*의 성장을 육안적으로 비교 관찰하여 균의 생장 억제가 나타나는 최소 농도로 결정하였고, 모든 실험은 5회 반복하였다.

(3) 세포내 세균 사멸효과 측정

*S. aureus*에 대한 세포내 세균 사멸효과는 Cuffini et al.³⁶⁾의 방법에 따라 murine macrophage 세포 주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24 well plate에 Raw 264.7 세포(10^6 cells/well)를 배양한 4%의 heat-inactivated adult horse serum을 포함한 DMEM/F12 배지 1 ml를 분주한 다음 2×10^7 CFU의 *S. aureus*를 첨가하고, 37°C , 5% CO_2 조건하에 30 분간 배양하여 탐식을 촉진시켰다. 이후

MIC1/2 농도의 Ciprofloxacin(0.186 $\mu\text{g/ml}$), MIC1/2(0.430 mg/ml), MIC(0.860 mg/ml), MIC $\times$ 2(1.720 mg/ml)의 GJS등을 각각 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에 6시간 배양한 다음 세포만 수집하여 PBS로 세척한 뒤 5 mg/ml의 lysostaphin을 처리하여 세포막 또는 세포 밖에 부착된 세균을 사멸시키고, Raw 264.7 세포들을 멸균 증류수로 용해시킨 다음 생균수를 각각 측정하였다. 본 실험에서는 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 감염 대조군으로 사용하여 세포내 세균 사멸 효과를 평가하였다

(4) 상피세포내 세균 침투 저해효과 측정

*S. aureus*의 상피세포내 침투 저해효과를 Almeida et al.³⁷⁾ 및 Menzies and Kourteva³⁸⁾의 방법에 따라 사람 유방암 상피세포 유래인 MCF-7 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24 well plate에 MCF-7 세포를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에 5%의 FBS 및 1% 항진균제(penicillin, streptomycin 및 amphotericin B)가 포함된 DMEM/F12 배지에 사용 전 20시간 동안 배양하고, 사용 시 배양한 MCF-7 세포(2×10^4 cells)를 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 2.1×10^9 CFU/ml의 *S. aureus*가 포함된 DMEM/F12 배지 1 ml를 첨가하고 MIC1/2 농도의 ciprofloxacin(0.186 $\mu\text{g/ml}$), MIC1/2(0.430 mg/ml), MIC(0.860 mg/ml), MIC $\times$ 2(1.720 mg/ml)의 GJS를 각각 첨가한 다음 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 1시간 배양하고 상층액을 제거하였다. 이후 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 5 mg/ml의 lysostaphin을 첨가하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 2시간 배양하여 세포외 세균을 제거하였다. 처리가 완료된 MCF-7

세포를 다시 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 0.25% trypsin 처리하여 부유시키고 0.025%의 Triton X-100이 포함된 멸균 증류수로 세포를 용해시킨 다음 생균수를 측정하였다. 본 실험에서는 5회 반복 실험을 실시하였으며, 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 감염 대조군으로 사용하여 상피세포내 침투 저해효과를 평가하였다.

2) In Vitro 항염 효과 측정

(1) 세포생존율 측정

Raw 264.7 cell을 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 GJS를 각각 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 즉, GJS를 10 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 10, 1, 0.1, 0.01 및 0.001 mg/ml 등의 총 5가지 농도를 준비하고, piroxicam 역시 100, 10, 5, 2.5 및 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 총 5가지 농도를 준비하여 각각 세포에 처리한 후에 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. GJS 또는 piroxicam 처리 1시간 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS를 다시 첨가한 다음 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 하에서 24시간 배양한 뒤 생존세포에 0.1 mg/ml 농도의 MTT 용액 50 μl 를 첨가하고, 4시간 배양한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Automatic ELISA microplate reader(Huntsville, AL, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 LPS 처리를 하지 않은 control에 대한 ratio로 세포생존율을 측정하였으며, 5회 반복실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 세포의 생존율 감소를 50% 억제하는 추출물의 ED₅₀을 산출하였다.

(2) NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉, 세포배양 상등액 50 µl와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H₂O) 50 µl를 96 well plates에 혼합하고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Automatic ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다. 실험결과는 무처리 control에 대한 ratio로 NO 생성량의 변화를 표시하였으며, 5회 반복실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 각각의 추출물이 NO 생성량을 50% 억제하는 ED₅₀를 산출하였다.

(3) Cytokine 생성량 측정

TNF-α 및 IL-6 생성량을 측정하기 위하여 6 well plate에 5×10⁵ cells/ml를 분주하고, GJS 또는 piroxicam을 각각 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS 1 µg/ml를 처리하였다. LPS 처리 12시간 후 배지를 수거하고, 각각의 TNF-α 및 IL-6 ELISA Kit를 이용하여 manufacturer's instruction에 따라 함량을 측정하였다. 실험결과는 무처리 control에 대한 ratio로 TNF-α 및 IL-6 생성량의 변화를 표시하였으며, 5회 반복실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 각각의 cytokine에 대한 증가를 50% 억제하는 추출물의 농도인 ED₅₀를 산출하였다.

4) In Vivo 항염효과 측정

(1) 실험동물의 감염 및 식별

분만 72시간 후 240마리에 *S. aureus* 유방내 감염을 실시하였으며, 나머지 40마리는 감염을 실시하지 않은 정상 대조군으로 사용하였다. 모든 실험동물은 picric acid로 개체를 식별하였다.

(2) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 8마리씩 7개의 그룹으로 구분하였다(Table 2). 즉, *S. aureus* 유방내 감염 대신 PBS를 주입한 정상 대조군, *S. aureus* 유방내 감염 후 멸균 증류수 투여한 감염 대조군, *S. aureus* 유방내 감염 후 ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군, *S. aureus* 유방내 감염 후 piroxicam 10 mg/kg 투여군, *S. aureus* 유방내 감염 후 GJS 125, 250 및 500 mg/kg 투여군 등의 7개의 군으로 구분하여 실험하였다. GJS적정량을 각각 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg당 10 ml의 용량으로 *S. aureus* 유방내 감염 24시간 후부터 6시간 간격으로 금속제 Zonde가 부착된 5 ml 주사기(syringe)를 이용하여 2회 강제 경구 투여 하였다. 또한 ciprofloxacin은 멸균 증류수에 용해시켜 *S. aureus* 감염에 항염 효과를 나타내는 것으로 알려진 40 mg/kg³⁹⁾을 *S. aureus* 유방내 감염 24시간 후부터 6시간 간격으로 2회 경구 투여하였으며, piroxicam 역시 rat에 항염 효과를 나타내는 용량인 10 mg/kg⁴⁰⁾을 *S. aureus* 유방내 감염 24시간 후부터, 6시간 간격으로 2회 경구투여 하였다.

Table 2. Experimental Design Used in *S. aureus* in Vivo Intramammary Infectious Rat Model

Groups		Test article/infections/Dose (mg/kg/day)
Normal(Intact)		Non-infectious vehicle control rats, 10 ml/kg
Control(Infected)		<i>S. aureus</i> infected and then vehicle(distilled water) treated rats, 10 ml/kg
Reference	Ciprofloxacin	<i>S. aureus</i> infected and then ciprofloxacin 40 mg/kg treated rats
	Piroxicam	<i>S. aureus</i> infected and then piroxicam 10 mg/kg treated rats
GJS	GJS125	<i>S. aureus</i> infected and then GJS 125 mg/kg treated rats
	GJS250	<i>S. aureus</i> infected and then GJS 250 mg/kg treated rats
	GJS500	<i>S. aureus</i> infected and then GJS 500 mg/kg treated rats

(3) *S. aureus* 유방내 감염

Zhong et al.⁴¹⁾의 방법으로 *S. aureus*의 유방내 감염을 실시하였다. 즉, 모든 실험 동물을 25 mg/kg의 Zoletile mixture(Zoletile 50; Virbac Lab., France) 복강 주사로 마취한 다음 좌우측 4번 젖꼭지를 95% ethanol 소독한 다음 33-gauge needle이 부착된 주사기를 이용하여 *S. aureus* 2×10^5 CFU/ml 또는 멸균 PBS 100 μ l를 유관부위에 주입하여 유방내 감염을 실시하였다. 유방내 감염은 분만 72시간 후 실시하였으며, 감염 24시간 후 GJS, ciprofloxacin 및 piroxicam 등을 각각 투여하였고, 약물 투여 1, 6, 12, 24 및 48시간 후 각각 군당 8마리의 실험동물을 희생하여 유방조직을 채취하였다.

