

復方紅藤敗醬散의 抗血栓 및 抗炎作用에 대한 實驗的 研究

대전대학교 한의과대학 부인과학교실

임동욱, 유동열

ABSTRACT

The Experimental Study on Anti-thrombotic and Anti-inflammatory Effect of *BokbangHongdeungPaejangSan* (BHPS)

Lim Dong-Ug, Yoo Dong-Youl

Dept. of Ob & Gyn, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Purpose : This study was performed to evaluate anti-thrombotic and anti-inflammatory effects of *BokbangHongdeungPaejangSan* water extract (BHPS).

Methods : BHPS was investigated using cultured cells and a murine models. As for the parameters of inflammation, levels of several inflammatory cytokines and chemical mediators which are known to be related to inflammation were determined in mouse lung fibroblast cells (mLFC) and RAW 264.7 cells.

Results : In experiment of anti-thrombotic effect, BHPS inhibited the platelet aggregation induced by ADP and epinephrine, and inhibited pulmonary embolism induced by collagen and epinephrine. BHPS increased platelet number and fibrinogen amount, and shortened PT and APTT in thrombus model induced by dextran. In experiment of anti-inflammatory effect, BHPS inhibited IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 and NOS-II mRNA expression in a concentration-dependent manner in RAW 264.7 cell line, and inhibited significantly NO production at 50, 100 μ g/ml, and also inhibited ROS production in a concentration-dependent manner. BHPS inhibited IL-1 β , IL-6 and TNF- α production significantly in serum of acute inflammation-induced Balb/c mice, and decreased IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in spleen tissue, but increased IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in liver tissue. BHPS increased survival rate at the 3th day in ICR mice with lethal endotoxemia induced by LPS.

Conclusion : These results suggest that BHPS can be used for treating diverse female diseases caused by thrombosis and inflammation such as endometriosis, pelvic pain, cervicitis, pelvic inflammatory disease and pelvic tuberculosis and so forth.

Key words : *BokbangHongdeungPaejangSan* (BHPS), Anti-thrombotic, Anti-inflammatory

I. 緒論

復方紅藤敗醬散¹⁾은 紅藤敗醬散에서 乳香, 沒藥, 香附子, 黃芩을 去하고 和解退熱 疏肝解鬱하는 柴胡, 補肝腎 祛風濕하는 桑寄生, 理氣 燥濕化痰하는 陳皮, 開胃 調氣 散滯하는 木香을 加한 처방으로 濕熱과 瘀血로 인한 慢性 骨盤炎症性疾患에 活用되고 있다¹⁻³⁾.

婦人科 領域에서 女性의 生殖器과 泌尿器系의 炎症은 가장 흔한 疾患 중의 하나로, 外陰部와 膣感染, 子宮頸管炎, 骨盤內 炎症性 疾患 및 骨盤結核 등이 그 대표적 증상이다⁴⁾.

骨盤炎症性 疾患은 병원성 미생물에 의해 子宮, 卵管, 卵巢를 비롯한 주위 隣接器官에 전반적인 炎症反應이 발생된 상태를 말하며 보통 下部 性器에 침입한 各種 細菌의 上向移動에 의한 續發性 疾患이다⁴⁾. 急性骨盤炎은 淋菌에 의한 感染의 경우 子宮頸部の 病巢가 子宮內膜表面을 거쳐 卵管內膜을 따라 骨盤內로 전파되거나, 產褥期 또는 手術後 感染의 경우 子宮頸部 및 體部の 病巢가 broad ligament내의 靜脈 및 淋巴官을 통해 卵管을 거쳐 骨盤內로 전파되는 것이 주된 感染經路이며, 慢性骨盤炎은 急性炎症이 약물치료 혹은 자연치유 후 재발하는 경향이 큰 亞急性이나 慢性으로 된 狀態로서, 때로는 불충분한 治療 후 다른 菌腫에 의해 2차적으로 併合 惡化되는 수도 있다⁵⁾.

韓醫學 古典에서는 骨盤炎이라는 名稱은 볼 수 없으나 產後發熱, 帶下, 經病疼痛, 熱入血室, 癥瘕, 不妊 등에서 이 疾患과 유사한 증상을 볼 수 있으며⁶⁾ 《素問》 『骨空論』에 “任脈爲病, 女子帶下

癥瘕”라 하여 婦人科 疾患으로서 癥瘕를 認識했고, 《婦人大全良方》 『婦人腹中瘀血方論』에는 “胞宮內에 瘀血이 있으면 때때로 身熱, 面黃 등의 症狀이 나타나고 瘀血을 오래도록 治療하지 않으면 積聚하여 癥瘕가 된다”고 하여⁷⁾ 子宮內 瘀血의 病因과 腫塊의 形成을 敍述하고 있다.

炎症은 損傷組織에 대한 살아있는 組織의 反應⁸⁾으로, 炎症反應은 局所循環系의 循環障礙와 血液成分의 血管 外로 滲出 및 組織 增殖이 동반되는 일련의 과정으로 나타나며⁹⁾, 發赤, 發熱, 腫脹, 疼痛, 機能喪失이 대표적인 證狀이라고 할 수 있다^{8,9)}. 이러한 염증의 일련의 과정은 疼痛, 出血, 寒熱, 腫塊 등을 주요증상으로 하는 瘀血의 病態와 유사함을 알 수 있다¹⁰⁾.

瘀血에 대한 實驗的 研究로 趙¹¹⁾는 歸朮破瘀湯이, 崔¹²⁾는 加味桂枝茯苓丸이, 高¹³⁾는 麻黃附子細辛湯이 血栓症에 有意性이 있다고 報告하였다. 紅藤敗醬散에 대한 研究로는 諸¹⁴⁾가 消炎作用에 대한 有意한 結果가 있다고 報告한 바 있으나, 復方紅藤敗醬散의 抗血栓 및 抗炎作用에 대한 研究는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者는 復方紅藤敗醬散의 抗血栓作用을 究明하기 위해 ADP와 epinephrine에 의한 血小板 凝集 抑制 效果, 血栓誘發에 따른 血流速度를 測定하였고, in vivo에서 肺塞栓 誘發 및 dextran에 의한 血栓症 病態 모형을 이용하여 實驗을 수행하였고, 抗炎症 作用의 究明을 위해서는 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, NO S-II의 遺傳子 發現에 미치는 影響, NO 및 ROS의 生産量에 미치는 影響, 急性

炎症性疾患 생쥐 모델의 血清 內, 脾臟 및 肝 組織 內 cytokine 변화에 미치는 影響, LPS로 유도된 lethal endotoxemia에 대한 生命 延長 效果에 대한 實驗을 수행하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

動物은 韓國生命工學研究院에서 구입한 수컷 ICR계 mouse, 대한실험동물센터에서 구입한 Balb/c계 mouse 및 SD계 rat를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2 °C, 1일 중 12 시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12 시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고품사료와 물을 충분히 供給하였다.

2) 藥物

실험에 사용된 復方紅藤敗醬散의 구성 약물은 《韓醫婦人科學》³⁾에 準 하였고 약재는 大田大學校 附屬韓方病院에서 求入한 것을 精選하여 사용하였다. 1貼의 處方內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of BokbangHongdeung PaejangSan (BHPS)

韓藥名	生藥名	重量 (g)
紅藤	SPATHOLOBI CAULIS	8
敗醬草	PATRINIAE RADIX	8
薏苡仁	COICIS SEMEN	8
當歸(炒)	ANGELICAE GIGANTIS RADIX	6
赤芍藥	PAEONIAE RADIX RUBRA	6
桑寄生	TAXILLI RAMULUS	6
山查肉	CRATAEGHI FRUCTUS	6
玄胡索	CORYDALIS TUBER	6

木香	HELENII RADIX	2.8
柴胡(炒)	BUPLEURI RADIX	2.8
陳皮	CITRI PERICARPIUM	2.8
Total		62.4

3) 試藥

本實驗에 사용된 試藥 中 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS), lipopolysaccharide (LPS), collagen, epineprine, fibrinogen, dextran, heparin, chlorosulforrodamin-B(SRB), diethyl pyrocarbonate (DEPC), tris-base, tris-HCl, EDTA, trichloroacetic acid(TCA), carrageenin, arachidonic acid, dulbecco's minimum essential medium (DMEM), collagenase A, DNase type I, anti-bady avidin-HRP, 2,7-dichlorodihydro fluorescin diacetate(DCFH-DA), aspirin, complete adjuvent, chloroform, RPMI-1640 media, RBC lysis solution, sulfonamide, naphthylethyldiamine·2HCl, RNAzolB은 Sigma 社(Sigma Co., U.S.A) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, ADP, thrombin은 ChronoLog 社(ChronoLog Corp., U.S.A) 제품을, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone 社(Hyclone Logan., U.S.A) 제품을, propidium iodide(PI), RNase는 Pharmingen 社(Torreyana., U.S.A) 제품을, dextran sodium sulfate는 Zoetermeer 社(Zoetermeer Netherlands., U.S.A) 제품을, IL-1β, IL-6, TNF-α ELISA kit는 R&D system 社(Minneapolis., U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 試藥은 特級 試藥을 사용하였다.

