

## 升麻葛根湯加味方이 消炎작용에 미치는 영향

송성필 · 김진만 · 임규상 · 김남권 · 권일호  
원광대학교 한의과대학 안이비인후부과학교실

### Study on the Anti-inflammatory Effects of Seungmagalgeuntanggamibang(SMG)

Seong-Pil Song · Jin-man Kim · Kyu-sang Lim · Nam-kwen Kim · Il-ho Kwen

This study was carried out to investigate the effects of SMG on the in vitro and in vivo inflammatory reactions. In experiment 1, in vitro tests, ethanol extract of SMG showed potent radical scavenging activity tested by DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl) method and inhibited the lipopolysaccharide-induced gene expressions of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (above 50% at a concentration of 50 $\mu$ g/ml) by the macrophage RAW 246.7 cells. Among the herbal ingredients of SMG, ethanol extracts of Scutellaria baicalensis, Paeonia lactiflora, Glycyrrhiza glabra showed potent radical scavenging activity. And Glycyrrhiza glabra and Scutellaria baicalensis showed potent inhibitory activity of nitric oxide production. Especially, ethanol extract of Scutellaria baicalensis inhibited the gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . In cyclooxygenase-2 assay, Scutellaria baicalensis and Glycyrrhiza glabra showed the potent inhibition of prostaglandin E2 generation. In experiment 2, in vivo tests, SMG showed inhibitory effects on vascular permeability (28.7%) and leukocyte migration (11.5%). These results mean that SMG has a anti-inflammatory effects by it's inhibitory effects of leukocyte migration and vascular permeability as well as it's inhibitory effects of lipopolysaccharide-induced gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , and radical scavenging activity. Therefore, I expect that SMG may be used as a effective drug for treatment on inflammation.

**Key words** : Seungmagalgeuntanggamibang, Anti-inflammatory

### 서론

升麻葛根湯은宋代錢<sup>1)</sup>의 <小兒藥證直訣>에 “治

傷寒, 溫疫, 風熱, 壯熱, 頭痛, 肢體痛, 瘡疹而發已發, 并宜服之”라 하여 처음 수록된 이후, 많은 醫家들<sup>2-15)</sup>에 의해 傷寒瘟疫, 痘瘡, 麻疹, 陽證發斑 등을 치료하는데 사용되었다.

교신저자: 송성필, 원광대학교 한의과대학  
안이비인후부과학교실  
(E-mail: sspil72@hanmail.net)

炎症(inflammation)은 “균의 감염, 열, 외상, 항원 항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전”라고 정의하고 있다<sup>16)</sup>.

nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 피부염증과 관절염을 비롯한 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제시키는 것이 중요하다<sup>16,20)</sup>.

한의학에서 炎症反應은 正邪鬪爭의 결과로 體內에 나타나는 病理的 현상중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이며, 正은 正氣로 六淫 食積 痰飲 등의 邪氣에 對應하는 人體一切의 抗病力 및 정상적인 生理機能을 總稱하고 邪는 邪氣로 發病因子를 總稱한다<sup>21,22)</sup>.

升麻葛根湯에 대한 응용으로 李<sup>9)</sup>는 牛蒡子 荊芥 防風을 加하여 隱疹에, 金<sup>23)</sup>은 牛蒡子 荊芥 防風 連翹 石膏 黃芩 薄荷를 加하여 風熱로 인한 皮膚赤爛 斑疹 등의 피부질환에, 蔡<sup>24)</sup>는 牛蒡子 荊芥 防風 連翹 石膏 黃芩 薄荷를 加하여 隱疹風毒에, 姜<sup>25)</sup>은 加味升麻葛根湯으로 아토피 피부염에 응용한 보고가 있다.

升麻葛根湯에 대한 실험적 연구로 金 등<sup>26)</sup>은 抗 allergy 및 면역반응, 金 등<sup>27)</sup>은 抗histimine 효과, 姜 등<sup>28)</sup>은 鎮痛 解熱 消炎 抗histimine 효능 등을 보고 하였다.

消炎작용이 있는 한약재에 대한 연구로는 枳實<sup>29)</sup>, 獨活<sup>30)</sup>, 蒲公英<sup>31)</sup>, 蛇床子<sup>32)</sup>, 斑猫<sup>33)</sup>, 雙和湯<sup>34)</sup>, 疎風活血湯<sup>35)</sup>, 瓊玉膏<sup>36)</sup>, 清熱消毒飲<sup>37)</sup>, 加味芷貝散<sup>38)</sup>, 靈仙除痛飲<sup>39)</sup>, 秘方奪命散<sup>40)</sup>등이 있다.

이에 저자는 升麻葛根湯에 清熱解毒, 除濕 효능이 있는 柴胡 黃芩 黃連 梔子 木通을 加味하여, 실험동물 model에서 消炎효과를 확인하기 위해 ICR mouse를 이용한 모세혈관투과성 억제실험과 백혈구 유주억제 실험을 실시하였으며, 피부염증을 비롯한 염증의 발생과 치료에 미치는 영향을 평가하기 위해 升麻葛根湯加味方과 그 원료 한약재 추출물들이 피부질환관련 미생물에 미치는 영향, 항산화, nitric oxide 생성억제, 염증관련 cytokine 유전자 발현 억

제, cyclooxygenase II 활성억제에 미치는 영향 및 세포독성 등을 in vitro 실험에서 평가하고, 모세혈관 투과성 억제력과 백혈구 유주 억제력 등의 동물실험을 실시해 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 동물

升麻葛根湯加味方の 모세혈관 투과성과 백혈구 유주 억제력 평가를 위한 실험에는 생후 5주령된 ICR mouse (대한실험동물, 충북)를 구입해 사용하였다. 실험동물의 사육조건은 온도 23±2℃, 습도 55±5%, 조명 12시간 cycle(07:00-19:00), 조도 200-250Lux의 조건에서 고형사료(조단백질 22.5% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 7.0% 이상, 조회분 10.0% 이상, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상; 제일사료, 한국)와 물을 자유 섭취토록 하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중의 변화 등에 이상 증상이 없는 동물만을 실험에 사용하였다.

#### 2) 升麻葛根湯加味方の 처방 내용 및 검액의 제조

실험에 사용된 升麻葛根湯加味方の 처방내용은 Table 1과 같다. 실험에 사용된 모든 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입하였으며, 1첩 분량을 2,000ml의 증류수에 1시간동안 침지시킨 후, 2시간 30분 동안 전탕하고, 여과포로 여과한 후 rotary evaporator를 이용해 300ml로 농축하였다.

원료 한약재들의 추출액은 약재 1斤 분량을 한약재 분쇄기를 이용해 100-200메쉬 크기로 분쇄시킨 후 ethanol을 약 2,500ml(1:5 weight/volume)을 가하여 5일간 냉침하여 추출하였다. 추출한 약재는 Whatman

filter paper No. 4를 사용해 고형분을 제거한 후, rotary evaporator를 이용해 감압 농축시키고, 70% ethanol을 이용해 5% 용액으로 제조하면 후 회석해 실험에 사용하였다.

Table 1. Prescription of Seungmagalgeuntanggambang(SMG) Per Pack

한약명	학 명	1침분량(g)
升 麻	Cimicifuga heracleifolia Komarov	8g
柴 胡	Bupleurum falcatum L.	8g
葛 根	Pueraria lobata Ohwi	8g
白芍藥	Paeonia lactiflora Pallas	8g
梔 子	Gardenia jasminoides Elli	8g
黄 芩	Scutellaria baicalensis Georgi	8g
黄 連	Coptis japonica Makin	4g
木 通	Akebia quinata Decaisn	4g
甘 草	Glycyrrhiza glabra L.	4g

### 3) 미생물 균주

피부질환 관련 미생물에 대한 항균력 평가를 위해 사용한 표준균주로는 *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Corynebacterium xerosis* (ATCC 7711), *Pityrosporum ovale* (ATCC 14521), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC), *Candida albicans* (ATCC 10231) 등을 사용하였다.

### 4) 시약 및 기기

한약추출물의 항균력 평가를 위한 실험에는 brain heart infusion (BHI), Sabouraud dextrose agar, peptone, yeast extract, ox bile, bacto agar (이상 Difco, U.S.A), glucose, tween 60, glycerol monostearate, olive oil, tween 80 (이상 Sigma, U.S.A) 등을 사용하였다. 항균력을 비록한 in vitro 실험 시약으로는 Dulbeccos modified Eagle medium(DMEM), RPMI 1640, fetal bovine serum (FCS), antibiotic-antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulfate, amphotericin B), trypsin-EDTA (이상 Gibco BRL, U.S.A), sodium bicarbonate, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl), butylated hydroxy-toluene (BHT), lipopolysaccharide (LPS), GRIESS reagent, ibuprofen, evans blue, guanidinium thiocyanate, sodium

acetate, sarcosine, mercaptoethanol, ethidium bromide, glacial acetic acid, phenol, chloroform, isopropanol (이상 Sigma, U.S.A), M-MLV reverse transcriptase, recombinant RNasin ribonuclease inhibitor, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), random hexamer, Taq polymerase (이상 Promega, U.S.A), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cayman, USA), 등을 사용하였다.