(4) 생균수 측정

각 시간대별로 채취한 유방조직을 멸균 PBS에 homogenize한 다음 5% sheep blood가 함유된 BHI agar에 분주하고, 37°C에 24시간 동안 배양한 다음 형성된 집락수를 측정하여 $\log_{10}$ CFU/g mammary tissue 단위로 생균수를 각각 측정하였다.

(5) 유방조직내 MPO 함량 측정

각 시간대별로 채취한 유방조직을 멸

균 생리 식염수로 세척하고 주변 지방조직을 제거하였다. 이후 Kavutcu et al.⁴²⁾의 방법으로 in 9 vols ice-cold 0.15 mol/l KCl 및 1.9 mmol/l EDTA가 함유된 용액에서 homogenize하고, 상층액을 분리하여 MPO 함량을 측정하였다. 즉, 유방조직 내 단백질 함량은 Lowry et al.⁴³⁾의 방법으로 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, MPO 함량은 Gonen et al.⁴⁴⁾의 방법에 따라 상업용 MPO detection Kit를 이용하여 tetramethyl benzidine(TMB, Vector Labs.)를 기질로 이용하여 흡광도 450 nm에서 U/g protein 단위로 측정하였다.

(6) 유방조직내 iNOS 함량 측정

각 시간대별로 채취한 유방조직을 멸균 생리 식염수로 세척하고 주변 지방조직을 제거하였다. 이후 Kavutcu et al.⁴²⁾의 방법으로 in 9 vols ice-cold 0.15 mol/l KCl 및 1.9 mol/l EDTA가 함유된 용액에서 homogenize하고, 상층액을 분리하여 iNOS 활성을 측정하였다. 즉, 유방조직내 단백질 함량은 Lowry et al.⁴³⁾의 방법으로 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, iNOS 함량은 상업용 iNOS detection Kit를 이용하여

Miao et al.⁴⁵⁾의 방법으로 흡광도 530 nm에서 U/g protein 단위로 측정하였다. 간단히 상층액을 0.6 ml의 반응용 완충액 (reaction buffer: 5 mmol/l MgCl₂, 250 mmol/l L-valine, 0.2 mol/l phosphate buffered saline, 480 µmol/l oxyhemoglobin and 30 mmol/LNADPH)과 cNOS 억제제 (6 mmol/l EGTA)와 37℃ 조건하에 15 분간 반응시킨 다음 10 mM/l EDTA와 10 mmol/l HEPES 완충액을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 이후 형성된 화합물을 흡광도 530 nm에서 측정하여 Lambert-Beer Law에 기초하여 U/mg protein 단위로 측정하였다³⁴⁾.

(7) 유방조직내 Cytokine 함량 측정

유방조직내 TNF-α 및 IL-6 함량은 Zhu et al.⁴⁶⁾의 방법에 준하여 적출한 유방조직 homogenate 상층액에서 각각의 TNF-α 및 IL-6 ELISA Kit를 이용하여 manufacturer's instruction에 따라 함량을 ng/ml mammary tissue 또는 pg/ml mammary tissue 단위로 측정하였다.

4) 통계처리

모든 수치는 평균±표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 LSD test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 MW test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 14.0 K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value 가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인

정하였다. 또한 감염 대조군의 감염 또는 염증의 정도를 파악하기 위하여 정상 대조군과 감염 대조군의 % change를 아래의 공식[1]을 이용하여 산출하였으며, 투여 물질의 항균 또는 항염 효과를 좀 더 명확히 하기 위하여 투여군과 유발 대조군과의 % change를 아래의 공식[2]를 이용하여 측정하였다.

EQUATION [1]. % Changes as compared with intact control

$$= [(Data\ of\ induced\ control - Data\ of\ intact\ control) / Data\ of\ intact\ control] \times 100$$

EQUATION [2]. % Changes as compared with induced control

$$= [(Data\ of\ treatment\ groups - Data\ of\ induced\ control) / Data\ of\ induced\ control] \times 100$$

III. 결 과

1. GJS의 in Vitro 항균활성 효과

1) 항균 활성도(MIC)

*S. aureus*에 대한 MIC를 표준 액체배지 희석법으로 평가한 결과 GJS는 0.860±0.428(0.391-1.563) mg/ml로 관찰되었고 ciprofloxacin은 0.371±0.262(0.098-0.782) µg/ml로 관찰되었다(Table 3).

Table 3. MIC against *S. aureus* Detected in This Study

Test materials	MIC	Ranges
GJS (mg/ml)	0.860±0.428	0.391-1.563
Ciprofloxacin (µg/ml)	0.371±0.262	0.098-0.782

2) 세포내 세균 사멸효과

MIC1/2, MIC 및 MIC×2 등 각각의 농도의 GJS와 MIC1/2 농도의 ciprofloxacin 은 감염 대조군에 비해 Raw 264.7 내 생균수를 각각 -79.97, -50.07, -67.38 및 -76.99% 등의 용량 의존적인 유의한 감소를 나타내었다($p<0.01$, Fig. 1).

Fig. 1. Results of Intracellular Killing Assay against *S. aureus* on Raw 264.7 Cells.

a($p<0.01$) as compared with control by LSD test

Control group : *S. aureus* infected cell

MIC1/2 ciprofloxacin = 0.186 μg/ml

MIC1/2 GJS = 0.430 mg/ml

MIC GJS = 0.860 mg/ml

MIC×2 GJS = 1.720 mg/ml

3) 상피세포내 세균 침투 저해효과

MIC1/2, MIC 및 MIC×2 등 각각 농도의 GJS와 MIC1/2 농도의 ciprofloxacin 은 감염 대조군에 비해 MCF-7 cell 내 생균수를 각각 -81.49, -51.30, -67.64 및 -76.95% 등의 용량 의존적인 유의한 감소를 나타내었다($p<0.01$, Fig. 2).

Fig. 2. Results of Bacterial Invasion Assay against *S. aureus* on MCF-7 Cells. a($p<0.01$) as compared with control by LSD test
Control group : *S. aureus* infected cell

2. GJS의 in Vitro 항염 효과

1) LPS 처리 세포생존율의 변화

(1) Piroxicam 이 세포생존율에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 -42.00%의 세포생존율이 인정되었고, piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100 μg/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 10.34, 22.41, 36.55, 52.41 및 65.52% 등의 변화가 나타났는데 piroxicam 2.5 μg/ml 이상의 농도 처리군에서 용량 의존적으로 유의한 세포생존율 증가가 나타나 LPS처리에 의한 세포생존율 감소에 대한 piroxicam의 ED₅₀가 19.04 μg/ml로 산출되었다(Fig. 3).

(2) GJS가 세포생존율에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 -43.40%의 세포생존율이 인정되었고, GJS 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 4.24, 30.74, 36.04, 53.36 및 65.37%의 변화가 나타났는데 GJS 0.01 mg/ml 이상의 농도 처리군에서부터 용량 의존적으로 유의한 세포생존율의 증

가가 나타나 LPS처리에 의한 세포생존율 감소에 대한 GJS의 ED₅₀가 0.72 mg/ml로 산출되었다($p<0.01$, Fig. 4).