2. 方法

1) 試料 抽出物 分離

復方紅藤敗醬散 2 척에 蒸溜水 2,000 ml를 가하여 熱湯 抽出器로 3 時間 抽出하고, 얻은 액을 吸入 濾過하여 이를 Rotary vacuum evaporator로 濃縮한 다음, 凍結乾燥機로 乾燥하여 건조분말 17.4 g(이하 BHPS라함)을 얻어 -84°C에서 보관하면서 적당한 濃度로 희석하여 사용하였다.

2) 血小板凝集(Platelet aggregation) 測定

12 時間 이상 공복을 유지한 지원자의 상박 정맥으로부터 채혈한 血液을 3.8 % sodium citrate 들어있는 일회용 시험관에 血液과 1 : 9의 비율로 넣고 원심분리(900 rpm, 10 분) 하여 상등액으로부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻고 잔액을 다시 원심분리(3,000 rpm, 10 분)하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. PRP는 채취 즉시 변화를 막기 위해 얼음이 들어 있는 용기에 방치하였다. 약물의 抗血小板凝集 效果는 platelet aggregation profiler model PAP-4를 사용하였으며, 최종 濃度는 ADP 6 μ M과 epinephrine 5 μ M이 되도록 하였다. Micromagnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation 시킨 PRP 320 μ l와 BHPS를 40 μ l를 넣고 다시 incubation 한 후 ADP 40 μ l를 가하여 5 분간 반응시켰다.

BHPS는 증류수에 용해시키고 희석하여 사용하였으며, 최종 濃度가 20 mg/ml에서 1/2씩 희석하여 3 μ g/ml가 되도록 PRP에 가하고 凝集 유도제를 넣기 전까지 37°C에서 3 분간 incubation 하였다.

實驗의 처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 生理食鹽水 40 μ l를 가한 뒤 最大凝集率(%)을 測定하여 채혈 후 時間 경과로 인한 血小板 變質로 나타날 수 있는 實驗誤차를 방지하였으며, PRP를 얻은 후 2 時間 안에 모든 實驗을 진행시켰다. 實驗造作 동안 온도는 37°C로 유지하고 橋畔速度는 500 - 1,500 rpm으로 하였으며 528 nm에서 凝集度를 測定하였다.

약물에 의해 aggregation이 抑制되는 정도를 다음 식에 의거하여 transmission maximum reduction percent를 산출하였다.

A = 對照群(vehicle)

$$\text{Inhibition\%} = \frac{A-B}{A} \times 100$$
의 maximum aggregation%

B = 實驗群의 maximum aggregation %

3) 肺塞栓(Pulmonary thrombosis) 誘發 實驗

實驗的 血栓의 誘導는 Kimura의 實驗方法¹⁵⁾에 준하여 실시하였다. 實驗動物은 몸무게 약 18-20 g 정도의 수컷 ICR 계 mouse를 사용하였고, BHPS 投與群은 검액 5.8 mg을 生理食鹽水 0.2 ml에 용해시켜 oral sonde를 이용하여 하루에 1회씩 2 일간 경구 투여하였다. 혈전의 誘發은 血小板凝集 시약(11.3 μ g의 collagen과 1.32 μ g의 epinephrine)을 HBSS 200 μ l에 함유되도록 조제하였고, mouse 당 200 μ l의 용량으로 미정맥에 주사하였다.

實驗動物을 實驗 前 24 時間 絶食시킨 후, 血小板凝集誘發 試藥을 靜脈注射 하기 2 時間 전에 BHPS를 경구투여하였으며, 양성對照群으로는 aspirin 100 mg/kg을 경구투여하였다.

抗血栓效果는 血小板凝集 試藥의 投與로 인하여 發生하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 實驗動物 숫자의 백분율로 계산하였으며, 여기서 마비는 20 분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

4) Dextran 瘵血 病態 誘發 實驗

(1) 瘵血 病態 誘發 및 藥物投與

Rat 8 마리를 1 군으로 하여 正常群, 對照群 및 BHPS 投與群으로 각각 나누었다. 正常群은 生理食鹽水を 供給하고, 對照群은 生理食鹽水を 투여한 지 1 時間 후에 dextran 瘵血 病態를 誘發하였으며, BHPS 投與群은 체중 200 g당 58.0 mg을 生理食鹽水 2 ml에 용해하여 oral sonde로 實驗 하루 전에 1회 경구 투여한 후 절식시키고, 實驗하기 1 時間 전에 다시 1회 경구 투여한 다음 對照群과 동일한 방법으로 dextran 瘵血 病態를 誘發하였다.

Dextran 瘵血 病態 誘發은 dextran(m.w. 210,000)을 生理食鹽水에 넣어 완전히 용해시켜 10 % 濃度の 용액을 만들어 1.1 ml/200 g씩 rat의 미정맥에 3 분 이내에 전량 주사하고, 4 時間 경과 후 심장 천자로 채혈하여 각종 검사를 실시하였다. 正常群 및 對照群은 實驗藥物 대신 生理食鹽水を 투여하여 實驗群과 동일한 시각에 각종 지표를 검사하였다.

(2) 血小板數 測定

血小板數 測定은 자동혈구계산기, Minos-ST를 사용하여 測定하였다.

(3) Prothrombin time(PT) 測定

PT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 測定하였다.

(4) Activated Partial Thromboplastin time (APTT) 測定

APTT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 測定하였다.

(5) Fibrinogen 量 測定

Fibrinogen量은 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 測定하였다.

5) Mouse lung fibroblast cells(mLFCs) 배양

정상 Balb/c계 생쥐의 폐조직 1 g을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거한 후, cold DPBS로 3 회 세척하여 conical tube(15 ml)에 넣고 1,400 rpm에서 5 분간 원심분리하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM(containing collagenase A 5 mg/ml, DNase type I 0.15 mg/ml, antibiotics (penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml))를 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2 時間 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 배양 한 다음 PBS로 약 2 회 1,500 rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10 % FBS로 1 주일 동안 배양한 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 세포를 분리하여 연속으로 1 주일씩 3 회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5 % FBS 배양액에서 배양하였다.

6) 세포독성 測定

mLFCs에 BHPS(200, 100, 50, 10 및 1 μ g/ml)를 각각 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2 회 세척한 후, 각 well에 50 % TCA 50 μ l를 가하고, 1 時間 동안 4°C에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를

공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 0.1 % acetic acid 용액으로 약 4-5 회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 μ l/well이 되게 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 測定하였다.

7) Quantitative real-time-PCR on RAW 264.7 cell line

(1) RAW 264.7 세포배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포주는 10 % FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2時間 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 PBS로 2회 1,500 rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10 % FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 세포를 분리하는 작업을 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5 % FBS 배양액에서 배양하였다.

(2) RAW 264.7 cell에서 RNA 분리

RAW 264.7 세포주를 24 well plate에 1 × 10⁶ cells/well로 분주하였다. 여기에 BHPS(100, 50 및 10 μ g/ml)를 처리하고 1時間 후 LPS 2 μ g/ml를 각 well에 첨가한 후 6時間 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNazolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리한 다음 약 200 μ l의 상층

액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80 % EtOH로 세척하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I(10 U/ μ l) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 10 mM dNTPs 2.5 μ l, random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 μ l) 1 μ l, RNase inhibitor(20 U/ μ l) 1 μ l, 100 mM DTT 1 μ l, 5 × RT buffer(250 mM, Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 4.5 μ l를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 반응 혼합액 20 μ l를 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강시켰으며, 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction에 사용하였다.

(4) 정량적 중합효소 연쇄반응

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7,500 Fast Real-Time PCR system을 이용하였으며 사용된 primers는 아래와 같다(schem. 1).