본 실험에 이용한 실험 초자로는 96 well과 24 well tissue culture plate, 100mm와 60mm tissue culture dish (이상 Falcon, USA), eppendorf tube (Sarstedt, Germany) micro amp reaction tube, micro amp caps (Applied Biosystems, U.S.A.) 등을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기로는 rotary evaporator system (BÜCHI, Switzerland), CO2 Incubator (Forma, USA), inverted microscope, microscope (Nikon, Japan), clean bench (수공양행, 한국), autoclave (Hirayama, Japan), spectrophotometer (Beckman, USA), ELISA reader (BioTek, USA), refrigerated microcentrifuge, microcentrifuge (이상 한일과학, 한국), GeneAmp PCR system (PERKIN ELMER, U.S.A), polaroid camera (Polaroid, U.K.), image master (Pharmacia Biotek, U.S.A.), electrophoresis system (Hofer, U.S.A.), transilluminator (Vilber Loumat, France), micropipit (Gilson, France) 등을 사용하였다.

## 2. 實驗方法

### 1) 피부질환관련 미생물에 대한 항균력 평가

-70℃에서 냉동보관중인 균주들을 실험개시 3일 전 액상배지에 접종한 후 *P. acnes*의 경우 anaerobic chamber에서, *S. aureus*, *C. xerosis*, *P. ovale*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans*의 경우 37℃ incubator에서 전 배양하였다. 이때 사용한 성장배지로는 *P. acnes*, *S. aureus*, *C. xerosis*의 경우 brain heart infusion (BHI), *P. ovale*의 경우 peptone-glucose (peptone, glucose, yeast extract, ox bile, glycerol, tween 60, glycerol monostearate, 전지분유), *T. mentagrophytes*와 *C. albicans*의 경우 Sabouraud dextrose

배지를 사용하였다. 전 배양한 균액은 각 균주마다 동일한 액상배지를 이용해 1/100로 희석한 후 0.5ml 을 취해 agar가 포함된 고체 성장배지에 각각 도포 하였다. 한약재추출물의 항균력 평가는 한약재추출 물 1% 용액을 40 $\mu$ l씩 8mm paper dish 위에 가지고 clean bench에서 수분을 날려 보낸 후, 준비한 고체 성장배지에 올려놓고 1-3일간 배양하며, paper disk 주변에 생긴 균의 성장억제 영역의 지름을 측정하여 평가하였다<sup>41)</sup>.

Paper disc법에서 clear zone이 13mm 이상으로 항 균력을 보인 추출물들의 경우 정확한 항균력 평가를 위해 minimum inhibition concentration (MIC)를 측정하였다. MIC 측정은 성장배지를 이용해 5-0.005% 까지 2-fold dilution한 한약재추출물에 전 배양한 해당균주를 105-106 colony forming units/ml의 농도로 희석해 첨가 한 후 1-3일간 배양하며, 균의 성장을 억제한 희석액의 최저 농도를 측정해 MIC로 결정하였다<sup>41)</sup>.

## 2) 항산화력평가

항산화력은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)법을 이용해 평가하였다. 무수에탄올로 0.01%와 0.001%로 희석한 升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재 추출액 1 ml에 0.1mM DPPH용액 1ml을 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 반응시킨 후, 반응물의 흡광도를 spectrophotometer로 516nm에서 측정하였다. 양성대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을, 음성대조군으로는 무수에탄올을 사용하였다<sup>42,43)</sup>.

## 3) Nitric oxide(NO) 형성 억제력 평가

RAW264.7 세포주 (ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 NO 형성억제력 실험을 실시 하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 5x10<sup>4</sup>cells/ml의 농도로 seeding하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 인산염완충용액으

로 2회 세척한 후, phenol red를 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재 추출액을 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도로 가해 1시간 동안 처리하였다. Lipopolysaccharide를 1 $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 48시간 배양한 후, 상층액을 100 $\mu$ l씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100 $\mu$ l씩 가해 상온에서 5분간 반응시킨 후 ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다<sup>44,45)</sup>.

## 4) Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 및 tumor necrosis factor- $\alpha$ 유전자 발현 억제력 평가 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction : RT-PCR)

Monolayer를 형성한 RAW 264.7 세포를 60mm dish 에 1X10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 seeding하여 90% 정도까지 성장할 때까지 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포배양액을 교체하고, 70% ethanol 로 희석한 升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재 추출 액을 dish당 10 $\mu$ l씩 가하여 3시간동안 처리하였다<sup>46)</sup>. 이때 대조군으로는 70% ethanol을 사용하였다.

### (1) Total RNA 분리

RAW 264.7 세포로부터 total RNA를 분리하는 과정은 guanidinium thiocyanate-phenol chloroform법<sup>47)</sup>에 준하여 실시하였다. 즉 시료를 처리한 배지를 제거한 후 RNA Solubilizing Solution (Denaturing Solution\*: Phenol: 2M Sodium Acetate = 1 volume: 1 volume: 0.1 volume) 1ml을 가하여 녹인 후 micropipet으로 잘 섞고 eppendorf tube로 옮겼다. Chloroform을 200 $\mu$ l 가하여 1분간 세차게 흔든 후 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하고 원심분리(14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)하고, 상층액을 취하여 새 eppendorf tube에 옮겼다. Isopropanol을 700 $\mu$ l 가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치시킨 후 원심분리 (14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)하여 상층액을 버리고 침전물을 75% ethanol로 1회 세척한 후, DEPC처리된 이온 교환수 20 $\mu$ l을 가하여 녹였다. 이중 일부를 취하여 spectrophotometer로 260과 280nm에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

\* Denaturing solution :

- 4M guanidinium thiocyanate,
- 25mM sodium citrate, pH7.0,
- 0.5% sarcosin,
- 0.1M 2-mercaptoethanol

(2) RT-PCR

분리한 total RNA 4 $\mu$ g를 eppendorf tube에 넣고 random hexamer (10pmol/20 $\mu$ l)를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 여기에 반응액 (1x buffer, 100uM dNTPs, 200unit RTase)을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후, 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하여 reverse transcription 반응을 종료시켰다.

Polymerase chain reaction은 PCR tube에 상기한 RT반응액과 PCR반응액 (PCR buffer, 200uM dNTPs, primer 20pmol, Taq polymerase 2.5 units)을 가하여 PCR machine에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 조건으로 실시하였다. 이때 PCR반응에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 2에 정리하였으며, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 각각 30회씩 증폭하였다.

RT-PCR 결과는 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에 올려놓고 polaroid camera를 이용해 사진 촬영하였으며, 그 결과는 densitometer를 이용해 판정하였다.

Table 2. Nucleotide Sequence of the Primers and Expected Size of PCR products.

	Primer	Sequence	Size
IL-1 $\beta$	Sense	5'-TCT TTG AAG TTG ACG GAC CC-3'	486
	Anti-sense	5'-AGG CCA CAG GTA TTT TGT CG-3'	
IL-6	Sense	5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'	500
	Anti-sense	5'-TGG TCT TGG TCC TTA GCC AC-3'	
TNF- $\alpha$	Sense	5'-AGT TCT ATG GCC CAG ACC CT-3'	484
	Anti-sense	5'-CGG ACT CCG CAA AGT CTA AG-3'	

5) Cyclooxygenase II 활성 억제력 평가

C57BL6 mouse의 복강에 차가운 phosphate buffered saline (PBS) 5ml을 가하고 약 2분간 마사지 한 후 주사기를 이용해 대식세포가 들어있는 복강액을 회수하였다. 복강액을 2회 세척한 후 RPMI 1640 배지로 106 cell/ml의 농도로 현탁시킨 후 aspirin을 최종농도가 500uM이 되도록 첨가하여 세포내에 잔존하고 있는 COX를 억제시켰다. 회석액을 96 well plate에 105 cell/well의 농도로 seeding한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO2 incubator에서 3시간 배양하여 부착시킨 후 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 3% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 well당 200 $\mu$ l씩 첨가하였다. LPS와 升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재 추출액을 well당 10 $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO2 incubator에서 8시간 배양한 후, 상층액을 취해 Prostaglandin E2 EIA Kit (Cayman, USA)를 이용해 Prostaglandin E2를 정량하였다<sup>48)</sup>.

6) 세포독성 평가

V79-4 cell line(ATCC number:CCL-93)을 이용해 MIT법으로 세포독성을 평가하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 V-79 cell을 96 well plate에 5x10<sup>5</sup>cells/ml의 농도로 seeding하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FCS를 첨가하지 않은 배지에 20-500 $\mu$ g/ml으로 희석한 升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재 추출액을 첨가하고 24시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 MIT용액을 1 $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시켰다. 미반응된 MIT 용액을 제거하고 ethanol 100 $\mu$ l를 가해 형성된 반응물을 용해시킨 후, ELISA reader로 560nm와 640nm에서의 흡광도를 측정해 세포독성의 정도를 측정하였다<sup>49)</sup>.

7) 모세혈관 투과성 억제 실험

생후 5주령의 ICR mouse를 실험에 사용하였다. 실험개시 전 하루동안 절식시킨 후 음성대조군은

생리식염수, 실험군(n=6)은 升麻葛根湯加味方 농축액, 양성대조군(n=6)은 aminopyrine을 1회, 1ml씩 경구투여하였다. 시료투여 30분 후 생리식염수에 녹인 evans blue용액을 실험동물 10g당 0.1ml의 용량으로 정맥주사하고, 20분 후 생리식염수에 희석한 0.6% acetic acid를 실험동물의 체중 10g당 0.1ml의 용량으로 복강주사하였다. 20분 후 경추탈골법으로 실험동물을 도태시킨 후 개복하고 생리식염수 5ml을 복강에 가한 후, 복강 내로 용출된 evans blue를 취해 원심분리 (2,000rpm/1분)하였다. 모세혈관 투과성은 원심분리한 용출액의 상층액을 취해 ELISA reader로 630nm에서 흡광도를 측정해 대조군과 비교해 평가하였다<sup>50)</sup>.