Fig. 3. Effects of Piroxicam on the Cell Viability in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a($p<0.01$) as compared with normal group by MW test

b($p<0.01$) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 μg/ml and then piroxicam 0 μg/ml treated group

Fig. 4. Effects of GJS on the Cell Viability in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a($p<0.01$) as compared with normal group by MW test

b($p<0.01$) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 μg/ml and then GJS 0 μg/ml treated group

2) LPS 처리 NO 생성량의 변화

(1) Piroxicam이 NO 생성량에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 458.60%의 NO생성량의 변화가 인정되었고, piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100 μg/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -35.98, -40.60, -52.35, -65.81 및 -80.06%의 변화가 나타났는데 piroxicam 1.25 μg/ml 이상의 농도 처리군에서부터 용량 의존적으로 유의한 NO 생성량의 감소가 나타나 LPS처리에 의한 NO 생성량의 증가에 대한 piroxicam의 ED₅₀가 4.18 μg/ml로 산출되었다($p<0.01$, Fig. 5).

Fig. 5. Effects of Piroxicam on the NO Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a($p<0.01$) as compared with normal group by MW test

b($p<0.01$) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 μg/ml and then piroxicam 0 μg/ml treated group

(2) GJS가 NO 생성량에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 461.60%의 NO생성량의 변화가 인정되었고, GJS 물출물 0.001, 0.01, 0.1,

1 및 10 mg/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -27.56, -46.58, -55.34, -65.49 및 -79.49%의 변화가 나타났는데 GJS 0.001 mg/ml 이상의 농도 처리군에서부터 용량 의존적으로 NO생성량의 감소가 나타나 LPS처리에 의한 세포생존을 감소에 대한 GJS의 ED₅₀가 0.04 mg/ml로 산출되었다(p<0.01, Fig. 6).

Fig. 6. Effects of GJS on the NO Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a(p<0.01) as compared with normal group by MW test

b(p<0.01) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 µg/ml and then GJS 0 µg/ml treated group

3) LPS 처리 TNF-α 생성량의 변화

(1) Piroxicam이 TNF-α 생성량에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 1473.40%의 TNF-α 생성량의 변화가 인정되었고, piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100 µg/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -28.40, -41.13, -53.63, -59.81 및 -79.05% 등의 변화가 나타났는데 piroxicam 1.25 µg/ml 이상의 농도 처리군에서부터 용량 의존적으로 유

의한 TNF-α 생성량의 감소가 나타나 LPS 처리에 의한 TNF-α 생성량의 증가에 대한 piroxicam의 ED₅₀가 5.370 µg/ml로 산출되었다(p<0.01, Fig. 7).

Fig. 7. Effects of Piroxicam on the TNF-α Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a(p<0.01) as compared with normal group by MW test

b(p<0.01) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 µg/ml and then piroxicam 0 µg/ml treated group

(2) GJS가 TNF-α 생성량에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 461.60%의 TNF-α 생성량의 감소가 인정되었고, GJS 물출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -24.09, -32.90, -51.22, -63.23 및 -85.05% 등의 변화가 나타났는데 GJS 0.001 mg/ml 이상의 농도 처리군에서부터 용량 의존적으로 TNF-α 생성 감소가 나타나 LPS처리에 의한 TNF-α생성에 대한 GJS의 ED₅₀가 0.08 mg/ml로 산출되었다(p<0.01, Fig. 8).

Fig. 8. Effects of GJS on the TNF- α Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a(p<0.01) as compared with normal group by MW test

b(p<0.01) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 μ g/ml and then GJS 0 μ g/ml treated group

Fig. 9. Effects of Piroxicam on the IL-6 Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a(p<0.01) as compared with normal group by MW test

b(p<0.01) and c(p<0.05) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 μ g/ml and then piroxicam 0 μ g/ml treated group

4) LPS 처리 IL-6 생성량의 변화

(1) Piroxicam이 IL-6 생성량에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 2260.80%의 IL-6 생성량의 변화가 인정되었고, piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100 μ g/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -25.66, -44.24, -53.98, -66.24 및 -89.04% 등의 변화가 나타났는데 piroxicam 1.25 μ g/ml 이상의 농도 처리군에서부터 용량 의존적으로 유의한 IL-6 생성량의 감소가 나타나 LPS 처리에 의한 IL-6 생성량의 증가에 대한 piroxicam의 ED₅₀가 4.270 μ g/ml로 산출되었다(p<0.01, Fig. 9).

(2) GJS가 IL-6 생성량에 미치는 영향

LPS 단독 처리군은 정상군(무처리군)에 비해 2310.00%의 IL-6 생성량의 변화가 인정되었고, GJS 물출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 등의 농도 처리군은 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -17.93, -27.32, -49.53, -66.13 및 -86.02% 등의 변화가 나타났는데 GJS 0.001 mg/ml 이상의 농도 처리군에서부터 용량 의존적으로 IL-6 생성 감소가 나타나 LPS 처리에 의한 IL-6 생성에 대한 GJS의 ED₅₀가 0.11 mg/ml로 산출되었다(p<0.01, Fig. 10).

Fig. 10. Effects of GJS on the IL-6 Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a($p<0.01$) as compared with normal group by MW test

b($p<0.01$) and c($p<0.05$) as compared with control group by MW test

normal group : not treated group

control group : LPS 1 μ g/ml and then GJS 0 μ g/ml treated group

3. GJS의 In Vivo 항염효과

1) 유방조직내 생균수의 변화

Ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군, GJS

250 및 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 모든 시간대(약물 투여 종료 후 1, 6, 12, 24 및 48 시간 후)에서 유방 조직내 생균수가 유의하게 감소한 반면에 piroxicam 및 GJS 125mg/kg 투여군에서는 감염 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다($p<0.01$, Table 4).

감염대조군에 비해 각 투여군의 약물 투여 종료 후 모든 시간대에서 유방조직내 생균수의 감소 비율은 ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군이 -42.92, -52.81, -70.17, -69.77 및 -73.34% 등, piroxicam 10 mg/kg 투여군이 3.71, 2.70, 4.27, 3.13 및 2.87% 등, GJS 125 mg/kg 투여군이 -7.34, -5.16, -6.82, -3.44 및 -5.06% 등, GJS 250 mg/kg 투여군이 -18.58, -29.51, -30.90, -38.14 및 -34.99% 등, 500 mg/kg 투여군이 -48.24, -53.45, -58.01, -56.70 및 -68.61% 등으로 나타났다(Table 4).