Schem. 1.

mouse	Forward Primer	Reverse Primer
G3PDH	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
TNF-alpha	5'TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3'	5' GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
IL-6	5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'	5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
IL-1β	5' CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG 3'	5' GATCCACACTCTCCAGCTGCA 3'
COX-2	5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'	5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
NOS-II	5' GGCAGCCTGTGAGACCTTTG 3'	5' GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC 3'

염증사이토카인 遺傳子 發現은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였으며 primer의 최종濃도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 50℃에서 2 분, 94℃에서 10 분 동안 40 cycles을, 95℃에서 0.15 분, 60℃에서 1 분 수행하였다. 實驗群과 對照群은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 아래의 수식으로 target group의 Quantitative PCR을 정량하여 RQ(relative quantitative)값을 測定하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

x = starting quantity
y = yield, n = number of cycles
e = efficiency

8) Nitric oxide(NO) 生成量 測定

RAW 264.7 세포주를 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하였다. 여기에 BHPS(100, 50 및 10 μg/ml)를 처리하고, 1 時間 후 LPS 2 μg/ml를 각 well에 첨가하여 48 時間 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2 % naphthylethylenediamine 2HCl in D.W.)와 용액 B(2 % sulfonamide in 5 %

H3PO4)를 1 : 1로 혼합하여 처리하였다. 배양 상층액 100 μl를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100 μl를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 測定하였다.

9) 세포 내 reactive oxygen species(ROS)의 분석

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하였다. 여기에 BHPS(100 및 50 μg/ml)를 처리하고, 1 時間 후 다시 LPS 1 μg/ml를 처리한 다음 37℃에서 48 時間 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μM을 처리하고 5 분간 배양한 다음 2 회 세척한 후 flow cytometer로 세포내 형광을 測定하였다.

10) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) 血清 IL-1β, IL-6, TNF-α 生成量 測定

BHPS 投與群은 mouse 1 마리당 검액 5.8 mg을 生理食鹽水 0.2 ml에 용해시켜 1 일 1 회씩 7 일간 경구 투여하였다. 7 일 후 LPS 1 mg/kg을 Balb/c mouse 복강에 주사한 후 90 분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 血清을 분리하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 生成량을 ELISA로 測定하였다. 각 well에 생쥐의 血清 100 μl(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotin

conjugated 100 μ l를 처리하고 2 時間 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2 時間 동안 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 2 時間 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 測定하였다.

(2) 肝과 脾臟組織에서의 정량적 중합효소 연쇄반응

LPS로 유도된 mouse의 비장 및 간조직(0.1 g)과 RNazolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하여 이를 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 여기에 RNazolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였으며, 이 혼합 부유액에 chloroform 50 μ l를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 세척하고 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 生命延長率 測定

ICR계 mouse를 이용하여 실험군은 BHPS를, 대조군은 normal saline을 7일간 경구투여 한 후, LPS 3 mg/kg을 복강

에 주사하고 5 일간 생쥐의 생존율을 관찰하여 生命 연장 곡선을 만들었다. 단, 실험군은 LPS 주입 1시간 전에 BHPS를 1회 추가로 경구투여 하였다.

11) 統系處理

실험결과는 mean \pm SE로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

III. 結果

1. 抗血栓 效果

1) 細胞毒성에 미치는 影響

mLFCs에 대한 細胞毒性에서는 BHPS 200, 100, 50, 10 및 1 μ g/ml 濃度에서 對照群에 비해 각각 75.3 \pm 4.6, 85.3 \pm 4.4, 89.4 \pm 6.5, 95.5 \pm 6.6 및 94.6 \pm 5.8 %로 100 μ g/ml 이상의 濃度에서 세포독성이 나타났다 (Table 1).

Table 1. Cytotoxicity of BHPS Extract on mouse lung fibroblast cells (mLFC)

Samples	Dose (μ g/ml)	% of Control Data Cell viability (%)
Control	0	100.0 \pm 5.4
BHPS	200	75.3 \pm 4.6**
"	100	85.3 \pm 4.4*
"	50	89.4 \pm 6.5
"	10	95.5 \pm 6.6
"	1	94.6 \pm 5.8

: Statistically significant value compared with control data (: P<0.05, **: P<0.01)

2) 血小板凝集(Platelet aggregation) 抑制效果

(1) ADP에 의한 血小板凝集 抑制效果
BHPS 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15 및 0.07 mg/ml를 처리하였을 때 ADP 6 μ M에 의해서 유도된 血小板凝集 抑制率은 각각

100, 100, 100, 88.4, 50.4, 27.0, 6.7, 1.8 및 0 %로 나타났다(Fig. 1).

(2) Epinephrine에 의한 血小板凝集 抑制效果

BHPS 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15 및 0.07 mg/ml을 처리하였을 때 epinephrine 5 μ M에 의해서 유도된 血小板凝集 抑制率은 100, 100, 91.5, 76.5, 49.1, 25.1, 13.0, 5.2 및 0 %로 나타났다(Fig. 2).

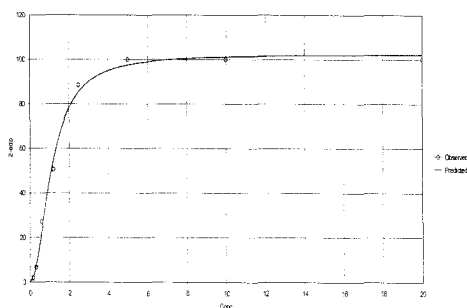


Fig. 1.

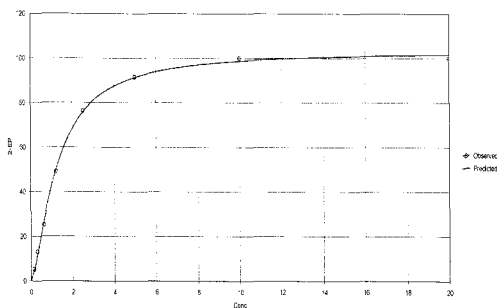


Fig. 2.

Fig.1., Fig.2. Effect of BHPS extract on human platelet aggregation induced by ADP(Fig. 1.) and epinephrine(Fig. 2.). In vitro pharmacodynamic response(inhibition · %) versus concentration of BHPS extract using the Sigmoid Emax Model in WinNolin. The solide and open circles are observed values of ADP-induced aggregation(Fig. 1.) and epinephrine- induced aggregation(Fig. 2.) respectiely.

(3) ADP와 epinephrine에 대한 E_{max} , EC_{50} 및 γ 값

凝集유도제로 ADP를 사용한 경우 E_{max} 는 102.47 %로 나타났고, EC_{50} 은 1.11 mg/ml로 나타났다. Epinephrine의 경우는 E_{max} 가 103.31 %, EC_{50} 은 1.25 mg/ml로 나타났다. Sigmoide E_{max} model에서 곡선의 sigmoidicity를 나타내는 γ 은 ADP와 epinephrine이 각각 1.93와 1.46으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by Emax Model in WinNolin Program

parameter	E_{max} (%)	EC_{50} (mg/ml)	γ
Inducer			
ADP	102.47	1.11	1.93
Epinephrine	103.31	1.25	1.46

3) 肺塞栓(Pulmonary embolism) 抑制效果

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 肺塞栓 實驗에서 對照群은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속 되었는데, 양성對照群인 aspirin 投與群은 8 마리 중 3 마리만이 죽거나 15 분 이상 마비가 지속 되었다. 이에 반하여 BHPS 投與群은 8 마리 중 4 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 50 %의 抑制效果를 나타냈다(Table 3).

Table 3. Effect of BHPS on pulmonary embolism mice

Samples	Dose (mg/20g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
-	-	8/8	0
Aspirin	2	3/8	62.5
BHPS	5.8	4/8	50

Control: 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrine/200 μ l/20 g treated group. Aspirin: 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrine/200 μ l/20 g treated group after oral administration of 100 mg/kg of aspirin. BHPS: 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrine/200 μ l/20 g treated group after oral administration of 5.8 mg/20 g of BHPS extract.

4) Dextran 瘵血 病태에 미치는 影響

(1) 血小板數에 미치는 影響

血小板數 變化에서는 正常群이 658.7 \pm 18.5($\times 10^3$ /mm³)인데 비하여, 對照群은 508.0 \pm 15.9($\times 10^3$ /mm³), BHPS 投與群은 602.3 \pm 19.8($\times 10^3$ /mm³)로 對照群에 비하여 有意性 있게 증가되었다(Table 4-1).

(2) Prothrombin time(PT)에 미치는 影響

PT는 正常群이 19.8 \pm 1.5(sec)인데 비하여, 對照群이 28.4 \pm 2.1(sec), BHPS 投與群은 20.8 \pm 1.8(sec)로 對照群에 비하여 有意性 있게 短縮되었다(Table 4-2).

(3) Activated partial thromboplastin time (APTT)에 미치는 影響

APTT는 正常群이 38.5 \pm 2.4(sec)인데 비하여 對照群이 52.7 \pm 1.6(sec), BHPS 投與群이 40.5 \pm 3.1(sec)로 나타나, 對照群에 비하여 有意性 있게 短縮 되었다(Table 4-3).