#### 8) 백혈구 유주 억제 실험

생후 5주령의 ICR mouse를 실험에 사용하였다. 실험개시 전 하루동안 절식시킨 후 음성대조군은 생리식염수, 실험군(n=6)은 升麻葛根湯加味方 농축액, 양성대조군(n=6)은 aminopyrine을 1회 경구투여하였고, 시료투여 30분 후 인산염완충액으로 1mg/ml로 제조한 zymogen 1ml을 복강주사하고, 6시간 후 경추탈골법으로 실험동물을 도태시킨 후, 개복하여 4℃ 생리식염수 2ml을 복강에 가하였다. 복강을 가볍게 마사지 한 후, 복강 내로 삼출된 백혈구를 취하여 coulter counter로 백혈구 수를 측정하고 대조군과 비교해 평가하였다<sup>51,52)</sup>.

## 실험결과

### 1. 피부질환관련 미생물에 대한 항균력 평가

升麻葛根湯加味方 추출물이 피부질환관련 미생물에 미치는 영향을 평가하기 위해 여드름의 원인균으로 알려진 P.acnes, 비듬의 원인균인 P.ovale, 액취증의 원인균인 C.xerosis, 농가진의 원인균으로 알려

진 S.aureus, 칸디다증의 유발균으로 알려진 C.albicans, 그리고 무좀의 원인균으로 알려진 T.mentagrophytes에 대한 항균력을 paper disk법으로 평가한 결과, 升麻葛根湯加味方추출물은 무좀은 원인균으로 알려진 T.mentagrophytes에 대해서는 10mm의 clear zone을 형성해 미미한 항균력을 보였으나, 다른 균들에 대해서는 항균력이 없었다(Fig.1).

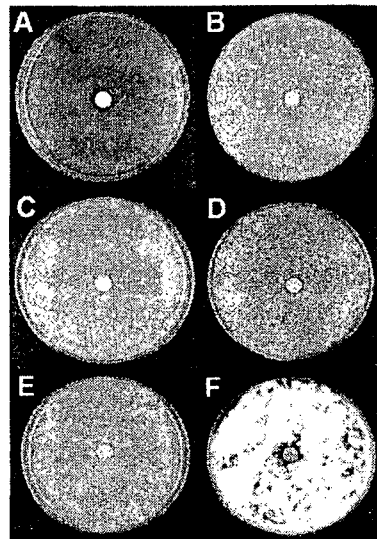


Fig 1. Anti-microbial activities of SMG extract on (A) *P. acnes* (B) *P. ovale* (C) *S. aureus* (D) *C. xerosis*, (E) *C. albicans* and (F) *T. mentagrophytes*

### 2. 항산화력 평가

DPPH 법으로 측정된 升麻葛根湯加味方 추출물의 radical scavenging activity는 0.01%에서 56.1%로, 양성대조군으로 사용한 BHT보다는 약간 떨어지지만 우수한 항산화력을 지닌 것으로 평가되었다 (Table 3, Fig. 2).

Table 3. Radical Scavenging Activities of SMG Extracts.

Group	Concentration	Absorbance <sub>516</sub>	Radical Scavenging
			Activity
Control		0.4756	-
B H T	0.001%	0.4047	14.9 %
	0.01%	0.1695	64.4 %
SMG Extract	0.001%	0.4286	9.9 %
	0.01%	0.2087	56.1 %

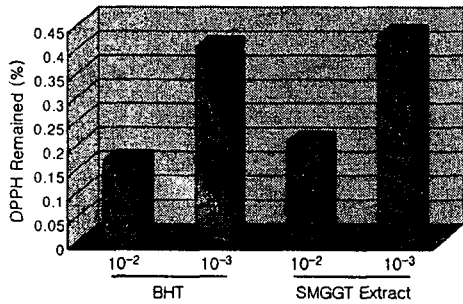


Fig 2. Radical Scavenging Activities of SMG Extracts

升麻葛根湯加味方的 모든 성분 한약재추출물을 대상으로 항산화력을 평가한 결과 白芍藥, 黃芩 및 甘草 추출물이 0.01%의 농도에서 80% 이상의 우수한 radical scavenging effect를 보였으며, 升麻, 葛根 및 梔子추출물도 50% 이상의 항산화효과를 지닌 것으로 조사되었다 (Table 4, Fig. 3).

Table 4. Radical Scavenging Activities of Herbal Extracts.

Herbal Extracts	Concentration	Radical Scavenging Activity
升麻	0.01%	62.4%
( <i>Cimicifuga heracleifolia</i> )	0.001%	8.8%
柴胡	0.01%	0.8%
( <i>Bupleurum falcatum</i> )	0.001%	0%
葛根	0.01%	53.3%
( <i>Pueraria lobata</i> )	0.001%	8.1%
白芍藥	0.001%	96.2%
( <i>Paeonia lactiflora</i> )	0.01%	25.7%
梔子	0.001%	53.3%
( <i>Gardenia jasminoides</i> )	0.01%	18.2%
黃芩	0.001%	94.8%
( <i>Scutellaria baicalensis</i> )	0.01%	21.8%
黃連	0.001%	43.6%
( <i>Coptis japonica</i> )	0.01%	5.1%
木通	0.001%	69.6%
( <i>Akebia quinata</i> )	0.01%	13.3%
甘草	0.001%	85.7%
( <i>Glycyrrhiza glabra</i> )	0.01%	15.8%

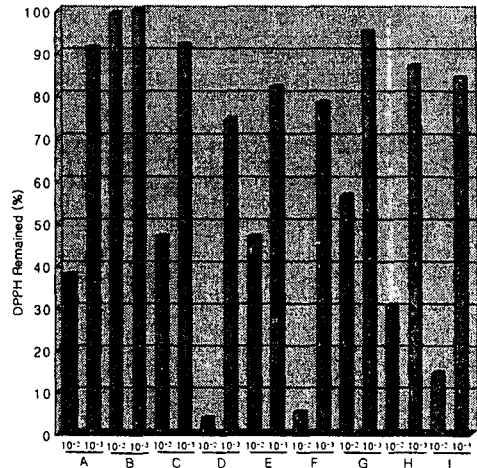


Fig 3. Radical Scavenging Activities of Herbal Extracts.

A: 升麻(*Cimicifuga heracleifolia*), B: 柴胡(*Bupleurum falcatum*), C: 葛根(*Pueraria lobata*), D: 白芍藥(*Paeonia lactiflora*), E: 梔子(*Gardenia jasminoides*), F: 黃芩(*Scutellaria baicalensis*), G: 黃連(*Coptis japonica*), H: 木通(*Akebia quinata*), I: 甘草(*Glycyrrhiza glabra*)

### 3. Nitric oxide (NO) 생성 억제력 평가

RAW 264.7세포를 이용해 GRIESS법으로 升麻葛根湯加味方 추출물의 NO 생성억제력을 평가한 결과, 50µg/ml과 5µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 NO의 생성을 각각 31.7%와 16.3% 억제시켜, 升麻葛根湯加味方 추출물은 약한 NO 생성억제 효과를 지닌 것으로 조사되었다(Table 5, Fig. 4).

Table 5. Inhibitory Effects of NO Synthesis by SMG Extracts.

Sample	Concentration	Absorbance (Average±SD)	Reduction Rate
Control		0.268±0.022	-
Lipopolysaccharides		0.645±0.018	-
SMG Extract	50 µg/ml	0.526±0.001	31.7%
	5 µg/ml	0.584±0.006	16.3%

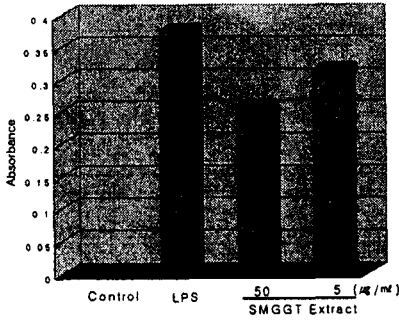


Fig 4. Inhibitory Effects of NO synthesis by SMGGT Extract.

升麻葛根湯加味方の 처방된 모든 한약재를 대상으로 NO형성 억제력을 평가한 결과 甘草추출물이 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 각각 55.8%와 21.7% 억제시켜 NO형성 억제효과가 가장 우수하였고, 黄芩추출물이 44.8%, 14.2% 억제시켰다 (Table 6, Fig. 5).

Table 6. Inhibitory Effects of NO synthesis by Herbal Extracts.