Table 4. Changes on the Viable Bacteria Numbers after Ciprofloxacin, Piroxicam or GJS Treatment in *S. aureus* in Vivo Intramammary Infectious Rats

Groups	Time after end of administration (hrs)				
	1	6	12	24	48
Control	7.31 $\pm$ 0.96	6.29 $\pm$ 1.40	5.50 $\pm$ 1.01	3.92 $\pm$ 0.54	3.44 $\pm$ 0.77
Ciprofloxacin 40 mg/kg	4.17 $\pm$ 0.90 ^a	2.97 $\pm$ 0.71 ^a	1.64 $\pm$ 0.80 ^a	1.19 $\pm$ 0.58 ^a	0.92 $\pm$ 0.54 ^a
Piroxicam 10 mg/kg	7.58 $\pm$ 0.54	6.46 $\pm$ 0.97	5.74 $\pm$ 0.49	4.04 $\pm$ 0.89	3.54 $\pm$ 0.95
125 mg/kg	6.77 $\pm$ 0.81	5.97 $\pm$ 0.69	5.13 $\pm$ 0.88	3.79 $\pm$ 1.08	3.26 $\pm$ 0.62
GJS 250 mg/kg	5.95 $\pm$ 0.72 ^a	4.44 $\pm$ 1.36 ^a	3.80 $\pm$ 0.76 ^a	2.43 $\pm$ 0.61 ^a	2.23 $\pm$ 0.49 ^a
500 mg/kg	3.78 $\pm$ 1.11 ^a	2.93 $\pm$ 0.65 ^a	2.31 $\pm$ 0.66 ^a	1.70 $\pm$ 0.89 ^a	1.08 $\pm$ 0.34 ^a

Values are expressed Mean $\pm$ SD of eight rat mammary tissues, $\log_{10}$ CFU/g of mammary tissues a($p<0.01$) as compared with control by LSD test.

control group : *S. aureus* infected and then vehicle(distilled water) treated rats, 10 ml/kg

2) 유방조직내 MPO 함량의 변화

Ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군, GJS 250 및 500 mg/kg 투여군에서 대조군에

비해 모든 시간대(약물 투여 종료 후 1, 6, 12, 24 및 48 시간 후)에서 유방 조직내 MPO 함량이 유의하게 감소한 반면

에 piroxicam 및 GJS 125 mg/kg 투여군에서는 감염 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다($p<0.01$, Table 5).

감염대조군에 비해 각 투여군의 약물 투여 종료 후 모든 시간대에서 유방조직 내 MPO 함량의 감소 비율은 ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군이 -5.62, -7.26, -3.04, -5.83 및 -0.56% 등, piroxicam 10 mg/kg

투여군이 -35.10, -35.83, -31.90, -22.27 및 -21.67% 등, GJS 125 mg/kg 투여군이 -8.01, -9.00, -10.67, -7.51 및 -7.55% 등, GJS 250 mg/kg 투여군이 -25.25, -23.45, -17.62, -16.83 및 -15.62% 등, 500 mg/kg 투여군이 -35.59, -35.01, -33.10, -24.85 및 -21.31% 등으로 나타났다(Table 5).

Table 5. Changes on the Mammary MPO Levels after Ciprofloxacin, Piroxicam or GJS Treatment in *S. aureus* in Vivo Intramammary Infectious Rats

Groups	Time after end of administration (hrs)				
	1	6	12	24	48
Normal	2.80±0.88	2.82±0.79	2.81±0.95	2.80±0.83	2.99±1.10
Control	7.41±1.06 ^a	6.80±1.31 ^a	6.49±0.98 ^a	5.94±0.95 ^a	5.58±0.62 ^a
Ciprofloxacin 40 mg/kg	7.00±1.12 ^a	6.31±0.91 ^a	6.30±1.63 ^a	5.61±0.98 ^a	5.55±0.53 ^a
Piroxicam 10 mg/kg	4.81±0.97 ^{ab}	4.37±1.06 ^{ab}	4.42±0.79 ^{ab}	4.63±1.23 ^{ab}	4.37±0.98 ^{ab}
125 mg/kg	6.82±0.96 ^a	6.19±0.61 ^a	5.80±0.77 ^a	5.51±1.09 ^a	5.16±0.96 ^a
GJS 250 mg/kg	5.54±1.16 ^{ab}	5.21±0.55 ^{ab}	5.35±0.63 ^{ac}	4.95±0.58 ^{ac}	4.71±0.62 ^{ac}
500 mg/kg	4.77±0.78 ^{ab}	4.42±0.85 ^{ab}	4.34±0.80 ^{ab}	4.48±0.89 ^{ab}	4.39±0.79 ^{ab}

Values are expressed Mean±SD of eight rat mammary tissues, U/g protein.

a($p<0.01$) as compared with normal group by LSD test

b($p<0.01$) and c($p<0.05$) as compared with control group by LSD test

normal group : Non-infectious vehicle control rats, 10 ml/kg

control group : *S. aureus* infected and then vehicle(distilled water) treated rats, 10 ml/kg

3) 유방조직내 iNOS 함량의 변화

Ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군, GJS 250 및 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 모든 시간대(약물 투여 종료 후 1, 6, 12, 24 및 48 시간 후)에서 유방 조직 내 iNOS 함량이 유의하게 감소한 반면에 piroxicam 및 GJS 125 mg/kg 투여군에서는 감염 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다($p<0.01$, Table 6).

감염대조군에 비해 각 투여군의 약물 투여 종료 후 모든 시간대에서 유방조직내

iNOS 함량의 감소 비율은 ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군이 -5.75, -2.43, -2.62, -6.08 및 -3.87% 등, piroxicam 10 mg/kg 투여군이 -37.24, -32.34, -28.93, -26.16 및 -22.99% 등, GJS 125 mg/kg 투여군이 -6.47, -10.97, -1.50, -4.79 및 -5.57% 등, GJS 250 mg/kg 투여군이 -25.26, -22.70, -21.72, -18.05 및 -15.42% 등, 500 mg/kg 투여군이 -35.67, -31.78, -29.68, -26.19 및 -23.90% 등으로 나타났다(Table 6).

Table 6. Changes on the Mammary iNOS Activity after Ciprofloxacin, Piroxicam or GJS Treatment in *S. aureus* in Vivo Intramammary Infectious Rats

Groups	Time after end of administration (hrs)				
	1	6	12	24	48
Normal	3.84±0.68	4.19±0.82	3.79±0.67	4.00±0.54	3.90±0.56
Control	9.22±1.70 ^d	6.90±0.84 ^a	6.02±0.89 ^a	5.59±0.54 ^d	5.20±0.42 ^d
Ciprofloxacin 40 mg/kg	8.69±2.30 ^d	6.73±0.94 ^a	5.86±0.83 ^a	5.25±1.07 ^d	5.00±1.14 ^e
Piroxicam 10 mg/kg	5.79±1.07 ^{df}	4.67±0.56 ^c	4.28±0.73 ^c	4.13±0.52 ^f	4.01±0.67 ^f
125 mg/kg	8.62±1.70 ^d	6.14±1.39 ^a	5.93±1.12 ^a	5.32±0.66 ^d	4.91±0.59 ^d
GJS 250 mg/kg	6.89±0.73 ^{df}	5.33±0.64 ^{bc}	4.71±0.72 ^{bc}	4.58±0.49 ^f	4.40±0.53 ^f
500 mg/kg	5.93±0.95 ^{df}	4.70±0.61 ^c	4.23±0.80 ^c	4.13±0.91 ^f	3.96±0.71 ^f

Values are expressed Mean±SD of eight rat mammary tissues, U/mg protein.

a(p<0.01) and b(p<0.05) as compared with normal group by LSD test

c(p<0.01) as compared with control group by LSD test

d(p<0.01) and e(p<0.05) as compared with normal group by MW test

f(p<0.01) as compared with control group by MW test

normal group : Non-infectious vehicle control rats, 10 ml/kg

control group : *S. aureus* infected and then vehicle(distilled water) treated rats, 10 ml/kg

4) 유방조직내 TNF-α 함량의 변화

Ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군, GJS 250 및 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 모든 시간대(약물 투여 종료 후 1, 6, 12, 24 및 48 시간 후)에서 유방 조직내 TNF-α 함량이 유의하게 감소한 반면에 piroxicam 및 GJS 125 mg/kg 투여군에서는 감염 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다(p<0.01, Table 7).

감염대조군에 비해 각 투여군의 약물 투여 종료 후 모든 시간대에서 유방조직내 TNF-α 함량의 감소 비율은 ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군이 -7.96, -6.50, -3.16, -4.35 및 -5.36% 등, piroxicam 10 mg/kg 투여군이 -45.65, -44.71, -35.98, -31.40 및 -25.04% 등, GJS 125 mg/kg 투여군이 -4.45, -3.33, -2.85, -6.03 및 -5.10% 등, GJS 250 mg/kg 투여군이 -32.07, -29.01, -26.40, -24.91 및 -24.73% 등, 500 mg/kg 투여군이 -46.46, -43.34, -37.88, -35.06 및 -24.74% 등으로 나타났다(Table 7).