Table 4-1. Effect of BHPS on platelet in dextran- treated rats

Samples	NO. of animals	Platelet($\times 10^3$ /mm ³)
Normal	8	658.7 \pm 18.5 ^{a)}
Control	8	508.0 \pm 15.9 ⁺
BHPS	8	602.3 \pm 19.8 [*]

Table 4-2. Effect of BHPS on prothrombin time in dextran-treated rats

Samples	NO. of animals	Prothrombin time (sec)
Normal	8	19.8 \pm 1.5 ^{a)}
Control	8	28.4 \pm 2.1 ⁺
BHPS	8	20.8 \pm 1.8 [*]

Table 4-3. Effect of BHPS on activated partial thromboplastin time in dextran- treated rats

Samples	NO. of animals	APTT(sec)
Normal	8	38.5 \pm 2.4 ^{a)}
Control	8	52.7 \pm 1.6 ⁺
BHPS	8	40.5 \pm 3.1 [*]

Table 4. Normal: oral administration of normal saline.

Control: 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

BHPS: 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 58.0 mg/200 g of BHPS extract. a): Mean \pm SE. +: Statistically significant value compared with normal data(P<0.001). *: Statistically significant value compared with control data(P<0.001).

(4) Fibrinogen 量에 미치는 影響

Fibrinogen 量은 正常群이 237.5 \pm 9.8 mg/dl 인데 반하여, 對照群이 195.7 \pm 10.4 mg/dl, BHPS 投與群이 220.4 \pm 5.1 mg/dl로 對照群에 비하여 有意性 있게 증가하였다(Table 5).

Table 5. Effect of BHPS on fibrinogen level in dextran-treated rats

Samples	NO. of animals	Fibrinogen (mg/dl)
Normal	8	237.5 \pm 9.8 ^{a)}
Control	8	195.7 \pm 10.4 ⁺
BHPS	8	220.4 \pm 5.1 [*]

Normal: oral administration of normal saline.
Control: 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline. BHPS: 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 58.0 mg/200 g of BHPS extract. a): Mean \pm SE. +: Statistically significant value compared with normal data(P<0.05). *: Statistically significant value compared with control data(P<0.05)

2. 抗炎症 效果

1) 염증관련 cytokine에 미치는 影響

(1) IL-1 β 遺傳子 發現에 미치는 影響

RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 遺傳子 發現의 RQ 값은, 正常群이 0.125, 對照群이 1.00로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 μ g/ml 처리군에서는 각각 0.597, 0.625, 0.879의 RQ 값을 나타내어 對照群에 비해 濃度依存的으로 유전자 發現이 抑制되었다(Fig. 3-1).

(2) IL-6 遺傳子 發現에 미치는 影響

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 遺傳子 發現의 RQ 값은, 正常群이 0.121, 對照群이 1.00로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 μ g/ml 處理群에서 각각 0.378, 0.391, 0.798의 RQ값을 나타내어 對照群에 비해 濃度依存的으로 遺傳子 發現이 抑制되었다(Fig. 3-2).

(3) TNF- α 遺傳子 發現에 미치는 影響

RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 遺傳子 發現의 RQ 값은, 正常群이 0.041, 對照群이 1.00로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 μ g/ml 처리군에서는 각각 0.844, 0.922, 0.983으로 나타나 對照群에 비해 濃度依存的으로 遺傳子 發現을 抑制하였다(Fig. 3-3).

(4) COX-2 遺傳子 發現에 미치는 影響

RAW 264.7 세포주에서 COX-2 遺傳子 發現의 RQ 값은, 正常群 값이 0.242,

對照群이 1.00로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 μ g/ml 處理群에서는 각각 0.678, 0.688, 0.969의 RQ 값을 나타내어 對照群에 비해 濃度依存的으로 遺傳子 發現이 抑制되었다(Fig. 3-4).

(5) NOS-II 遺傳子 發現에 미치는 影響

RAW 264.7 세포주에서 NOS-II 遺傳子 發現의 RQ 값, 正常群이 0.048, 對照群이 1.00로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 μ g/ml 處理群에서 각각 0.415, 0.622, 0.884의 RQ 값을 나타내어 對照群에 비해 濃度依存的으로 遺傳子 發現이 抑制되었다(Fig. 3-5).

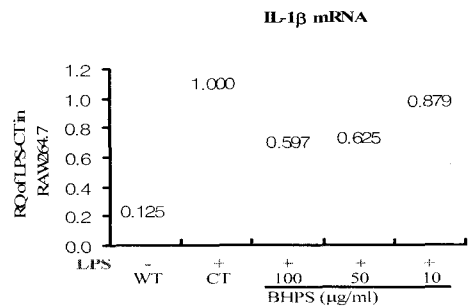


Fig. 3-1.

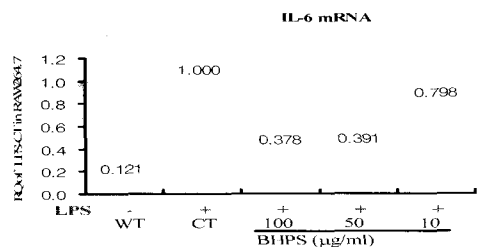


Fig. 3-2.

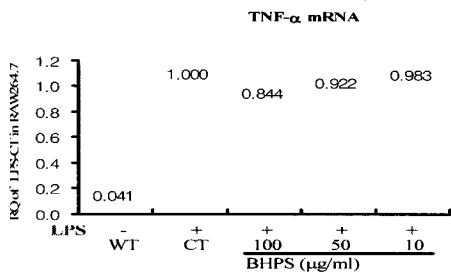


Fig. 3-3.

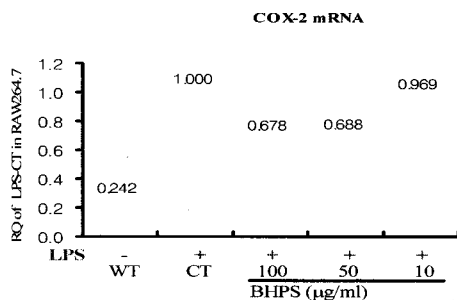


Fig. 3-4.

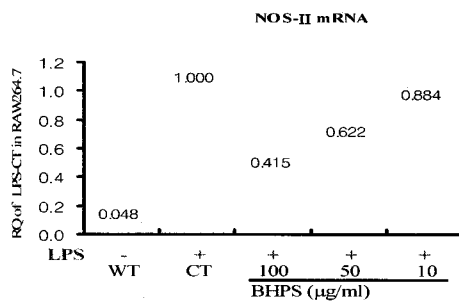


Fig. 3-5.

Fig. 3. Inhibitory effects of BHPS extract on IL-1β mRNA, IL-6 mRNA, TNF-α mRNA, COX-2 mRNA and NOS-II mRNA expression in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of BHPS extract (100, 50 and 10 μg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (2 μg/ml) for 6 hrs. IL-1β mRNA, IL-6 mRNA, TNF-α mRNA, COX-2 mRNA and NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β mRNA, IL-6 mRNA, TNF-α mRNA, COX-2 mRNA and NOS-II mRNA express were

measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration.

3) Nitric oxide(NO) 生成量에 미치는 影響

RAW 264.7 세포주에서 NO 生成량은 正常群의 OD값이 0.054 ± 0.012 , 對照群이 1.458 ± 0.236 로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 μg/ml 處理群에서 각각 0.552 ± 0.148 , 0.894 ± 0.143 , 0.904 ± 0.323 으로 나타나 對照群에 비하여 100, 50 μg/ml의 濃度에서 有意性 있게 NO 생성이 抑制되었다(Fig. 4).

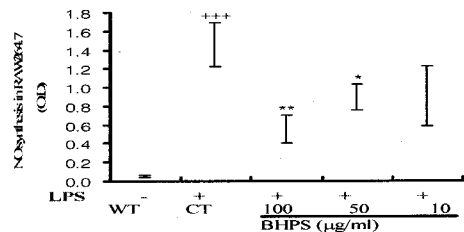


Fig. 4. Inhibitory effect of BHPS extract on the nitric oxide release in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of BHPS extract (100, 50 and 10 μg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (2 μg/ml) for 48 hrs. The culture supernatant was collected 24 hrs later and NO concentration in the supernatant was assayed. The data are expressed as the mean ± SE. +: Statistically significant compared with normal data (P<0.001). *: Statistically significant compared with control data (*: P<0.05, **: P<0.01).

4) 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성량에 미치는 영향

ROS 생성량은 정상군이 19.7%, 對照군이 79.5%로 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, BHPS 投與群(100 μ g/ml C, 50 μ g/ml D)은 59.47 및 73.5%로 對照군에 비하여 濃度 依存的으로 ROS 생성이 抑制되었다(Fig. 5).