	Sample	Concentration	Absorbance (Average $\pm$ SD)	Reduction Rate (%)
1st Test	Control		0.063 $\pm$ 0.005	-
	Lipopolysaccharides		0.277 $\pm$ 0.016	-
	葛根 (Pueraria lobata)	50 $\mu\text{g/ml}$	0.250 $\pm$ 0.045	12.8
		5 $\mu\text{g/ml}$	0.242 $\pm$ 0.015	16.4
	甘草 (Glycyrrhiza glabra)	50 $\mu\text{g/ml}$	0.158 $\pm$ 0.005	55.8
		5 $\mu\text{g/ml}$	0.231 $\pm$ 0.005	21.7
	白芍藥 (Paeonia lactiflora)	50 $\mu\text{g/ml}$	0.262 $\pm$ 0.022	7.2
		5 $\mu\text{g/ml}$	0.301 $\pm$ 0.015	-11.2
	Control		0.268 $\pm$ 0.022	-
	Lipopolysaccharides		0.645 $\pm$ 0.018	-
3rd Test	黄連 (Coptis japonica)	50 $\mu\text{g/ml}$	0.683 $\pm$ 0.012	-10.2
		5 $\mu\text{g/ml}$	0.636 $\pm$ 0.017	25
	木通 (Akebia quinata)	50 $\mu\text{g/ml}$	0.603 $\pm$ 0.021	11.1
		5 $\mu\text{g/ml}$	0.658 $\pm$ 0.035	-3.5
	梔子 (Cardenia jasminoides)	50 $\mu\text{g/ml}$	0.739 $\pm$ 0.057	-24.9
		5 $\mu\text{g/ml}$	0.765 $\pm$ 0.058	-31.9

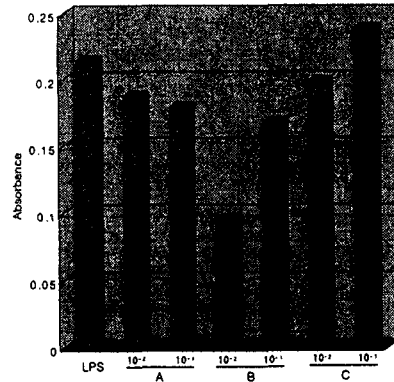


Fig 5. Inhibitory Effects of NO synthesis by Herbal Extracts.

A: 葛根 (Pueraria lobata), B: 甘草 (Glycyrrhiza glabra) C: 白芍藥 (Paeonia lactiflora)

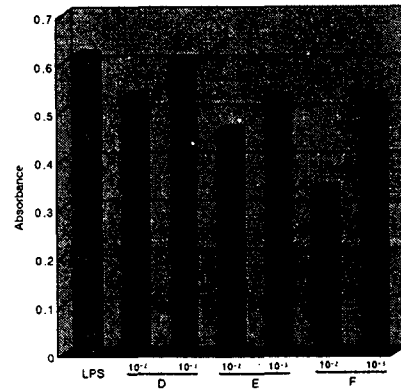


Fig. 5 - Continued.

D: 升麻 (Cimicifuga heracleifolia), E: 柴胡 (Bupleurum falcatum), F: 黄芩 (Scutellaria baicalensis)

#### 4. RT-PCR 결과

升麻葛根湯加味方 추출물과 NO 생성 억제실험에서 우수한 효과를 보인 黄芩 및 甘草추출물이 RAW264.7세포에서 LPS의 자극을 받아 생성하는 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과는 다음과 같다.



1) 黄芩 추출물의 효과 평가

黄芩 추출물은 50 $\mu$ g/ml와 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-1 $\beta$ 과 IL-6 유전자의 발현을 100% 억제시켰고, 그리고 TNF- $\alpha$  유전자 발현을 75.0%와 67.2% 억제시켰다 (Table 7-B, Fig. 6, 7-B)

2) 甘草 추출물의 효과 평가

甘草추출물은 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6 유전자 발현을 30.4% 억제시키는 효과가 있었으나, IL-1 $\beta$  와 TNF- $\alpha$  유전자의 경우 효과가 거의 없었다(Table 7-A, Fig. 6, 7-A).

3) 升麻葛根湯加味方 추출물의 효과

升麻葛根湯加味方 추출물은 50 $\mu$ g/ml와 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6 유전자 발현을 100% 억제시키고, IL-1 $\beta$  유전자 발현은 89.3%와 71.3%, 그리고 TNF- $\alpha$  유전자 발현은 각각 75.7%와 53.1% 억제시켰다 (Table 7-C, Fig. 6, 7-C).

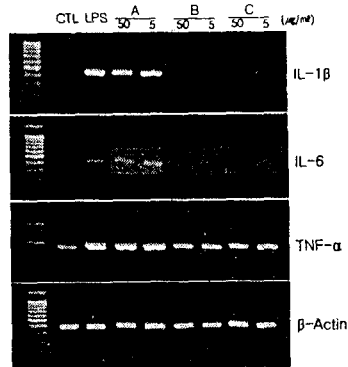


Fig 6. Effects of (A) Glycyrrhiza glabra, (B) Scutellaria baicalensis and (C) SMG Extracts on the mRNA Levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  in Cultured RAW 264.7 Cells by RT-PCR.

Table 7. Quantification of RT-PCR products for each cytokines.

(A)			
甘草 추출물 (Glycyrrhiza glabra)	Density of mRNA Expression		
	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
Control	0	0	129
Lipopolysaccharide	289	89	306
50 $\mu$ g/ml	237	62	287
5 $\mu$ g/ml	278	93	285
(B)			
黄芩 추출물 (Scutellaria baicalensis)	Density of mRNA Expression		
	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
Control	0	0	129
Lipopolysaccharide	289	89	306
50 $\mu$ g/ml	0	0	175
5 $\mu$ g/ml	0	0	187
(C)			
SMG Extract	Density of mRNA Expression		
	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
Control	0	0	129
Lipopolysaccharide	289	89	306
50 $\mu$ g/ml	31	0	172
5 $\mu$ g/ml	54	0	212

- (A) 甘草 추출물(Glycyrrhiza glabra)
- (B) 黄芩 추출물(Scutellaria baicalensis)
- (C) SMG extract.

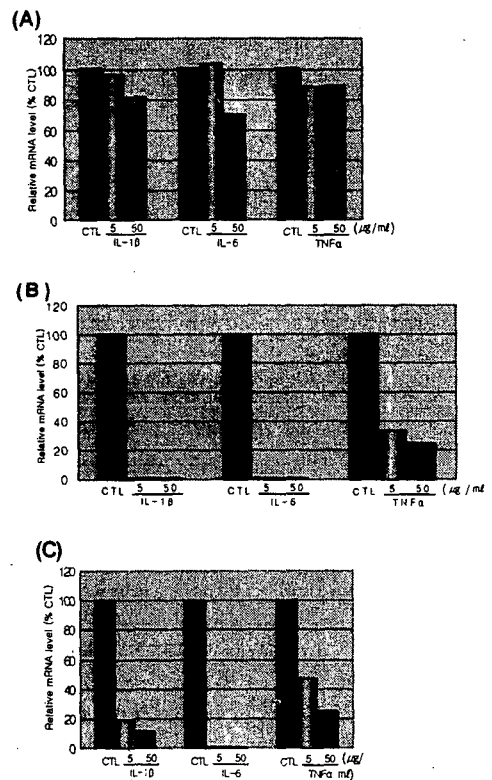


Fig 7. Quantification of RT-PCR Products for Each Cytokines.

- (A) 甘草 추출물 (Glycyrrhiza glabra)
- (B) 黄芩 추출물 (Scutellaria baicalensis )
- (C) SMG extract.

5. Cyclooxygenase II (COX-II) 활성 억제력 평가

升麻葛根湯加味方 추출물과 그 원료 한약재추출물들이 COX II 효소의 활성억제에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용해 평가한 결과, 실험을 실시한 9종 중 黃芩과 甘草추출물이 시험농도인 10 $\mu$ g/ml에서 COX II 효소의 활성을 70% 이상 억제시켰다. 그러나 柴胡추출물을 白芍藥과 木通 추출물중은 COX II 활성억제 효과가 거의 없었으며, 이들 한약재들로 이루어진 升麻葛根湯加味方 추출물은 10 $\mu$ g/ml에서 COX II 효소의 활성을 23% 억제시켰다 (Table 8, Fig. 8).

Table 8. Inhibitory Effects of COX II by Herbal and SMG Extracts.

한약명	학 명	PGE2 (ng/ml)	Inhibition of PGE2 release (%)
	Control	86	-
	Lipopolysaccharides	125	-
升 麻	Cimicifuga heracleifolia	119	14
柴 胡	Bupleurum falcatum	127	< 10
葛 根	Pueraria lobata	107	45
白芍藥	Paeonia lactiflora	141	< 10
梔 子	Gardenia jasminoides	112	33
黃 芩	Scutellaria baicalensis	92	76
黃 連	Coptis japonica	116	23
木 通	Akebia quinata	136	< 10
甘 草	Glycyrrhiza glabra	96	74
	SMG Extracts	116	23

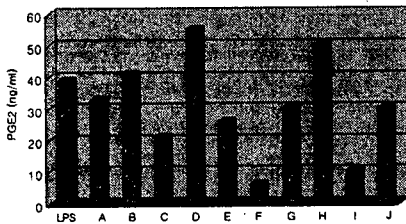


Fig 8. Inhibitory Effects of COX II by Herbal and SMG Extracts.

A: 升麻(Cimicifuga heracleifolia), B 柴胡(Bupleurum falcatum), C 葛根 (Pueraria lobata), D 白芍藥(Paeonia lactiflora), E: 梔子(Gardenia jasminoides), F: 黃芩(Scutellaria baicalensis), G 黃連(Coptis japonica), H 木通(Akebia quinata), I: 甘草(Glycyrrhiza glabra), J: SMG Extract.

6. 세포독성 평가

V79-4 세포를 이용한 MTT법으로 升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재 추출물의 세포독성을 평가한 결과 葛根, 白芍藥, 梔子 및 黃芩추출물의 경우 MTT50(전체 세포의 반을 치사시키는 농도)이 500 $\mu$ g/ml 이상으로 세포독성이 가장 적었으며, 黃連추출물은 300 $\mu$ g/ml 이상, 升麻, 柴胡, 甘草추출물은 100 $\mu$ g/ml 이상이었고, 木通의 경우 50 $\mu$ g/ml으로 실험을 실시한 한약재중 세포독성이 가장 강한 것으로 조사되었다. 또 이들 한약재가 처방된 升麻葛根湯加味方추출물의 세포독성(MTT50)은 430 $\mu$ g/ml이었다 (Table 9).