5) 유방조직내 IL-6 함량의 변화

Ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군, GJS 250 및 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 모든 시간대(약물 투여 종료 후 1, 6, 12, 24 및 48 시간 후)에서 유방 조직내 IL-6 함량이 유의하게 감소한 반면에 piroxicam 및 GJS 125 mg/kg 투여군에서는 감염 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다(p<0.01, Table 8).

감염대조군에 비해 각 투여군의 약물 투여 종료 후 모든 시간대에서 유방조직내 IL-6 함량의 감소 비율은 ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군이 -6.53, -4.15, -3.50, -6.91 및 -3.43% 등, piroxicam 10 mg/kg 투여군이 -45.94, -42.42, -35.21, -31.70 및 -24.98% 등, GJS 125 mg/kg 투여군이 -3.74, -1.11, -2.27, -7.40 및 -6.36% 등, GJS 250 mg/kg 투여군이 30.86, -27.97, -24.09, -22.63 및 -19.07% 등, 500 mg/kg 투여군이 -46.11, -42.40, -34.58, -31.80 및 -29.33% 등으로 나타났다(Table 8).

Table 7. Changes on the Mammary TNF- α Level after Ciprofloxacin, Piroxicam or GJS Treatment in *S. aureus* in Vivo Intramammary Infectious Rats

Groups	Time after end of administration (hrs)				
	1	6	12	24	48
Normal	4.07 $\pm$ 0.79	4.02 $\pm$ 0.96	4.06 $\pm$ 0.67	4.03 $\pm$ 0.56	4.02 $\pm$ 0.68
Control	20.49 $\pm$ 2.65 ^c	18.10 $\pm$ 1.35 ^a	16.25 $\pm$ 1.27 ^a	15.04 $\pm$ 1.36 ^a	14.97 $\pm$ 1.34 ^a
Ciprofloxacin 40 mg/kg	18.86 $\pm$ 3.04 ^c	16.93 $\pm$ 3.05 ^a	15.73 $\pm$ 2.28 ^a	14.39 $\pm$ 2.12 ^a	14.17 $\pm$ 0.88 ^a
Piroxicam 10 mg/kg	11.14 $\pm$ 2.18 ^{cd}	10.01 $\pm$ 1.67 ^{ab}	10.40 $\pm$ 1.52 ^{ab}	10.32 $\pm$ 2.09 ^{ab}	11.22 $\pm$ 1.46 ^{ab}
125 mg/kg	19.58 $\pm$ 2.17 ^c	17.50 $\pm$ 2.20 ^a	15.79 $\pm$ 1.92 ^a	14.13 $\pm$ 2.02 ^a	14.21 $\pm$ 1.53 ^a
GJS 250 mg/kg	13.92 $\pm$ 1.40 ^{cd}	12.85 $\pm$ 1.57 ^{ab}	11.96 $\pm$ 2.06 ^{ab}	11.29 $\pm$ 1.28 ^{ab}	11.27 $\pm$ 1.49 ^{ab}
500 mg/kg	10.97 $\pm$ 1.57 ^{cd}	10.26 $\pm$ 2.47 ^{ab}	10.09 $\pm$ 1.34 ^{ab}	9.77 $\pm$ 1.23 ^{ab}	11.27 $\pm$ 1.55 ^{ab}

Values are expressed Mean $\pm$ SD of eight rat mammary tissues, ng/mg mammary tissue.

a(p<0.01) as compared with normal group by LSD test

b(p<0.01) as compared with control group by LSD test

c(p<0.01) as compared with normal group by MW test

d(p<0.01) as compared with control group by LSD test

normal group : Non-infectious vehicle control rats, 10 ml/kg

control group : *S. aureus* infected and then vehicle(distilled water) treated rats, 10 ml/kg

Table 8. Changes on the Mammary IL-6 Level after Ciprofloxacin, Piroxicam or GJS Treatment in *S. aureus* in Vivo Intramammary Infectious Rats

Groups	Time after end of administration (hrs)				
	1	6	12	24	48
Normal	44.88 $\pm$ 8.01	45.00 $\pm$ 6.76	43.34 $\pm$ 5.06	46.14 $\pm$ 4.54	46.10 $\pm$ 4.50
Control	96.65 $\pm$ 15.41 ^a	87.88 $\pm$ 11.48 ^a	74.31 $\pm$ 4.80 ^c	65.85 $\pm$ 6.38 ^a	63.46 $\pm$ 9.16 ^c
Ciprofloxacin 40 mg/kg	90.34 $\pm$ 21.65 ^a	84.23 $\pm$ 9.94 ^a	71.71 $\pm$ 12.21 ^c	61.30 $\pm$ 8.88 ^a	61.29 $\pm$ 10.52 ^c
Piroxicam 10 mg/kg	52.25 $\pm$ 11.50 ^b	50.60 $\pm$ 6.17 ^b	48.15 $\pm$ 9.62 ^d	44.98 $\pm$ 7.28 ^b	47.61 $\pm$ 5.39 ^e
125 mg/kg	93.04 $\pm$ 21.16 ^a	86.90 $\pm$ 16.88 ^a	72.63 $\pm$ 14.37 ^c	60.98 $\pm$ 11.83 ^a	59.43 $\pm$ 7.36 ^c
GJS 250 mg/kg	66.83 $\pm$ 16.58 ^{ab}	63.30 $\pm$ 12.33 ^{ab}	56.41 $\pm$ 3.83 ^{cd}	50.95 $\pm$ 5.15 ^b	51.36 $\pm$ 7.98 ^e
500 mg/kg	52.09 $\pm$ 12.77 ^b	50.61 $\pm$ 11.42 ^b	48.61 $\pm$ 9.30 ^d	44.91 $\pm$ 9.23 ^b	44.85 $\pm$ 6.53 ^d

Values are expressed Mean $\pm$ SD of eight rat mammary tissues, ng/mg mammary tissue.

a(p<0.01) as compared with normal group by LSD test

b(p<0.01) as compared with control group by LSD test

c(p<0.01) as compared with normal group by MW test

d(p<0.01) and e(p<0.05) as compared with control group by MW test

normal group : Non-infectious vehicle control rats, 10 ml/kg

control group : *S. aureus* infected and then vehicle(distilled water) treated rats, 10 ml/kg

IV. 고 찰

유방염은 다양한 원인에 의해서 발생하는 유방의 염증성 질환으로 섬유선종과 섬유낭종성 질환에 이어 세번째로 빈발하는 질환이고, 최근 산모의 의식향상

과 항생제의 사용으로 그 빈도가 점차적으로 줄어들고 있으나 여전히 산욕기 질환 중 가장 중요한 질병 중 하나로 *S. aureus*가 가장 흔한 원인균으로 지목되어 왔으며, 치료는 발열, 발적, 동통, 부종 및 압통 등의 증상에 따라 항생제, 소염제 및 진통제 등을 사용하고 있다^{1,2)}.

유방염에 자주 사용되는 ciprofloxacin은 우수한 항균력에 비해 간독성, 심장독성 및 광독성 등의 부작용과 내성 균주의 출현으로 제한적인 반면에^{3,7)}, NSAIDs인 piroxicam은 발열, 발적, 동통, 부종 및 압통 등의 증상치료에 유효하나 위궤양 등의 부작용이 문제시 되고 있어 우수한 효과와 더불어 부작용이 적은 천연물 유래의 소염진통제의 개발이 활발히 이루어 지고 있다⁸⁾.