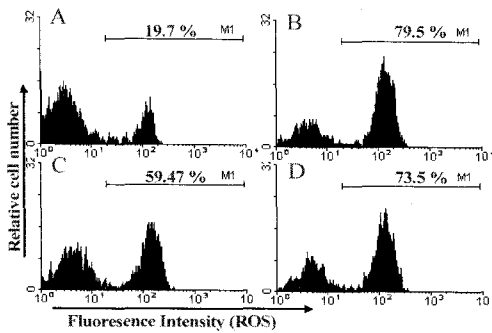


Fig. 5. Inhibitory effect of BHPS extract on the ROS production in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of BHPS extract(C: 100 μ g/ml, D: 50 μ g/ml) in the presence(control, B) or absence(A) of LPS(2 μ g/ml) for 48 hrs. After culture, cells were treated with DCFH-DA reagent(50 mM), harvested, and assayed for ROS positive cells(M1) by flow cytometry.

5) 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 血清 內 cytokine 변화에 미치는 영향

(1) IL-1 β 생성량에 미치는 영향

급성 염증이 誘發된 생쥐의 血清 內 IL-1 β 생성량을 測定한 결과, 정상군은 1.3 \pm 0.7 ng/ml, 對照군은 57.4 \pm 5.2 ng/ml로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 40.1 \pm 3.7 ng/ml로 나타나 對照군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 6-1).

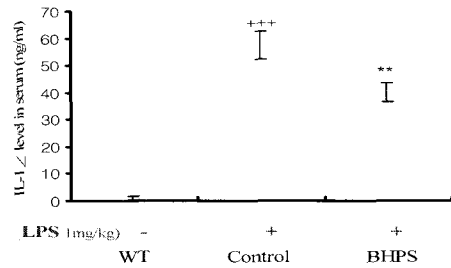


Fig. 6-1.

(2) IL-6 생성량에 미치는 영향

急性 炎症이 誘發된 생쥐의 血清 內 IL-6 생성량을 測定한 결과, 정상군은 3.7 \pm 1.4 ng/ml, 對照군은 326.4 \pm 27.4 ng/ml로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 247.1 \pm 15.9 ng/ml로 나타나 對照군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 6-2).

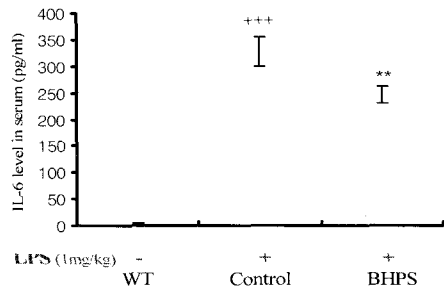


Fig. 6-2.

(3) TNF- α 생성량에 미치는 영향

急性 炎症이 誘發된 생쥐의 血清 內 TNF- α 생성량을 測定한 결과, 정상군은 1.1 \pm 0.6 ng/ml, 對照군은 77.8 \pm 4.7 ng/ml로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 61.7 \pm 5.1 ng/ml로 나타나 對照군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 6-3).

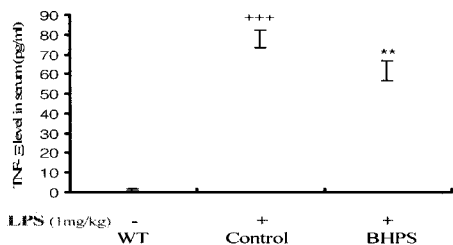


Fig. 6-3

Fig. 6. The effect of BHPS extract on IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in sera following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with BHPS extract(5.8 mg/20 g) and LPS(1 mg/kg). Total IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. The data are expressed as the mean \pm SE. +: Statistically significant value compared with normal data(P<0.001). *: Statistically significant value compared with control data(P<0.01).

6) 急性 炎症性 疾患 생쥐 모델의 脾臟 및 肝組織 內 cytokine 變化에 미치는 影響

(1) IL-1 β mRNA 發現量에 미치는 影響

脾臟 組織에서 IL-1 β 生成量을 測定한 결과, RQ 값은, 正常群은 0.012, 對照群은 1.000로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 0.823로 감소하였다. 간조직에서는 正常群이 0.021, 對照群은 1.000로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 1.102로 증가하였다(Fig. 7-1).

(2) IL-6 mRNA 發現量에 미치는 影響

脾臟 組織에서 IL-6 生成量을 測定한 결과, RQ 값은, 正常群은 0.175, 對照群은 1.000로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 0.714로 감소하였다. 간조직에서는 正常群이 0.214, 對照群은 1.000로 나

타난 반면, BHPS 投與群에서는 1.102로 증가하였다(Fig. 7-2).

(3) TNF- α mRNA 發現量에 미치는 影響

脾臟 組織에서 TNF- α 生成量을 測定한 결과, RQ값은, 正常群은 0.078 對照群은 1.000로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 0.848로 감소하였다. 간조직에서는 正常群이 0.112 對照群은 1.000로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 1.124로 증가하였다(Fig. 7-3).

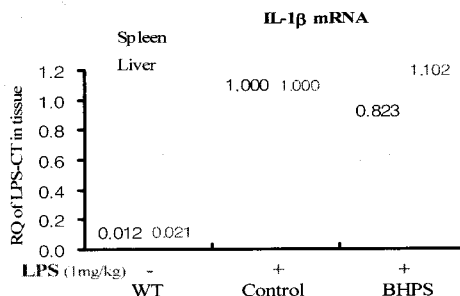


Fig. 7-1.

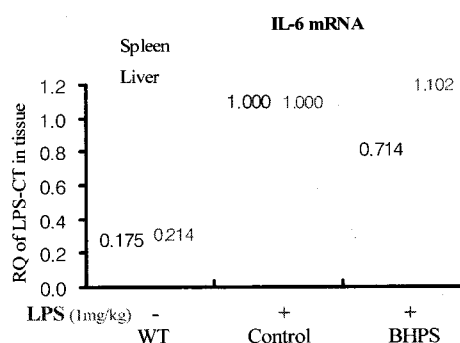


Fig. 7-2.

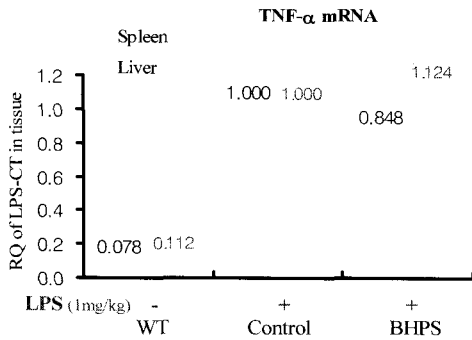


Fig. 7-3.

Fig. 7. Inhibitory effects of BHPS extract on IL-1 β mRNA, IL-6 mRNA and TNF- α mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with BHPS extract(5.8 mg /20 g) and LPS(1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-1 β mRNA, IL-6 mRNA and TNF- α mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration.

7) LPS로 유도된 lethal endotoxemia에 대한 生命延長 效果

생쥐의 복강에 LPS 3 mg/kg 을 주사하여 5 일간 생명연장을 관찰한 결과, BHPS 투여군이 LPS 투여 후 3일째에 대조군에 비하여 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

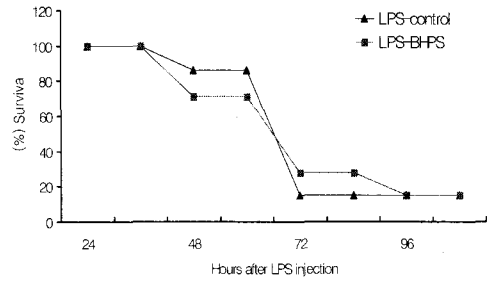


Fig. 8. BHPS protects mice from LPS-induced lethality. Groups of 7 ICR mice were injected i.v. with 100 μ g of LPS(3 mg/kg) after oral administration of normal saline(control) or BHPS(5.8 mg/20 g) for 7 days. Another group of mice received 100 μ g of LPS together with BHPS(5.8 mg/20 g) to serve as a positive control for 100 % protection from LPS-induced lethality. Survival was monitored over the next 5 days. Similar results were obtained in five identical independent experiments. The survival curves from all five experiments were analyzed by the Kaplan-Meier method.

IV. 考 察

骨盤炎症性 疾患은 병원성 미생물에 의해 子宮, 卵管, 卵巢를 비롯한 주위 隣接器官에 전반적인 炎症反應이 발생된 상태를 말하며 보통 下部 性器에 침입한 各種 細菌의 上向移動에 의한 續發性 疾患이다⁴⁾.