Table 9. Cytotoxicity of Herbal and SMG Extracts .

한약명	Herbal Extract	MTT50 ( $\mu$ g/ml)
升 麻	Cimicifuga heracleifolia Komarov	140
柴 胡	Bupleurum falcatum L.	140
葛 根	Pueraria lobata Ohwi	> 500
白芍藥	Paeonia lactiflora Pallas	> 500
梔 子	Gardenia jasminoides Elli	> 500
黃 芩	Scutellaria baicalensis Georgi	> 500
黃 連	Coptis japonica Makin	350
木 通	Akebia quinata Decaisn	50
甘 草	Glycyrrhiza glabra L.	100
	S M G Extract	430

7. 모세혈관 투과성 억제 실험

升麻葛根湯加味方이 ICR mouse를 대상으로 실시한 모세혈관 투과성 억제실험에서 단위투여로 모세혈관투과성을 28.7% 억제시키는 것으로 평가되었다. (Table 10, Fig. 9).

Table 10. Inhibitory Effect of SMG on Vascular Permeability.

Groups	Mean $\pm$ SD	Reduction Rate
Negative Control (Saline)	0.87 $\pm$ 0.33	-
Positive Control (Aminopyrine)	0.33 $\pm$ 0.17	62.1%
S M G G T	0.62 $\pm$ 0.16	28.7%

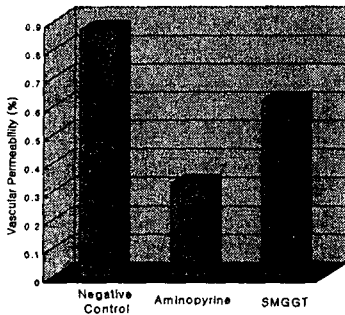


Fig 9. Inhibitory Effect of SMG on Vascular Permeability.

### 8. 백혈구 유주 억제력 평가

ICR mouse를 이용해 평가한 결과 升麻葛根湯加味方은 11.5%의 백혈구 유주 억제율을 보였다 (Table 11, Fig. 10).

Table 11. Inhibitory Effect of SMG on Leukocyte Migration.

Groups	Mean±SD	Reduction Rate
Negative Control (Saline)	10.24±1.10	-
Positive Control (Aminopyrine)	9.02±1.15	11.9%
S M G	9.06±0.62	11.5%

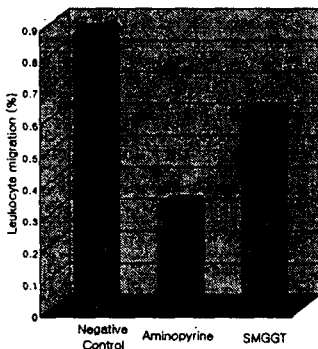


Fig 10. Inhibitory Effect of SMG on Leukocyte Migration.

## 고찰

升麻葛根湯은宋代錢1)의 <小兒藥證直訣>에 “治傷寒, 溫疫, 風熱, 壯熱, 頭痛, 肢體痛, 瘡疹而發未發, 并宣服之”라 하여 처음 수록된 이후, 많은 醫家들<sup>2-15)</sup>에 의해 傷寒瘟疫, 痘疹, 麻疹, 陽證發斑 등을 치료하는데 사용되었다.

許<sup>12)</sup>의 <東醫寶鑑>에서는 “曰隱疹 當春而發 最重 卽溫毒也”의 경우에 사용한다 하였는데, 癩疹은 瘡瘡<sup>7)</sup> 風丹<sup>53)</sup> 風疹塊<sup>54)</sup> 風痒癩疹<sup>55)</sup> 風痧<sup>56)</sup> 風痞瘤<sup>55)</sup>라고 고도 하며, 피부에 은은하게 출현하여 피부표면이 두드러져 경계가 뚜렷하고 소양이 심하여 때때로 참기 힘든 증상을 말하는 것이다<sup>12,23,57-62)</sup>. 癩疹은 西洋醫學에서 담마진 혹은 두드러기(urticaria, hives)에 해당하는데<sup>59,63)</sup>, 물리적 요인이나 각종 항원들이 원인이 되어 肥滿細胞에서 histamin, serotonin 등의 화학물질이 유리되고 그 유리된 화학물질이 血管壁의 간격을 확장시킴으로 체액의 삼출물이 증가되어 搔痒症을 동반한 浮腫이 피부 眞皮層에 나타나는 대표적인 알레르기 질환이다<sup>62,64-72)</sup>.

炎症(inflammation)은 “균의 감염, 열, 외상, 항원 항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전”라고 정의하고 있으며, 炎症이라는 용어가 “불같은 상태”라는 어원에서 유래된 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애와 같은 염증의 5대 징후가 발생된다. 이러한 염증을 병리조직학적으로 볼 때에는 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라고 할 수 있다<sup>16)</sup>.

韓醫學에서 炎症反應은 正邪鬪爭의 결과로 體內에 나타나는 病理的 현상중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이며, 正은 正氣로 六淫 食積 痰飲 등의 邪氣에 對應하는 人體一切의 抗病力 및 정상적인 生理機能을 總稱하고 邪는 邪氣로 發病因子를 總稱한다<sup>21,22)</sup>.

升麻葛根湯加味方은 升麻葛根湯에 柴胡 黃芩 黃連 梔子 木通을 加한 처방으로 구성 약물의 효능 및 약리작용을 살펴보면, 升麻는 發表透疹 清熱解毒 升舉陽氣하고 항균, 순환기계에서 심박동감소 및 혈압강하, 자궁수축작용 등이 있다. 葛根은 發表解肌 透發痘疹 生津止渴 升陽止瀉하고 해열작용, 순환기계에서 뇌 및 관상동맥혈류량증가, 장관에 대하여 진정작용, 근육경련 완화작용 등이 있다. 芍藥은 柔肝止痛 養血斂陰 平抑肝陽하고 抗炎, 항괴양, 항균작용, 복부경련에 진정작용, 혈압강하 및 관상동맥 혈류량 증가, 진통 진정작용 등이 있다. 甘草는 補脾益氣 清熱解毒 潤肺止咳 調和諸藥하고 해독작용, 消炎 및 항알레르기작용, 항이노작용, 진해거담작용, 胃의 항괴양작용, 장관 경련완해작용 등이 있다. 柴胡는 和解退熱 疎肝解鬱 升舉陽氣하고 해열, 消炎작용, 항병원체작용, 진정 및 진통 등이 있다. 黃芩은 清熱燥濕 瀉火解毒 止血安胎하고 해열, 소염, 항균, 항알레르기작용, 혈압강하작용 등이 있다. 黃連은 清熱燥濕 清心除煩 瀉火解毒하고 항미생물 및 항병원체작용, 항균, 순환기계에서 관상동맥혈류량 증가, 평활근에 대한 작용, 담즙분비 촉진, 항암작용 등이 있다. 梔子是 瀉火除煩 清熱利濕 止血하고 抗炎, 진정작용, 혈압강하작용, 담즙분비증가, 지혈작용 등이 있다. 木通은 瀉火利水 通氣下乳하고 이뇨, 항균 등이 있다<sup>73-77)</sup>.

이와 같이, 升麻葛根湯에서 升麻는 陽明經의 風邪를 散하고 胃의 陽을 淸케함으로써 解毒 透疹하고, 葛根은 發散하고 腠理를 열어서 發汗 解肌하며 津液을 보충하므로 解肌透疹의 主藥이다. 芍藥은 營血을 助養하고 涼血하며 汗出 透疹하여도 陰을 傷하지 않게 하며 甘草는 益氣解毒和中한다. 따라서 升麻葛根湯은 癩疹初期나 癩疹毒이 未發하였거나 혹은 이미 發하였다할지라도 未透하였을 때 활용한다고 하였다<sup>78)</sup>.

이에 저지는 升麻葛根湯 本方に 清熱解毒, 除濕 효능이 있으며 항균, 消炎작용이 있는 柴胡 黃芩 黃連 梔子 木通을 加味하여 피부염증을 비롯한 염증

의 발생과 치료에 미치는 영향을 평가하기 위해 본 실험을 시행하였다.

활성산소는 이온의 상태가 불안하여 다른 물질과 결합해 안정화되려는 성질, 즉 강한 반응성을 지니는 특성을 가진 산소를 말한다. 이러한 활성산소는 인체 내의 정상세포의 대사과정 중의 여러 산화반응의 부산물로 만들어지며, 식세포에 의해 만들어져 감염반응을 조절하는 긍정적인 역할을 하는 반면, 이산화방사선, 자외선, 환경공해, 심한운동을 할 경우에 만들어져, 생체조직을 공격해 각종 염증질환과 암, 간장장애, 동맥경화, 위염 등 많은 질병을 일으키는 원인의 하나로 알려져 있으며, 궁극적으로는 노화의 한 원인인 것으로 알려져 있다. 활성산소는 초산화유리기 (superoxide anion radical; O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소 (hydrogen peroxide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 수산화유리기 (hydroxyl radical; .OH), 1중항 산소 (siglet oxygen; 1O<sub>2</sub>) 등의 4종류로 분류된다. 이러한 활성산소의 피해로부터 생체조직을 보호하기 위해서는 이미 존재하는 유리기가 다른 분자와 반응하기 전에 인체에 무해한 형태로 바꾸고, 다른 분자들로부터 자유 유리의 형성을 억제시키는 항산화제의 사용이 일반적이다. 항산화제는 크게 항산화력을 갖는 효소군과 항산화 작용을 하는 비효소군, 그리고 손상된 DNA 등을 수복시키는 효소군으로 나눌 수 있다. 항산화성 효소군으로는 초산화유리기를 과산화수소로 전환시켜주는 역할을 하는 superoxide dismutase (SOD), 과산화수소수를 물과 산소로 변화시키는 catalase, 그리고 환원형 glutathione을 사용해 과산화수소나 지질 과산화물이 자유유리기를 형성하기 전에 무해한 물질로 전환시키는 작용을 하는 glutathione peroxide 등이 대표적인 것이며, 항산화작용을 갖는 비효소군으로는 vitamin E (tocopherol), vitamin C (ascorbic acid), β-caroten 등과 같은 비타민류와 요산 (uric acid), bilirubin 및 알부민 등이 있는데, 이들은 유리기를 낚아채 자기 자신이 안전성 있는 유리로 전환되어 다른 화합물이 유리로 되는 것을 예방하는 역할을 한다. 이들 항산화작용을 갖는 비효

소균은 세포 내외의 산소유리기를 일차적으로 방어하는 역할을 담당하는 항산화제의 역할을 하고 있다. 손상된 DNA를 수복하는 역할을 하는 효소군으로는 methionine superoxide reductase 등이 있다<sup>16)</sup>.

Nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. NOS는 I형과 II형, III형의 3종류가 있으며, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 I형이나 III형과 달리 II형은 inducible NOS(iNOS)로 cytokine이나 세균 등에서 분비되는 LPS 등에 의해 일부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 피부염증과 관절염을 비롯한 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제시키는 것이 중요하다<sup>16-20)</sup>. 염증은 상기한 바와 같이 병리조직학적으로 볼 때에는 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 2가지 특징이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 升麻葛根湯加味方이 염증반응과정에서 중요한 역할을 하고 있는 활성산소를 제거하는 radical scavenger로서의 작용을 하는지의 여부를 조사하기 위해 DPPH법을 이용한 항산화력 실험을 실시하였으며, 그 결과 升麻葛根湯加味方 추출물은 0.01%에서 56.1%, 0.001%에서는 9.9%의 radical scavenging activity를 지니고 있는 것으로 확인되어 대조군으로 사용한 BHT보다는 약간 떨어지지만 우수한 항산화력을 지니고 있는 것으로 조사되었다.

또 升麻葛根湯加味方に 사용된 모든 원료 한약재 추출물을 대상으로 실시한 항산화 실험에서는 白芍

藥, 黃芩 및 甘草추출물이 0.01%의 농도에서 85% 이상의 우수한 radical scavenging effect를 보였으며, 升麻, 葛根 및 梔子추출물도 50% 이상의 항산화 효과를 지닌 것으로 조사되어, 이들 한약재들이 升麻葛根湯加味方の 항산화력을 제공하는 약재인 것으로 판단되었으며, 이들 약재는 향후 염증치료 및 억제제를 위한 처방에 항산화물질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 升麻葛根湯加味方추출물이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는 역할을 하는지의 여부를 평가하기 위해 염증실험에 널리 활용되고 있는 macrophage 세포인 RAW 264.7 cell을 이용한 실험을 실시하였다. RAW 264.7 cell에 한약재 추출물을 처리할 경우 LPS에 의해 생성되는 NO의 양을 억제시킬 수 있는지의 여부를 평가한 결과, 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 NO의 생성을 각각 31.7%와 16.3% 억제시켜 약간의 NO 생성억제 효과를 지닌 것으로 조사되었다. 升麻葛根湯加味方に 처방된 모든 원료 한약재를 대상으로 동일한 실험을 실시한 결과 甘草추출물이 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 55.8%와 21.7% 억제시켜 NO형성 억제효과가 가장 우수하였고, 黃芩추출물이 44.8%, 14.2% 억제시키는 것으로 확인되어, 이들 한약재들이 升麻葛根湯加味方の NO 생성억제력을 제공하는 약재인 것으로 판단되며, 이들 약재는 향후 염증 치료 및 억제를 위한 처방에 NO 형성억제 물질로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Prostaglandin(PG)은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger이다. PG은 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2은 혈관 투과성 항진에

작용을 하고, **tromboxane**은 백혈구 유주에 관여하는 등 **PG**는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 오래 전부터 발열, 발적, 동통 등을 치료하는데 널리 사용되어온 **aspirin**이 이러한 **PG**를 합성하는데 핵심적인 작용을 하는 **COX**의 작용을 억제시키기 때문인 것에서 알 수 있듯이, 염증억제를 위해 **COX**의 활성을 억제시키고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다. **COX**는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. 이중 I형인 **COX-1**은 위장관보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 우리 몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하는, 대부분의 정상적인 조직에서 발생하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 **COX-2**는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 따라서 항염증제와 항암제의 개발을 위해 **COX-2**의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쏟고 있다<sup>18,48,49,79</sup>.

이에 본 연구에서는 升麻葛根湯加味方 및 그 원료 한약재 추출물이 **COX II** 효소의 활성을 억제시키는지의 여부를 **ELISA kit**를 이용해 평가하였으며, 그 결과 실험을 실시한 9종 중 黃芩과 甘草추출물이 시험농도인 10 $\mu$ g/ml에서 **COX II** 효소의 활성을 70% 이상 억제시키는 우수한 **COX II** 활성억제 효과를 지니는 것으로 평가되었으나, 柴胡추출물, 白芍藥과 木通 추출물종은 **COX II** 활성억제 효과가 거의 없었으며, 이들 한약재들로 이루어진 升麻葛根湯加味方 추출물은 10 $\mu$ g/ml에서 **COX II** 효소의 활성을 23% 억제시키는 것으로 평가되었다.

염증의 경과는 혈관의 투과성이 항진되는 1기, 백혈구가 주로 작용하는 2기, 조직의 재생 수복시기인 3기로 구분된다. 피부염증에 의한 혈관투과성 항진은 세정맥(venule) 내피 세포의 간격이 벌어져서 혈장 단백질 등의 거대분자가 혈관 외로 유출되는 현상으로 여러 화학전달물질들이 이 현상에 매개체로 관여하는 것으로 알려져 있다. 염증 2기에서는 혈관 외로 유출된 백혈구가 활발하게 작용하는 시기로 화학전달매개물질에 의해 세정맥 내막의 간격

이 벌어지면 다형핵백혈구, 임파구, 대식세포에 의해 침윤이 일어나기 시작한다. 외부자극에 의해 파립구 혹은 대식세포의 탐식작용, B cell의 분화, 증식 등 일련의 반응이 일어나고, 성숙된 T cell로부터 각종 림포카인들이 생산 분비되며, 대식세포가 염증 주위에 모이게 된다. 염증의 3기는 육아조직(granulation)을 형성하고, 조직이 재생 수복되는 시기로 이 시기에는 섬유아세포의 증식이 활발하게 이루어지고 혈관이 재생되어 육아조직이 형성되고, 육아조직은 점차 실질조직으로 대체되어 염증조직의 재생 수복된다<sup>16</sup>.

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 염증반응을 주요 화학 전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(histamine, serotonin등)와 kinin류(bradykinin등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 prostaglandin과 leukotriene류 등의 4군으로 분류된다. 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine은 30kD이하의 분자량을 가진 당단백으로 소량(10-10-10-15M)으로도 수용체와 결합해 강력하게 염증반응과 면역반응을 조절하는 기능을 가졌다<sup>44</sup>. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 보고되고 있다. 이중 특히 TNF- $\alpha$ 는 염증이 발생한 부위에는 높은 농도로 존재하며, 또한 최근에는 TNF- $\alpha$ 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있기도 하다<sup>80,81</sup>.

이에 본 연구에서는 升麻葛根湯加味方이 대표적인 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가하였으며, 그 결과 升麻葛根湯加味方 추출물은 50 $\mu$ g/ml와 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6 유전자 발현을 100% 억제시키고, IL-1 $\beta$  유전자 발현은 89.3%와 71.3%, 그리고 TNF- $\alpha$  유전자 발현은 각각 75.7%와 53.1% 억제시키는 것으로 조사되었다. 升麻葛根湯加味方에 사용된

원료 한약재추출물중 NO 생성 억제력이 우수한 것으로 확인된 黃芩추출물과 甘草추출물을 대상으로 한 실험에서는 黃芩 추출물은 50 $\mu$ g/ml와 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-1 $\beta$ 과 IL-6 유전자의 발현을 100% 억제시켰고, 그리고 TNF- $\alpha$  유전자 발현을 75.0%와 67.2%, 甘草추출물은 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6 유전자 발현을 30.4% 억제시키는 효과가 있었다. 이상의 결과로부터 黃芩은 우수한 염증관련 cytokine 유전자 발현 억제력을 가지고 있어 염증의 치료 및 발생억제를 위한 약제로 유용함을 알 수 있다.