한의학에서 乳癰, 乳疽, 乳發, 乳癰 및 乳癰 등을 유방염의 범주로 볼 수 있는데, 유방부위에 발생하는 癰疽인 乳癰은 “核久乃作痛 外腫堅硬 手不可近 謂之乳癰”이라 하여 유방염과 가장 유사하다고 볼 수 있다¹¹⁾.

陳은 “乳子之母不能調養 以致胃汁濁而壅滯爲膿”이라 하여 원인을 제시하였고^{12,13)}, 朱 등은 “유방은 陽明이 경과하는 곳이고 유두는 厥陰의 소속이니 유모가 忿怒逆上 鬱悶所遏 厚味所養하여 厥陰의 혈이 운행하지 않으면 乳竅가 폐색되고 유즙이 불통하며 양명의 혈이 沸騰하는 고로 열이 심해서 화농하고, 또한 젖먹는 아이가 흥격에 滯痰이 있을 때 口氣가 熱하므로 이때에 젖꼭지를 물고 자면 열기가 吹注하여 유방으로 들어가 結核을 이루게 된다.”고 하여 乳癰이 수유기 유선염 중 울체성과 화농성을 모두 포괄하는 것으로 보았다^{13,14,17,20,47)}.

乳癰의 치법은 肝鬱胃熱과 熱毒內盛으로 辨證하여 肝鬱胃熱型은 瓜蒌牛蒡子湯과 加味芷貝散을, 熱毒內盛型은 托裏消毒飲과 仙方活命飲을 사용하는데, 초기에는 活血敗毒, 發散風熱, 解表疎肝 및 清解和營 등을 하고 이미 화농되어 농양을 형성하였으면 穿山甲, 皂角刺 등으로

穿之排膿하거나 清熱解毒, 托裏透膿하여야 하며, 이미 농양이 潰한 후에는 托裏排膿, 즉 補氣血과 敗毒法을 겸한 치료를 하여야 한다^{15,48)}.

加味芷貝散은 초기와 화농 후 농양을 형성했을 때 사용하는 처방으로 <東醫寶鑑>에서는 氣血이 몰려 막혀서 헤쳐지지 않아 생긴 乳癰으로 인한 통증에 사용한다고 하였는데, 9가지 構成藥物들 각각의 효능을 살펴보면 白芷는 祛風海表, 祛風濕, 痛竅止痛 및 消腫排膿 등, 貝母는 清熱化痰과 開鬱散結, 天花粉은 生津止渴, 降火潤燥 및 排膿消腫 등, 金銀花는 清熱解毒, 養血止血 및 散風熱 등, 皂角刺는 托毒排膿과 活血消癰, 穿山甲은 活血通經, 下乳 및 消腫排膿 등, 當歸는 補血, 活血調經 및 潤腸通便 등, 瓜蒌仁은 潤肺化痰과 滑腸通便, 그리고, 甘草는 清熱解毒, 潤肺止咳, 補脾益氣 및 調和諸藥 등의 효능이 있다^{20,49,50)}.

또한 構成藥物 각각의 실험적 결과를 살펴보면 白芷, 金銀花, 當歸 및 甘草는 항균, 항염, 면역조절 및 항산화 작용 등, 貝母와 皂角刺는 항균, 항염 및 항산화 작용 등, 天花粉과 瓜蒌仁은 항염, 면역조절 및 항산화 작용 등 그리고, 穿山甲은 면역조절 작용이 이미 보고된 바 있다⁵¹⁻⁷⁵⁾.

그러므로, 본 연구에서는 加味芷貝散 (GJS)의 *S. aureus*에 대한 in vitro 항균 활성 및 항염효과를 관찰하였고, *S. aureus*로 유발된 rat의 유방염에 대한 항감염 효과와 항염효과를 평가하였으며, 항균력은 ciprofloxacin과, 항염효과는 piroxicam과 각각 비교하였다.

세균 및 다양한 감염에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 기본적인 방법인 MIC를 ciprofloxacin과 GJS에 대해 각각

측정한 결과 *S. aureus*에 대한 ciprofloxacin의 MIC는 약 0.5 µg/ml로 기존 실험과 유사한 항균활성이 인정되었고^{33,76)}, GJS는 0.860±0.428(0.391-1.563) mg/ml로 0.860 mg/ml 이상에서 항균활성이 인정되었다.

한편, *S. aureus*에 의한 유방감염은 비교적 만성적 염증 경과를 거치게 되는데, 이는 *S. aureus*의 숙주 대식세포와 상피세포 내 생존 결과로 알려져 있고, 이를 효과적으로 제거하는 항생제가 비교적 드물어 대식세포의 면역활성과 세포보호를 위한 항산화 활성을 나타내는 물질을 유방염에 적용하고자 하는 다양한 연구들이 진행되고 있다^{46,77-79)}.

본 연구에서는 측정된 MIC를 바탕으로 대식세포인 Raw 264.7 cell과 상피세포인 MCF-7cell을 이용해 GJS의 세포내 세균 사멸효과와 상피세포 내 세균침투 저해효과를 측정하고, 그 효과를 ciprofloxacin과 비교분석한 결과 처리 농도 의존적으로 세포 내 *S. aureus* 사멸 증가효과가 관찰되어 항균 활성이 인정되었다.

*S. aureus*에 의해 유발되는 다양한 감염성 질환을 제어하기 위해서는 반드시 상피세포 내로의 세균 침투를 억제해야 하고, 이를 통해 명확한 항균력을 평가할 수 있는데^{37,38,80)}, 본 연구에서는 GJS와 ciprofloxacin가 처리 용량 의존적으로 상피세포 내 *S. aureus* 침투를 억제 효과가 관찰되어 우수한 항균력을 나타냈다.

또한 대식세포는 다양한 숙주의 방어와 항상성 유지에 관여하고, 초기 감염 시 cytokine을 생산하여 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포인데, in vitro 염증모델 실험에서는 LPS를 주로 사용한다^{81,82)}.

NO는 강한 활성을 나타내는 free radical의 일종으로 저농도에서는 면역계의 방

어인자인 반면에 고농도에서는 과잉 염증 반응 등의 병리반응을 일으킨다^{83,84)}.

TNF-α는 pro-inflammatory cytokine으로 다양한 염증관련 세포에서 분비되어 염증성 질환이나 자가면역질환에서 염증의 개시와 유지에 핵심적 역할을 하는 반면에 단핵구나 대식세포에서 분비되는 IL-6는 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로 IL-6의 수치는 염증성 병변에서 증가한다^{85,86)}.

본 연구에서 LPS를 통해 염증을 유발시킨 Raw 264.7 cell에 대한 piroxicam과 GJS의 세포생존율과 NO, TNF-α 및 IL-6 등을 측정한 결과, piroxicam의 ED₅₀이 16 µM(5.30 µg/ml)으로 나타나 이전의 보고와 유사한 항염효과가 인정되었고⁸⁷⁾, GJS 투여군에서도 증가된 NO, TNF-α 및 IL-6 등의 생성량을 현저히 억제하여 우수한 항염효과를 나타내었다.

1970년대 Chandler가 마우스의 유방감염모델을 최초로 보고한 이래 in vivo 모델에서의 장기조직 내 세균수의 변화에 대한 연구는 생체의 면역과 염증 반응의 복합적 매개에 대해 in vitro 방법보다 보다 정확하고 명확한 항균 및 항염력에 대한 정보를 제공해 주기 때문에 병리학적인 연구의 활용빈도가 높는데^{46,88,89)}, 본 연구에서 in vivo 모델의 유방 내에 *S. aureus*를 감염시킨 뒤 GJS를 투약 후 조직의 세균수를 측정한 결과 GJS는 모든 시간대에서 유의한 세균수의 감소가 관찰되어 우수한 항균력을 나타내었다.