韓醫學 古典에서는 骨盤炎이라는 名稱은 볼 수 없으나 產後發熱, 帶下, 經病疼痛, 熱入血室, 癥瘕, 不妊 등에서 이 疾患과 유사한 증상을 볼 수 있으며⁶⁾ 臟腑氣血失調, 七情內傷, 月經不調, 流產, 盆盤 등으로 인하여 余邪未盡한데 濕熱, 熱毒, 濕濁, 寒濕 등의 邪氣가 胞宮에 侵襲하

여 瘀血이 胞中에 積하여 氣血瘀阻하고 衝任虛損하여 발생한다고 본다²⁾. 慢性 骨盤炎의 辨證은 疼痛의 性質, 部位, 程度, 持續時間, 發熱有無, 帶下의 狀態, 月 經歷, 舌狀, 脈狀 등 全身의 狀態에 根據 해서 이루어지는데⁴⁾, 比較的 濕熱邪氣가 成하여 中等度の 熱證을 나타내는 濕熱 內阻證, 熱證의 症狀보다는 氣血이 不暢 하여 氣滯와 瘀血의 症狀이 위주가 되는 氣滯血瘀證, 그리고 오래된 骨盤炎이 骨盤內에 腫塊를 형성하여 癥瘕의 症狀을 나타내는 瘀血包塊證 및 骨盤炎이 氣血을 損耗시켜 寒濕이 內盛하여 氣血不足과 寒濕의 症狀이 주로 나타나는 氣虛寒濕證 등으로 구분할 수 있다¹⁶⁻¹⁹⁾.

復方紅藤敗醬散¹⁾은 紅藤敗醬散에서 乳香, 沒藥, 香附子, 黃芩을 去하고 和解退熱 疏肝解鬱하는 柴胡, 補肝腎 祛風濕하는 桑寄生, 理氣燥濕化痰하는 陳皮, 開胃 調氣 散滯하는 木香을 加한 處方¹⁻³⁾으로 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡, 敗醬草는 清熱解毒, 消腫排膿, 散瘀止痛, 薏苡仁은 健脾滲濕, 清熱排膿, 山查肉은 食消積, 散瘀血, 當歸는 補血和血 調經止痛, 玄胡索은 活血, 散瘀, 理氣, 止痛, 赤芍藥은 清熱涼血, 散瘀止痛의 效能이 있어²⁰⁾, 慢性期の 濕熱夾瘀血型 骨盤炎 治療에 적절하게 應用될 수 있으리라고 본다¹⁻³⁾.

瘀血은 체내의 血液이 停滯된 병리변화인데, 離經之血이 體內에 쌓여있거나 혈액의 運行이 不暢하여 經脈이나 臟腑에 阻滯된 것으로, 주로 氣滯, 氣虛, 寒邪, 熱邪, 外傷 등에 의해 발생한다^{3,11)}. 현재까지 韓醫學 연구에 있어서 血滯라는 순환 장애의 병리를 기반으로 하는 瘀血證과 혈행 장애의 병리를 특징으로

하는 혈전증에 대한 동서비교의학적인 연구를 통해 대사 장애 및 혈액순환장애로 일어나는 각종 병리변화를 瘀血의 범주에 속하는 것으로 인정하여, 瘀血에 대한 실험적 연구로는 주로 혈전 병태 모델을 이용해서 하고 있다²¹⁾.

염증의 증상은 전신증상과 국소증상으로 나뉘는데, 전신증상은 발열, 피로, 식욕감퇴, 쇠약 등이 있고, 국소증상으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실 등이 있는데, 이와 같은 염증의 국소적 증상의 발현기전은 혈류 및 혈관크기의 변동, 혈관투과성의 변화, 백혈구침윤에 기인한다^{8,22)}. 最近의 瘀血에 관한 다양한 연구에서는 순환장애로 일어나는 缺血, 鬱血, 혈전형성 및 水腫 등과 대사 장애로 일어나는 조직의 병리반응 및 細胞分化不良과염증으로 인한 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축 혹은 증식 등이 瘀血의 病態와 유사하다고 보고 있다²³⁾. 따라서 韓醫學에서의 活血祛瘀方은 현대의학에서의 혈전에 대한 효과뿐 아니라 염증에 대한 일정 효과도 나타낼 것이라고 사료된다.

이에 著者는 復方紅藤敗醬散의 抗血栓 및 抗炎症 효과에 대하여 실험적 연구를 통해 알아보았다.

抗血栓 效能에 대한 실험에서, 먼저 실험 농도의 설정을 위해 mLFCs에 대한 세포독성을 평가하였는데 復方紅藤敗醬散(BHPS)은 50, 10 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군(100%)에 비해 각각 89.4 ± 6.5 , 95.5 ± 6.6 , 94.6 ± 5.8 %로 나타나 세포독성이 없는 것으로 평가되었다 (Table 1).

ADP 6 μM 에 의해서 유도된 血小板凝集 抑制율은 BHPS 20, 10, 5, 2.5,

1.25, 0.6, 0.3, 0.15 및 0.07 mg/ml 濃度에서 각각 100, 100, 100, 88.4, 50.4, 27.0, 6.7, 1.8 및 0 %로 나타났으며(Fig. 1), epinephrine 5 μM에 의해서 유도된 血小板凝集 抑制率은 BHPS 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15 및 0.07 mg/ml 濃度에서 100, 100, 91.5, 76.5, 49.1, 25.1, 13.0, 5.2 및 0 %로 나타났다 (Fig. 2).

凝集 유도제로 ADP를 사용한 경우 E_{max}는 102.47 %로 나타났고, EC₅₀은 1.11 mg/ml로 나타났다. Epinephrine의 경우는 E_{max}가 103.31 %, EC₅₀은 1.25 mg/ml로 나타났다. Sigmoide E_{max} model에서 곡선의 sigmoidicity를 나타내는 γ 은 ADP와 epinephrine이 각각 1.93와 1.46으로 나타났다(Table 2).

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 肺塞栓 실험에서 對照群은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 양성對照群인 aspirin 投與群은 8 마리 중 3 마리만이 죽거나 15 분 이상 마비가 지속 되었다. 이에 반하여 BHPS 投與群은 8 마리 중 4 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 50 %의 抑制 效果를 나타내었다(Table 3).

Dextran은 蔗糖으로부터 만들어진 포도당으로 구성된 수용성다당류로서 혈장 증량제로 사용되고, 항원항체반응을 일으킬 가능성이 많고 혈소판 응집을 방해하며 적혈구응집을 촉진시키므로²⁴⁾, 이를 이용해 瘀血을 유발시킨 후 BHPS extract를 투여하여 혈소판수, Prothrombin time(PT), Activated partial thromboplastin time(APTT), fibrinogen 量을 측정하였다.

혈소판은 그 막에 함유된 다량의 phospholipids를 중심으로 한 혈액의 응

고작용, 세포구성인자와 대사물질 (prostaglandins, serotonin, 세포 성장인자, cyclic AMP 등)에 의한 혈관운동, 염증반응 및 동맥경화현상 등이 알려짐과 동시에 생체 내 반응에 의해서도 혈전형성의 과정에 결정적으로 관여하는 것으로 밝혀져, 혈소판 수는 응혈 및 혈전형성 여부의 대표적 지표가 되고 있다²⁵⁾.

血小板수 변화에서는 正常群이 $658.7 \pm 18.5(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 인데 비하여, 對照群은 $508 \pm 15.9(\times 10^3/\text{mm}^3)$, BHPS 投與群은 $602.3 \pm 19.8(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 對照群에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 4-1).

Prothrombin time 측정은 혈장에 조직 thromboplastin과 calcium을 첨가하여 fibrin이 석출할 때까지의 시간을 측정하는 것으로, 이 반응은 VII, X, II 인자와 fibrinogen이 관여하므로 PT는 외인성 및 공통성의 응고 과정 이상을 검출하는 방법이다.^{26,27-28)}

Prothrombin time에 미치는 效果에서는 正常群이 $19.8 \pm 1.5(\text{sec})$ 인데 비하여, 對照群이 $28.4 \pm 2.1(\text{sec})$, BHPS 投與群이 $20.8 \pm 1.8(\text{sec})$ 로 對照群에 비하여 유의성 있게 단축되었다(Table 4-2).

Thromboplastin은 혈액응고에 중요한 인자로 출혈 시에 혈장 속에 있는 prothrombin을 thrombin으로 바꿈으로써 止血에 관여하는 것으로, 활성화 부분 APTT의 검사목적은 지혈기구의 이상이 어디에 있는 가를 조사하는 검사로 이 검사에서 이상치를 보이는 것은 내인계 응고장애가 있음을 의미하는 것이다²⁶⁾.

APTT에 미치는 效果에서는 正常群이 $38.5 \pm 2.4(\text{sec})$ 인데 비하여, 對照群이

52.7 ± 1.6(sec), BHPS 投與群이 40.5 ± 3.1(sec)로 對照群에 비하여 유의성 있게 단축되었다(Table 4-3).