염증은 상기와 같이 병리조직학적으로 볼 때에는 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 2가지 특징이라고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 상기한 여러 in vitro 실험에서 우수한 염증반응 억제작용을 보인 升麻葛根湯加味方이 실험동물 model에서도 抗炎효과를 발휘하는지의 여부를 확인하기 위해 ICR mouse를 이용한 모세혈관투과성 억제실험과 백혈구 유주억제 실험을 실시하였으며, 그 결과 升麻葛根湯加味方 농축액은 1회 경구투여로 모세혈관 투과성이 27.3%, 백혈구 유주를 12% 억제시키는 것으로 평가되어 升麻葛根湯加味方은 임상적으로도 염증질환의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

여드름, 무좀, 비듬, 액취, 칸디다증, 손상된 부위에 국소적으로 발생하는 표피 농가진 등의 여러가지 피부 질환은 그 발생과정에서 미생물이 핵심적인 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. T.mentagrophytes의 경우 무좀의 원인균으로 알려져 있으며<sup>82)</sup>, P.ovale는 비듬<sup>83)</sup>, P.acnes는 여드름<sup>84)</sup>, C.xerosis는 액취증<sup>85)</sup>, S.aureus는 농가진과 아토피, C.albicans는 칸디다증<sup>82)</sup>의 유발균으로 보고되어 있다. 따라서 이들 질환의 치료 및 예방을 위해서 상기한 원인균에 대한 항균작용을 갖는 약제의 사용이 일반적이다. 이에 본 연구에서는 升麻葛根湯加味方 추출물이 상기한 피부관련 미생물들이 미치는 영향을 평가하기 위해 paper disk법으로 항균력을 평가하였으며, 그 결과 升麻葛根湯加味方 추출물은 무

좀의 원인균으로 알려진 T. mentagrophytes에 대해서는 미미한 항균력을 지녔으나, 다른 피부질환 원인균에 대해서는 항균력이 없는 것으로 확인되어, 升麻葛根湯加味方은 상기한 피부질환의 치료에서 항균력을 목적으로는 사용할 수 없는 것으로 사료된다.

升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재 추출물들의 세포독성을 MIT법을 이용한 평가한 결과 升麻葛根湯加味方 추출물의 MIT50 (반수치사농도)는 430 $\mu$ g/ml의 약한 세포독성을 지닌 것으로 조사되었으며, 원료 한약재 추출물을 대상으로한 실험에서는 葛根, 白芍藥, 梔子 및 黃芩추출물의 경우 MIT50이 500 $\mu$ g/ml 이상으로 세포독성이 가장 적었으며, 黃連추출물은 300 $\mu$ g/ml 이상, 그리고 升麻, 柴胡, 甘草추출물은 100 $\mu$ g/ml 이상이었다. 반면 木通의 경우 MIT50이 50 $\mu$ g/ml으로 실험을 실시한 한약재중 세포독성이 가장 강한 것으로 조사되었다.

이상의 결과를 종합할 때 升麻葛根湯加味方은 처방내의 한약재들이 우수한 NO생성억제력과 항산화력, IL-1 $\beta$ 와 IL-6 유전자의 발현 억제력 및 COX II 활성억제력, 모세혈관투과성 억제력 및 백혈구 유주억제력 등에 효과를 보인 점을 종합적으로 고려할 때, 염증의 예방 및 치료효과에 유용한 처방인 것으로 사료된다.

그리고 發表透疹시키는 升麻葛根湯 本方に 清熱解毒, 除濕 효능이 있는 柴胡 黃芩 黃連 梔子 木通을 加味한 升麻葛根湯加味方은 炎症의 3대 특징인 發熱 疼痛 腫脹을 효과적으로 억제할 수 있어 염증성 질환인 癰疽疾患에 대한 활용과, 우수한 항산화력으로 노화방지 및 암의 발생과 진행에 예방효과가 크므로 임상에서 광범위한 활용가치가 있을 것으로 사료된다.

## 결론

升麻葛根湯加味方이 염증반응에 미치는 영향을

평가하기 위해 nitric oxide 생성억제력, 염증관련 cytokine 유전자 발현 억제력, cyclooxygenase II 활성 억제력 및 항산화력 등의 in vitro 평가와 모세혈관 투과성 및 백혈구 유주 억제 실험 등의 동물실험을 실시하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었다.

1. 升麻葛根湯加味方은 lipopolysaccharide에 의해 RAW264.7에서 유래되는 nitric oxide의 생성을 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 NO의 생성을 각각 31.7%와 16.3% 억제시켰다. 升麻葛根湯加味方의 처방된 모든 한약재를 대상으로 실시한 NO생성 억제력을 평가한 결과, 甘草추출물이 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 55.8%와 21.7% 억제시켜 NO형성 억제효과가 가장 우수하였고, 黃芩추출물은 44.8%와 14.2% 억제시켰다.

2. 升麻葛根湯加味方 추출물이 LPS의 자극을 받아 RAW 264.7 세포에서 생성하는 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, 升麻葛根湯加味方 추출물은 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6 유전자 발현을 100% 억제시키고, IL-1 $\beta$  유전자 발현은 89.3%와 71.3%, 그리고 TNF- $\alpha$  유전자 발현은 각각 75.7%와 53.1% 억제시켰다. NO 생성억제력이 우수한 것으로 확인된 黃芩과 甘草추출물을 대상으로 실시한 실험에서 黃芩 추출물은 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-1 $\beta$ 과 IL-6 유전자의 발현을 100% 억제시켰고, 그리고 TNF- $\alpha$  유전자 발현을 75.0%와 67.2% 억제시켰고, 甘草추출물은 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6 유전자 발현을 30.4% 억제시켰다.

3. 升麻葛根湯加味方 및 원료 한약재추출물들을 대상으로 COX II 효소의 활성억제에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용해 평가한 결과, 黃芩과 甘草추출물이 시험농도인 10 $\mu$ g/ml에서 COX II 효소의 활성을 70% 이상 억제시키는 우수한 COX II 활성억제 효과를 지니는 것으로 평가되었으며, 升麻葛根湯加味方 추출물은 23% 억제시켰다.

4. DPPH 법으로 측정된 升麻葛根湯加味方추출물의 radical scavenging activity는 0.01%에서 56.1%로

우수한 항산화력을 지닌 것으로 평가되었다. 원료한약재를 대상으로 실시한 항산화실험에서는 白芍藥, 黃芩 및 甘草추출물이 0.01%의 농도에서 80% 이상의 우수한 radical scavenging effect를 보였으며, 升麻, 葛根 및 梔子추출물도 50% 이상의 항산화효과를 지닌 것으로 조사되었다.

5. ICR mouse 대상으로 실시한 모세혈관 투과성 실험에서 升麻葛根湯加味方은 대조군에 비해 모세혈관 투과성을 28.7% 억제시키는 것으로 평가되었다.

6. ICR mouse를 이용해 실시한 백혈구유주 실험에서도 升麻葛根湯加味方은 대조군에 비해 백혈구 유주를 11.5% 억제시켰다.

7. 升麻葛根湯加味方추출물이 피부질환관련 미생물에 미치는 영향을 평가하기 위해 여드름의 원인균으로 알려진 Propionibacterium acnes, 비듬의 원인균인 Pityrosporum ovale, 액취증의 원인균인 Corynebacterium xerosis, 농가진의 원인균으로 알려진 Staphylococcus aureus, 칸디다증의 유발균으로 알려진 Candida albicans, 그리고 무좀의 원인균으로 알려진 Trichophyton mentagrophytes에 대한 항균력을 paper disk법으로 평가한 결과, 升麻葛根湯加味方추출물은 T. mentagrophytes에 대해서만 미미한 항균력을 보였다.

8. V79-4 세포를 대상으로 MTT법으로 실시한 한약재 추출물의 세포독성 실험결과 葛根, 白芍藥, 梔子 및 黃芩추출물의 경우 MTT50(반수치사농도)이 500 $\mu$ g/ml 이상으로 세포독성이 가장 적었으며, 黃連추출물은 300 $\mu$ g/ml 이상, 升麻, 柴胡, 감출추출물은 100 $\mu$ g/ml 이상이었고, 木通의 경우 50 $\mu$ g/ml로 실험을 실시한 한약재중 세포독성이 가장 강한 것으로 조사되었다. 또 이들 한약재가 처방된 升麻葛根湯加味方추출물의 세포독성(MTT50)은 430 $\mu$ g/ml이었다

이상의 실험결과를 종합하면 升麻葛根湯加味方은 우수한 NO 생성억제력, 염증관련 cytokine 유전자 발현억제력 및 항산화력을 비롯해, COX II 활성억제력, 모세혈관투과 억제력 및 백혈구 유주 억제력



등을 가지고 있어 염증의 치료 및 예방에 유용한 처방인 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 錢乙 小兒藥證直訣, 강소, 강소과학기술출판사, p. 90, 1982.
2. 康明吉: 濟衆新編, 서울, 여강출판사, pp. 77,289, 1982.
3. 龔延賢: 增補萬病回春, 대중국도서공사, 상권, pp. 70, 185, 하권 p.176, 1985.
4. 羅天益: 衛生寶鑑, 서울, 금강출판사, p. 319, 1981.
5. 誤博 : 醫學正傳, 서울, 의약사, p.420, pp. 737-738, 1973.
6. 宋炳基: 方證新編, 서울, 동남출판사, pp. 52, 84, 363, 1981.
7. 吳謙外: 醫宗金鑑, 서울, 성보사, 상권 p. 51,68, 하권 p. 169, 1976.
8. 王肯堂: 六科準, 대북, 신문풍출판공사 권3 p. 295, 권4 pp. 373-378, 1978.
9. 李延: 醫學入門, 서울, 대성문화사, 외집권일 p. 239, 외집권이 p. 62, 1984.
10. 周命新: 醫門寶鑑, 서울, 행림서원, p. 41, pp. 317-318, 1976.
11. 陳師文: 太平惠民和劑急方, 대북, 선풍출판사. p. 60, 1975.
12. 許俊 : 東醫寶鑑, 서울, 남산당 pp. 284, 405, 1987.
13. 上海中醫學院: 方劑學, 상해, 상무인서관향향분관, pp. 27-28, 1981.
14. 沆沙勳 외: 實用中醫方劑學, 대북, 약군출판사 업유한공사, pp. 58-60, 1983.
15. 李景華 廣濟秘笈, 서울, 계축문화사, p. 170, 1990.
16. 박광균 구강생화학 12장 면역과 염증, 군자출판사, pp. 318-325, 1999.
17. 김룡규 외 : 넙취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과, 약학회지:3439.