MPO는 중성호성 백혈구에서 형성되는 효소로 다양한 염증반응의 지표로 이용되고, iNOS는 면역반응의 활성을 유발시켜 염증반응을 강화시키며, 감염 시 대식세포에서 분비되는 다양한 cytokine

은 감염에 대항하는 염증반응을 매개하는 반면에 과도한 분비는 치명적인 결과를 초래 할 수도 있어 다양한 cytokine의 적절한 제어가 in vivo 실험이나 임상에서는 필수적이다^{9,90,91)}.

본 연구에서 in vivo 모델의 유방 내에 *S. aureus*를 감염시킨 뒤 ciprofloxacin, piroxicam 및 GSJ 등을 투약한 후 MPO 함량과 iNOS, TNF- α 및 IL-6 등의 활성을 측정한 결과 iprofloxacin과 piroxicam은 각각 이전의 연구와 유사한 항감염효과와 항염효과가 인정되었고^{39,40)}, GSJ도 유방조직 내 MPO 함량과 iNOS와 TNF- α 의 활성에서 용량 의존적으로 유의한 감소가 인정되어 우수한 항염효과가 나타났다.

특히, 항염 효과가 인정된 piroxicam 10 mg/kg 투여군과 GSJ 500 mg/kg 투여군에서 생균수, MPO 함량, 그리고 iNOS, TNF- α 및 IL-6 등의 활성감소가 유사하게 나타나 GSJ가 piroxicam을 대체할 수 있는 천연물 소염제로 기대된다.

이상의 연구 결과에서 加味芷貝散은 in vitro 모델에서 항균 항염효과가 나타났고, LPS 유도 in vitro 실험과 *S. aureus* 유도 in vivo 모델에서 각각 과도한 cytokine 분비를 억제하는 항염효과를 나타내었으며, in vivo 모델에서 대식세포의 탐식능 및 세포내 사멸능은 강화시킨 연구 결과를 볼 때 加味芷貝散은 유방염에서 대한 항감염 효과와 소염효과를 동시에 갖추고 있는 임상에서 활용 가능한 치료제로 사료된다.

V. 결 론

加味芷貝散의 유방염에 대한 항균, 항

염, 면역조절 및 항산화 작용에 대해 in vitro 및 in vivo 효과를 *S. aureus*, MCF-7 cell, LPS로 활성화된 murine macrophage 세포인 Raw 264.7 cell 및 *S. aureus* 유방조직내 감염 rat 모델을 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GSJ는 MIC1/2, MIC 및 MIC $\times$ 2 농도에서 처리 용량 의존적인 *S. aureus*의 MCF-7 cell내 침투율 억제 및 Raw 264.7 cell내 사멸 증가효과가 인정되었다.
2. GSJ는 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 cell의 세포생존율의 증가와 NO, TNF- α 및 IL-6 생성량 억제가 투여 용량 의존적으로 인정되었다.
3. GSJ 250 및 500 mg/kg은 *S. aureus* 유방조직내 감염 in vivo 모델에서 관찰한 모든 시간대에서 투여 용량 의존적인 현저한 유방조직내 생균수의 감소와 함께 유방조직내 MPO, iNOS, TNF- α 및 IL-6 함량의 감소가 각각 인정되었다.
4. GSJ 500 mg/kg은 *S. aureus* 유방조직내 감염 in vivo 모델에서 ciprofloxacin 40 mg/kg 투여군과 유사한 항균활성을 나타내었으며, piroxicam 10 mg/kg 투여군과 유사한 항염 효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 250 mg/kg 이상의 GSJ는 항균, 항염, 면역조절 및 항산화 효과를 통해 *S. aureus* 유방조직내 감염 in vivo 모델에서 항감염 효과를 나타내었다.

□ 투 고 일 : 2013년 1월 23일

□ 심 사 일 : 2013년 2월 1일

□ 게재확정일 : 2013년 2월 8일

참고문헌

1. Foxman B et al. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol*. 2002;155(2):103-14.
2. 노동영 등. 양성유방질환의 임상적 역학적 연구. *대한외과학회지*. 1993;44(6):797-808.
3. Spencer JP. Management of mastitis in breastfeeding women. *Am Fam Physician*. 2008;78(6):727-31.
4. Franklin D. Lowy, M.D. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med*. 1998;339(8):520-32.
5. Grundmann H et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as public-health threat. *Lancet*. 2006;368(9538):874-5.
6. Kapil A. The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate. *Indian Journal of Medical Research*. 2005;121(2):83-91.
7. Okamoto R, Okubo T, Inoue M. Detection of genes regulating beta-lactamase production in Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2550-4.
8. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*. 1999;340(24):1888-99.
9. McDaniel ML et al. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;211(1):24-32.
10. 김대희 등. LPS로 활성화된 대식세포에서 黃連解毒湯 물추출물의 염증매개물질 억제효과. *大韓本草學會誌*. 2009;24:39-47.
11. 대한한방부인과학회. *한방여성의학*. 서울:의성당. 2013:818.
12. 李梴. *醫學入門*. 서울:翰成社. 1984:464.
13. 陳實功. *外科正宗*. 北京:인민위생출판사. 1983:30, 144-50.
14. 李定濟. *醫療要覽(上)*. 서울:동양의약연구원. 1974:383.
15. 陳自明. *校註婦人良方大全*. 臺北:文光圖書. 1989:71-5.
16. 張介賓. *景岳全書*. 서울:翰成社. 1983:725.
17. 武之望. *濟陰綱目*. 臺北:旋風出版社. 1977:557.
18. 葉桂. *葉天士女科全書*. 臺北:力行書局. 1975:118.
19. 吳謙 外. *醫宗金鑑*. 서울:대성문화사. 1983:236-7.
20. 許浚. *東醫寶鑑*. 서울:法仁文化社. 2005:1260.
21. 蕭損. *女科經綸*. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1986:332-8.
22. 萬病回春. 龔廷賢. 서울:일중사. 1991:120.
23. 장성환, 김운상, 임은미. 유선염의 한방 외치법에 대한 문헌 고찰. *대한한방부인과학회지*. 2002;15(3):177-22.
24. 이상현, 박찬기. 지폐산의 항염증 효능에 대한 연구. *대한한의학회지*. 2008;16(1):79-94.
25. 김정숙 등. 유옹에 활용되는 가감유기음에 대한 실험적 연구. *대한한방*

- 부인과학회지. 1995;8(1):115-30.
26. 백성준, 정진홍, 유동열. 유옹(乳癰)에 활용되는 가미소독음(加味消毒飲)의 진통(鎮痛), 소염(消炎)작용에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 1997;10(1):51-61.
27. 이한철. 加味芷貝散이 實驗動物의 鎮痛, 消炎, 解熱 및 抗菌에 미치는 影響. 원광대학교석사학위논문. 1998.
28. 최창민, 이종덕, 유성원. 비수유기 유선염 및 유방농양 환자 증례보고. 대한한방부인과학회지. 2006;19(2):295-304.
29. 이자영 등. 탁리소독음으로 치료한 유옹 환자 2례. 대한한방부인과학회지. 2007;20(4):191-201.
30. 서부일, 김민정. 산후우울증과 급성 율체성유선염 합병증 환자의 임상치료 1례. 대한본초학회지. 2003;18(1):145-8.
31. 황도연. 方藥合編. 서울:남산당. 1978:248-9.
32. Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, D.C.:The national academic press. 1985:162-6.
33. Pfaller MA et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(9):1648-54.
34. Tenover FC et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol. 1998;36(4):1020-7.
35. Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J Clin Microbiol. 1988;26(8):1437-41.
36. Cuffini AM et al. Enhanced Staphylococcus aureus susceptibility to immuno-defense induced by sub-inhibitory and bactericidal concentration of imipenem. J Antimicrob Chemotherp. 1993;31(4):559-68.
37. Almeida RA et al. Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci. 1996;79(6):1021-6.
38. Menzies BE, Kourteva I. Internalisation of Staphylococcus aureus by endothelial cells induces apoptosis. Infect Immunol. 1998;66(12):5994-8.
39. Guinea J et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of E-4868, a new fluoroquinolone with a 7-azetidin ring substituent. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(4):868-74.
40. Murase A et al. Effect of prostanoid EP4 receptor antagonist, CJ-042,794, in rat models of pain and inflammation. Eur J Pharmacol. 2008;580(1-2):116-21.
41. Zhong K et al. Establishment of experimental mastitis model by endotoxin via teat duct in rat. J Agric Biotechnol. 2005;13:654-8.
42. Kavutcu M et al. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. Nephron. 1996;72(2):269-74.
43. Lowry OH et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.
44. Gonen E et al. Toll-like receptor 4 is needed to restrict the invasion of