Fibrinogen은 최초로 그 존재가 확인된 응고인자로 응고과정 최종단계의 인자이다. 간에서 합성되고 혈중으로 방출되는데 thrombin에 의해 분해되어 fibrin으로 전환되어서 지혈인자 또는 창상국소의 fibrin matrix의 기초재료가 된다²⁶⁾. Fibrinogen은 급성기 반응단백의 하나이기도 하여 염증, 악성종양, 혈전 급성기, 신장질환, 당뇨병 등에서 증가하는 경우가 많은 한편, 감소하는 경우로는 간 실질 장애로 인한 생산저하 및 파종성 혈관내응고증(DIC, disseminated intravascular coagulation)에서처럼 소비항진을 들 수 있다. 따라서 이는 심근경색, 간질환, 괴저성 손상 및 출혈증과 같은 질병의 예측 및 치료에 유용하게 응용되고 있다²⁶⁾.

Fibrinogen 量에 대한 效果에서는 正常群이 237.5 ± 9.8 mg/dl 인데 반하여, 對照群이 195.7 ± 10.4 mg/dl, BHPS 投與群이 220.4 ± 5.1 mg/dl로 나타나 유의성 있게 증가하였다(Table 5).

본 연구에서 BHPS 투여군의 platelets 수치 및 fibrinogen 함량이 대조군에 비해 증가된 것은, BHPS이 직접 혹은 간접적으로 응고계의 활성을 억제시키거나 또는 항응고 인자의 활성을 유도하여 platelet 및 fibrinogen의 소비를 억제시킨 결과라고 思料된다.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokines 중 IL-1β, IL-6 및 TNF-α는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokines으로, IL-6는 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조

혈계에 다양한 기능을 나타내는데, 주로 B-cell, T-cell, monocyte 등에 의해 분비되며, 면역계에서 면역반응, 급성기 반응과 hematopoiesis를 조절하는 역할과 함께 host defense mechanism에서 중요한 역할을 담당한다^{29,30)}. TNF-α는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되어 종양세포에서 세포독작용을 하며 염증세포에서 IL-1과 유사한 염증유발 작용과 세포의 증식과 분화를 조절하고 만성염증이나 감염에서도 역할을 하며 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시켜 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 특히 TNF-α는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하며, 최근에는 TNF-α를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다²⁹⁻³¹⁾. 또한 용모 양막염에서의 IL-6 및 TNF-α의 증가³²⁾, pro-inflammatory cytokines 중 IL-6 및 TNF-α이 초기 급성 염증 시 증가³³⁾, 여성의 감염 시 pro-cytokines의 증가³⁴⁾ 등에 다양한 보고가 있어 염증과 면역반응에 있어서 IL-6과 TNF-α의 조절이 중요하다고 할 수 있다.

BHPS의 항염증 효과에 대한 연구에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, IL-1β, IL-6 및 TNF-α 모두의 유전자 발현을 BHPS 100, 50, 10 μg/ml 처리군에서 각각 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3-1, Fig. 3-2, Fig. 3-3).

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin(PG)을 생성하는 과정에 작용하는 효소이며, 현재 COX-1과 COX-2가 알려져 있다.

COX-1은 조직 내에서 기본적으로 존재하며 일정한 작용을 꾸준히 나타내는 반면 COX-2는 염증을 포함한 다양한 자극에 의해 단기간 내에 급격히 발현되는 것으로 알려져 있다. COX-2의 생성을 자극하는 요인으로는 IL-1, IL-2, TNF- α 와 같은 cytokines 그리고 그람 음성균의 세포 표면에 존재하는 단백질로서 염증반응의 가장 중요한 역할을 하는 물질로 알려진 lipopolysaccharide(LPS)가 있으며 IL-2와 IL-10에 의해 억제된다. 자극된 COX-2는 PG의 생성을 촉진하며 혈관의 수축작용과 염증반응에 관여하여 조기전통이나 임신중독증 그리고 여러 여성생식기 감염 및 종양에서 비정상적으로 발현되어 자궁조직 내 PG 대사산물이 증가된다고 알려져 있다.^{34,35)}

RAW 264.7 세포주에서 COX-2 遺傳子 發現의 RQ 값은, 正常群 값이 0.242, 對照群이 1.00로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 각각 0.678, 0.688, 0.969의 RQ 값을 나타내어 對照群에 비해 濃度 依存的으로 遺傳子 發現을 抑制하였다(Fig. 3-4).

Nitric Oxide(NO)는 생체 내 혈관에서 강력한 혈관확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관내피세포에 부착하는 것을 막는 등의 역할을 한다. 생체 내에서 NO의 전구물질은 L-arginine으로서 Nitric Oxide Synthesis (NOS)의 작용으로 L-arginine이 산화되면 L-citrulline과 NO를 생성하게 된다. NO자체는 매우 불안정한 라디칼기로서 생성된 지 수초이내에 nitrite 또는 nitrate로 산화된다. NOS는 일종의 산화효소로서 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS 및 유도성 NOS(iNOS)

의 세 가지 아형으로 존재한다. 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS는 활성화하는데 칼슘과 calmodulin이 필요하며 지속적으로 분비되는 반면 iNOS는 칼슘과 무관하게 활성화되며 염증성 cytokine이나 LPS등에 반응하여 분비된다.³⁶⁾

NO와 PG 그리고 이들과 관련된 두 효소, NOS와 COX-2는 염증반응의 단계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 iNOS와 COX-2의 염증반응에서의 중요성이 대두되고 있으며 이들을 염증반응 및 염증 초기반응 물질에 의해 상승 조절되고, 활성화된 이들 효소에 의한 생성물이 급성 및 만성 염증반응의 중요한 매개체로 작용한다고 알려져 있다.³⁷⁾

인체 내에서는 끊임없이 Reactive Oxygen Species(ROS)와 Reactive Nitrogen Species (RNS)가 불가피하게 생성되고 이들은 세포내의 DNA나 기타 핵산 등과 반응하여 산화적 손상 및 변이를 유발한다.³⁸⁾ 활성화된 대식세포는 많은 양의 산소 라디칼을 생성하게 되는데 이는 내피세포의 허혈과 재관류 동안에 보이기도 한다. 세포막 NOS와 NO의 활성화는 hydroxyl radical을 생성하고 ROS를 발생시키며 세포의 원형질 내에서는 미토콘드리아는 증가된 Ca^{2+} 로 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical들의 생성 증가를 초래하고 free radical들은 DNA 손상 외에도 지질과산화에 의해 세포막을 손상시켜 세포사에 이르게 한다. 또한 모세혈관이나 blood-brain barrier의 cytokines의 투과성을 높이게 되어 염증과 산화적 스트레스로 인한 ROS는 유관하며 또한 NO와

도 밀접한 관계가 있다³⁹⁻⁴¹⁾.

RAW 264.7 세포주에서 NOS-II 遺傳子 發現의 RQ 값은 正常群이 0.048, 對照群이 1.00로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群이 각각 0.415, 0.622, 0.884의 RQ 값을 나타내어 對照群에 비해 濃度依存的으로 遺傳子 發現을 抑制하였다(Fig. 3-5).

RAW 264.7 세포주에서 NO 生成량은 正常群의 OD 값이 0.054 ± 0.012 , 對照群이 1.458 ± 0.236 로 나타났으며, BHPS 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群에서 각각 0.552 ± 0.148 , 0.894 ± 0.143 , 0.904 ± 0.323 으로 나타나 對照群에 비하여 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度에서 有意性 있게 NO 生成을 抑制하였다(Fig. 4).

세포내 ROS의 生成량은 對照群이 正常群에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, BHPS 投與群 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D) 은 對照群에 비하여 濃度依存的으로 ROS 生成을 抑制하였다(Fig. 5).

급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokines 변화에 미치는 영향에서, 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 生成량을 측정된 결과, BHPS 투여군 모두에서 대조군에 비하여 有意性 있게 감소하였다(Fig. 6-1, Fig. 6-2, Fig. 6-3).

급성 염증성 질환 생쥐 모델의 脾臟 및 肝 조직 내 cytokines 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 mRNA 발현량에 미치는 영향을 알아보았다.

脾臟 組織에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 生成량을 測定한 결과, 正常群의 RQ값이 0.012, 0.175, 0.078 이었고, 對照群은 모두 1.00으로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 각각 0.823, 0.714,

0.848로 감소하였다. 간조직에서는 正常群이 각각 0.021, 0.214, 0.112 이었고, 對照群은 모두 1.00으로 나타난 반면, BHPS 投與群에서는 각각 1.102, 1.102, 1.124로 증가하였다(Fig. 7-1, 7-2, 7-3).