18. 서영준 : 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방, 분자세포생물학뉴스 13:8-17, 213-347, 2002.
19. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han J. and Lee, H.W. : Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophage by two  $\beta$ -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *European J. Pharmacol.* 406 : 301-309, 2000.
20. Kim, E.J., Jin, H.K., Kim K., Lee H.Y., Lee, S.Y., Lee, K.R., Zee O.P., Han, J.W. and Lee H.W. : Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxidesynthaseby inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochem.Pharmacol.* 61 903-910, 2001.
21. 정우열 : 한방병리학, 익산, 원광대학교 한의과대학 병리학교실, pp. 94-106, 1985.
22. 嚴宗正 : 正邪論新釋, 新中醫, 6: 5-6, 1984.
23. 金永勳 : 晴崗醫鑑, 서울, 성보사, pp. 359-361, 1984.
24. 채인식 : 한방임상학, 서울, 대성문화사, pp. 345, 346, 1987.
25. 강영준: 加味升麻葛根湯의 효능에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1992.
26. 김남권, 황충연, 임규상 : 升麻葛根湯加味方이 마우스의 항allergy 및 면역반응에 미치는 영향, 대한외관과학회지 6(1): 1-13, 1993.
27. 김현아, 정지천 : 升麻葛根湯 및 升麻葛根湯合四物湯이 항histamine 효과에 관한 연구, 동국대 대학원, 1994.
28. 강경준, 김중호, 채병윤 : 加味升麻葛根湯의 효능에 관한 실험적 연구, 채병윤교수회갑 기념논문집, 서울, 대성문화사, pp. 480-493, 1995.
29. 홍남두 외 : 지실의 抗炎症 성분연구, 생약학회지, 1991.
30. 한병훈 외 : 독활의 抗炎症 유효성분 Continentalic acid의 화학구조, 생약학회지, 1981.
31. 이은방 외 : 포공영의 항위염 작용, 생약학회

- 지, 24(4): 313-318, 1993.
32. 이은방 외 : 사상자의 抗炎증작용, 생약학회지, 29(4): 384-390, 1998.
  33. 조충식 외 : 반묘와 Cantharidin의 抗炎증효과에 대한 연구, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 제6권 제2호, pp. 471-482, 1998.
  34. 김일혁 외 : 쌍화탕의 抗炎증작용에 관한 연구, 생약학회지, 12(3): 131-135, 1981.
  35. 문영희 외 : 소풍활혈탕의 약효에 관한 연구, 생약학회지, 22(4): 240-245, 1991.
  36. 황완균 외 : 경옥고의 생리활성, 생약학회지, 25(2): 153-159, 1994.
  37. 김호민 : 청열소독음이 실험적 염증 및 혈전에 미치는 영향, 동의병리학회지, 10권, pp 267-293, 1995.
  38. 이한철 : 가미지폐산이 실험동물의 진통, 소염, 해열 및 항균에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1988.
  39. 이봉주 : 영선제통음이 염증 및 혈중 uric acid level에 미치는 영향, 동의병리학회지, 12권, pp. 383-407, 1995.
  40. 홍지우 등: 秘方奪命散의 抗炎症효과 및 항응고작용에 대한 연구, 대한동의병리학회지, 12(2): 63-72, 1998.
  41. 이견집 외 : 진단미생물학(3판), PP. 322-323, 359-374, 고려의학, 1999.
  42. 문숙임, 류홍수, 이희령, 최재수 : 식용식물의 항산화효과 검색과 산초의 항산화성분. 한국영양식량학회지 23:466-471, 1994.
  43. Blos, M.S., : Antioxidant determination by the use of stable free radical. Nature 181:1199, 1958.
  44. Wadsworth TL, Koop DR., : Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. Chem. Biol. Interact. 137:43-58, 2001.
  45. Hinz B, Brune K, Rau T, Pahl A., : Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Pharm.Res. 18:151-6, 2001.
  46. Ndengele M.M., Bellone C.J., Lechner A.J. and Matuschak G.M., :Brief hypoxia differentially regulates LPS-induced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  gene transcription in RAW 264.7 cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 278: L1289-L1296, 2000.
  47. Chomczynski P, Sacchi N, : Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162:156-159, 1987.
  48. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준 : 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지 42:558-566, 1998Biochem 162:156-159, 1987.
  49. Denizot F, Lang R., : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Immunol.Methods 89:271-7, 1986.
  50. 이은방, 최병천, 조태순 : 산수유 에틸분획물의 약리작용에 관한 연구, 약학회지 29:1-10.
  51. Doherty NS, Poubelle P, Borgeat P, Beaver TH, Westrich GL, Schrader NL : Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotienes and prostaglandin E2. Prostaglandins. 30:769-89, 1985.
  52. Doherty NS, Beaver TH, Chan KY, Coutant JE, Westrich GL. :The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection of zymosan in mice. Br.J.Pharmacol, 1:39-47, 1987.
  53. 楊禮濤 : 醫林撮要, 서울, 黑潮社, pp. 99-101, 1968.
  54. 상해중의학원 : 중의외과학,, 香港, 商務印書館, pp. 105-1-8, 1981.
  55. 趙佶: 聖濟總錄, 대북, 인민위생출판사, pp. 330 - 335, 1982.

56. 고우신 : 은진의 변증에 대한 치법과 처방의 문헌적 고찰, 대한외관과학회지, 8(1): 75-98, 1995.
57. 金定濟. 診療醫鑑, 서울, 동양의학연구소, 403, 1983.
58. 方廣 : 丹溪心法附餘, 서울, 대성문화사, pp. 457, 549, 1982.
59. 제병충. 漢方外科, 서울, 고문사, pp. 90-94, 1989.
60. 李常和: 變證方藥正傳, 대구, 동양종합통신교육원출판부, pp. 80-81, 1982.
61. 미국의사협회: 중세진단 가정의학 홈닥터, 서울, 길벗, p. 66, 1991.
62. 오송와: 히스타민으로 유발한 소양감에 대한 침술의 효과, 대한피부과학회지 24:2, pp. 190-195, 1986.
63. 上海中醫學院: 中醫外科學, 상해, 상무인서관향향분관, pp. 105- 108, 1981.
64. 大韓皮膚科學會: 피부과학, 서울, 여문사, pp. 104-108, 1990.
65. 西山戍夫: 圖解皮膚科學, 서울, 제일의학, pp. 63-67, 1991.
66. 서울대학교 의과대학: 면역학, 서울, 서울대학교 출판부, pp. 123-147, 1987.
67. 康兼秀: 한방임상 알레르기, 서울, 정보사, pp. 23, 64-68, 70, 369-370, 375-376, 1988.
68. 鄭泰浩: 면역학강의, 대구 경북대학교출판부, pp. 256, 280, 1993.
69. 유만식: 병태생리학, 서울, 회성출판사, pp. 256-280, 1993.
70. 醫學教育研修院: 家庭醫學, 서울대학교 출판부, p. 604, 1989.
71. 정연태. 인체해부학, 서울, 계축문화사, p. 262, 1986.
72. 金堤呻 外: 항히스타민이 점포시험반응에 미치는 영향에 관한 연구, 대한피부과학회지, 19:3, pp. 271-275, 1981.
73. 辛民教 : 원색 임상본초학, 서울, 영림사, pp. 175-177, 223-224, 279-280, 308-311, 540-541, 536-540, 1991.
74. 李芳達 : 本草精要, 一中社, 서울, pp. 78-80, 81-87, 86-87, 113-116, 123-131, 262-264, 589-592, 2002.
75. 鄭普燮 外: 향약대사전, 서울, 영림사, pp. 412-414, 485-488, 491-493, 521-525, 684-687, 704-706, 864-865, 925-926, 1990.
76. 약품식물학연구회 : 약품식물학각론, 서울, 학창사, pp. 157-158, 168, 204, 206, 286, 343, 388, 521-523, 1988.
77. 신민교 외 55인 : 2000본초방제학연구, 원광대학교 대학원, 서울, 영림사, pp. 8-9, 85-86, 154-155, 159-161, 178-179, 218-219, 223-224, 464-466, 2000.
78. 윤용갑 : 동의방제와 처방해설, 의성당, 서울, p. 575, 1998.
79. 문태철 외 : 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색, 약학회지 42:214-219, 1998.
80. Aeberl D., Oertle S., Mauron H., Reichenbach S., Jordi B. and Villiger P. : Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab an etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. Swiss Med.Wkly 132:414-422, 2002.
81. Feldman M., Taylor P., paleolog E., Brennan F.M., Maini R.N. : Anti-TNF- $\alpha$  therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other disease. Transplant Proc., 30:4126-4127, 1998.
82. 유윤정 외 : 구강미생물학, 13장 피부와 연조직의 감염, pp. 155-166, 군지출판사, 2001.
83. 전현주 외 : 비듬에 대한 통계적 관찰 및 진단학적 성상, 대한피부과학회지 31:164-174, 1993
84. 최승만 외 : *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과 검색, 대한약학회지 42:89-94, 1998
85. 국정표 외 ; 액취증 환자에서의 액와부 피부 표면의 미생물학적 연구와 유전적 관찰, 대한피부과학회지 28:559-564, 1990