- Escherichia coli P4 into mammary gland epithelial cells in a murine model of acute mastitis. Cell Microbiol. 2007;9(12):2826-38.
45. Miao J et al. The effect of taurine on the toll-like receptors/nuclear factor kappa B (TLRs/NF- κ B) signaling pathway in Streptococcus uberis-induced mastitis in rats. Int Immunopharmacol. 2011;11(11):1740-6.
46. Zhu YM, Miao JF, Fan HJ, Zou SX, Chen WH. Protective effect of CpG-DNA against mastitis induced by Staphylococcus aureus infection in a rat model. Int Immunopharmacol. 2007;7(4):435-43.
47. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 태복:오주출판사. 1981:552.
48. 顧伯康. 中醫外科學. 북경:인민위생출판사. 1987:153-61.
49. 김동현 등. 한방약리학. 서울:신일상사. 2010:116-23, 134, 135, 167-72, 262-5, 325-8, 345-52, 689-92, 786, 787.
50. 김인락 등. 本草學. 서울:圖書出版 永林社. 2007:467-9.
51. Lechner D et al. The anti-staphylococcal activity of Angelica dahurica(Bai Zhi). Phytochemistry. 2004;65(3):331-5.
52. Lee MY et al. Anti-inflammatory activity of Angelica dahurica ethanolic extract on RAW264.7 cells via upregulation of heme oxygenase-1. Food Chem Toxicol. 2011;49(5):1047-55.
53. Lee MY et al. Anti-asthmatic effects of Angelica dahurica against ovalbumin-induced airway inflammation via upregulation of heme oxygenase-1. Food Chem Toxicol. 2011;49(4):829-37.
54. Kang SW et al. Rapid identification of furanocoumarins in Angelica dahurica using the online LC-MMR-MS and their nitric oxide inhibitory activity in RAW 264.7 cells. Phytochem Anal. 2010;21(4):322-7.
55. 신용규 등. 패모(Fritillaria thunbergii Miquel)의 항균, 항혈전 및 항산화 활성 평가. 생명과학회지. 2009;19(9):1245-50.
56. Cho IH et al. Fritillaria ussuriensis extract inhibits the production of inflammatory cytokine and MAPKs in mast cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(8):1440-5.
57. Ozaki Y, Xing L, Satake M. Antiinflammatory effect of Trichosanthes kirilowii Maxim. and its effective parts. Biol Pharm Bull. 1996;19(8):1046-8.
58. Cai Y et al. Trichosanthin enhances anti-tumor immune response in a murine Lewis lung cancer model by boosting the interaction between TSLC1 and CRTAM. Cell Mol Immunol. 2011;8(4):359-67.
59. Bhattacharya S et al. Antitumor efficacy and amelioration of oxidative stress by Trichosanthes dioica root against Ehrlich ascites carcinoma in mice. Pharm Biol. 2011;49(9):927-35.
60. 배지현, 김미순, 강은혜. 식중독 유발 세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지. 2005;37(4):642-7.
61. Ryu KH et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of SKLJI, a highly purified and injectable herbal

- extract of *Lonicera japonica*. Biosci Biotechnol Biochem. 2010;74(10):2022-8.
62. 한재섭, 박희수. 금은화약침(金銀花藥鍼)의 항암 및 면역반응에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2006; 23(4):205-18.
63. Choi CW et al. Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from Flos Lonicerae. Arch Pharm Res. 2007; 30(1):1-7.
64. Zhou L et al. Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. Nat Prod Res. 2007; 21(4):283-91.
65. Dai Y et al. Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from *Gleditsia sinensis*. Biol Pharm Bull. 2002;25(9):1179-82.
66. Chui CH et al. *Gleditsia sinensis* fruit extract induced growth inhibition involves basic fibroblast growth factor and nitric oxide. Int J Mol Med. 2004;13(1):169-73.
67. 정현우, 전병훈. 백선피와 천산갑이 인체 암세포주에 미치는 세포독성의 효과. 동의병리학회지. 1997;11(1):58-64.
68. Lee S et al. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. Arch Pharm Res. 2003;26(6):449-52.
69. Kim WJ et al. Decursinol angelate blocks transmigration and inflammatory activation of cancer cells through inhibition of PI3K, ERK and NF-kappaB activation. Cancer Lett. 2010;296(1):35-42.
70. Kim HM et al. Antidiabetic activity of angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. Arch Pharm Res. 2008; 31(11):1489-96.
71. Kim JH et al. Decursin prevents cisplatin-induced apoptosis via the enhancement of antioxidant enzymes in human renal epithelial cells. Biol Pharm Bull. 2010;33(8):1279-84.
72. Fukai T et al. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia. 2002;73(6):536-9.
73. Xie YC et al. Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice. Int Immunopharmacol. 2009;9(2):194-200.
74. Zhang L et al. Cardioprotective effects of *Glycyrrhiza uralensis* extract against doxorubicin-induced toxicity. Int J Toxicol. 2011;30(2):181-9.
75. Li J et al. Immunosuppressive activity on the murine immune responses of glycyrol from *Glycyrrhiza uralensis* via inhibition of calcineurin activity. Pharm Biol. 2010;48(10):1177-84.
76. Seral C, Van Bambeke F, Tulkens PM. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin(LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(7):2283-92.
77. Yancey RJ, Sanchez MS, Ford CW. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. Eur J Clin Microbiol

- Infect Dis. 1991;10(2):107-13.
78. Hebert A et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. FEMS Microbiol Lett. 2000;193(1):57-62.
79. Gruet P et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv Drug Deliv Rev. 2001;50(3):245-59.
80. Diarra MS et al. Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. Vet Immunol Immunopathol. 2003;95(1-2):33-42.
81. Lee YS et al. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response to *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 2000;10(1):8-15.
82. Chun SC et al. Anti-Inflammatory activity of the methanol extract of Moutan Cortex in LPS-activated Raw 264.7 Cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2007;4(3):327-33.
83. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999; 39:191-220.
84. Korhonen R et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005; 4(4):471-9.
85. Lee AK et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaB α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. Br J Pharmacol. 2003; 139(1):11-20.
86. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. 2003; 37(6):355-61.
87. Chen Y et al. CpG DNA induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. Int Immunol. 2001;13(8):1013-20.
88. Minamida K et al. Effects of ingestion of difructose anhydride III(DFA III) and the DFA III-assimilating bacterium *Ruminococcus productus* on rat intestine. Biosci Biotechnol Biochem. 2006;70(2):332-29.
89. Chandler RL. Experimental bacterial mastitis in the mouse. J Med Microbiol. 1970;3(2):273-82.
90. Xu XL et al. Mannose prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. Inflamm Res. 2008; 57(3):104-10.
91. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. Adv Pharmacol. 1995;34:71-90.