LPS가 체내로 주입되면 혈장에서 LPS 결합단백과 함께 백혈구나 내피세포의 CD14 receptor에 부착되어⁴²⁾ 세포 손상을 초래하며, 이들 세포로 하여금 platelet activating factor, prostaglandins, leukotrienes 등의 cytokines을 유리시키거나 complement 등의 혈장 단백을 활성화시키는 데⁴²⁻⁴⁴⁾, 이러한 인자들은 심근의 억제, 응고계의 활성화, 혈관확장, 여러 기관의 기능부전 등을 초래하게 된다^{42,45)}. 여기에서 LPS에 의해 응고계가 광범위하게 활성화 되는 것은 LPS가 내피세포와 혈장단백구를 자극하여 tissue factor를 유리시킴으로써 외인계를 활성화시키는 것이 주된 기전으로 알려져 있다^{44,46)}.

생쥐의 腹腔에 LPS 3 mg/kg을 주사하여 lethal endotoxemia를 유도한 후 5일간 生命延長을 관찰한 결과, BHPS 投與群은 LPS 투여 후 3일째에 對照群에 비하여 生存率이 증가되었다(Fig. 8).

이상의 실험적 연구 결과를 종합하여 볼 때, 復方紅藤敗醬散(BHPS)은 抗血栓 및 抗炎症 효과가 인정되므로 血栓症 및 이와 관련된 혈행장애로 인한 瘀血症과 다양한 炎症性 疾患에 有效하게 應用될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

復方紅藤敗醬散(BHPS)의 抗血栓 효과 및 抗炎症 작용의 기전을 究明하기 위하

여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 復方紅藤敗醬散은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 세포독성을 나타내었다.
2. 復方紅藤敗醬散은 ADP와 epinephrine에 의해 유도된 혈소판응집을 억제하였으며 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 50 % 억제하였다.
3. 復方紅藤敗醬散은 dextran 어혈 병태를 유발한 흰쥐의 혈소판수를 증가시켰으며, PT 및 APTT를 유의성 있게 단축시켰고, fibrinogen 量을 유의성 있게 증가시켰다.
4. 復方紅藤敗醬散은 RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, 및 NOS-II의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, NO의 생성을 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 억제하였고, ROS의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
5. 復方紅藤敗醬散은 급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 억제하였으며, 비장 조직에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 감소시켰고, 간 조직에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 증가시켰다.
6. 復方紅藤敗醬散은 LPS 투여 후 3일째에 대조군에 비하여 생존율을 증가시켰다.

이상의 실험 결과로 보아 復方紅藤敗醬散(BHPS)은 항혈栓 및 항염증 효과가 인정되므로, 濕痰과 瘀血로 인한 여성의 生殖器와 泌尿器 炎症疾患에 유효하게 應用될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2006년 07월 28일
- 심 사 일 : 2006년 08월 01일
- 심사완료일 : 2006년 08월 09일

參考文獻

1. 夏桂成. 中醫臨床婦科學. 中國北京 : 人民衛生出版社, pp.285-293,1994.
2. 李尙仁. 本草學. 서울 : 修書院, p.198,348,401,450,1981.
3. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學(上). 서울 : 圖書出版政談, p.281,pp.61,101,190-191,2002.
4. 大韓產婦人科學會 教科書 編纂委員會. 婦人科學. 서울 : 도서출판 칼빈서적, pp.256-283,1997.
5. 서울大學校出版部. 家庭醫學. pp.492-494,1989.
6. 李秀芝. 骨盤炎 1, 2號方治療骨盤炎 70例. 山東中醫雜誌. 12(1):21,1993.
7. 陳自明. 婦人大全良方. 人民衛生出版社. p.215,1985.
8. 大韓病理學會. 病理學 II. 서울 : 高文社, pp.71-104,112-120,540-542,1995.
9. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울 : 고려의학, pp.62-94,1998.
10. 전국한의과대학 병리학 교실 編. 동의병리학. 서울 : 一中社, pp. 152-165,272-274,424-426,1999.
11. 趙洪建. 歸戒破癥湯이 endotoxin으로 誘發된 白鼠의 實驗的 血栓症에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 碩士學位論文. 1994.
12. 崔彰祐. 加味桂枝茯苓丸이 血栓症에 미치는 實驗的 研究. 大田大學校大學院. 碩士學位論文. 1991.
13. 高光錫. 麻黃附子細辛湯 및 處方構成藥材가 Endotoxin으로 誘發된 血栓症

- 에 미치는 影響. 서울 : 慶熙大學校大學院, 1990.
14. 諸鍾珉. 紅藤敗醬散의 消炎作用에 대한 實驗的 研究. 大田大學校大學院. 碩士學位論文. 2004
15. Kimura, Y., Tani, T., and Watanabe, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 35(II):1144-1149,1985.
16. 羅元愷. 女科述要. 新中醫(3). pp.17-18,1993.
17. 從春雨. 中醫婦科學. 中醫古籍出版社. pp.204-205,1989.
18. 朱承汜. 中醫婦科. 人民衛生出版社. pp.120-121,1989.
19. 周鳳梧. 實用中醫婦科學. 山東科學技術出版社. pp.345-346,1985.
20. 전국한의과대학본초학교수 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. p.178,179,195, 196,222,223,306,307,354,355,369,370,pp. 410-414,445,446,1991.
21. 安圭錫, 朴種鉉, 朴耕模. 瘀血病態모형 개발에 관한 연구. 대한동의병리학회지. pp.25-34,1999.
22. 송계용, 지재근, 함의근. 핵심 병리학. 서울 : 고려의학. pp.62-94,1998.
23. 張之南 외. 血瘀證與活血化瘀研究. 上海 : 上海科學技術出版社. pp.429-431,1990.
24. 金敬煥, 李宇宙. 藥理學 講義. 서울 : 醫學文化社. pp.781-782,1998.
25. 서울대학교의과대학. 혈액학. 서울 : 서울대학교출판부. pp.231-233,242-249,1990.
26. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 서울 : 의학문화사. pp.587-600,1096-1099, 1118-1121,1147,1151,1212-1214,2003.
27. 의학교육연수원. 증상별 임상검사. 서울 : 서울대학교출판부. pp.231-233 242-249,1999.
28. Yu Mujun, et al. Screening tests of disseminated intravascular coagulation. Guidelines for rapid and specific laboratory diagnosis. *Crit care Med.* pp. 1777-1780,2000.
29. Aeberi D., et al. Inhibition of the TNF-pathway use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med.Wkly.* 132:414-422,2002.
30. Feldman M., et al. Anti-TNF- α 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.
31. Brian T. Pierce, et al. The effect of fetal acidemia on fetal-placental vascular tone and production of inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 187(4):894-897,2002.
32. Henrik Dollner. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-cytokines and cytokine inhibitors. *An International Journal of Obstetrics and Gynecology.* 109:534-539,2002.
33. Matthias Winkler. Role of cytokines and other inflammatory mediators. *An International Journal of*

- Obstetrics and Gynecology. 110:118-123,2003.
34. Charles N. Landen, Jr. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 188(5): 1174-1176,2003.
35. 이지현 외. 배양된 인간 영양배엽 세포주에서 세균내독소에 의한 MMP-2와 MMP-9의 발현에 있어서 COX-2, 대한산부인과학회지 45(10): 1752-1757,2002.
36. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. 대한산부인과학회지 45(5):766-773,2002.
37. Carla Biondi, et al. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E2 biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 60(1):35-52,2003.
38. 김영태 외. 한국 여성 자궁경부 종양에서의 항산화체계 및 산화적 스트레스. 대한산부인과학회지. 45(1):145-152,2002.
39. 임소영. Nitric Oxide Synthase의 억제제가 전뇌허혈/ 재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 36:710-722,1999.
40. D. Saugstad. Therapy in free radical disease in the newborn. *Current Obstetrics & Gynecology*. 10(2):103-108,2000.
41. 서영준. 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암 예방. 분자세포생물학뉴스. 13:8-17,2002.
42. Stanley L. Robbins et al : *Pathologic basis of disease*. 5th ed. philadelphia, Saunders. pp.99-114, 117-121,318-319,623-626,1994.
43. Parrillo Joseph E.. mechanism of disease, pathogenetic mechanism of septic shock. *N Eng J Med*. 328(20):1471-1478,1993.
44. Levi Marcel, ten Cate, Hugo. Current conceptions: disseminated intravascular coagulation. *N Eng J Med*. 341(8):586-592,1999.
45. Hermida, Jose, et al. Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits: effect of recombinant hirudin on hemostatic parameters, fibrin deposits, and motality. *J Lab clin Med*. 131(1):77-83,1998.
46. Levi Marcel, et al. Novel approaches to the management of disseminated intravascular coagulation. *Crit care Med*. 28(9):S20-S24,2000