대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.20. No.1 : 125-143 (2007)

加減仙方活命飮의 抗炎作用에 대한 實驗的 硏究

대전대학교 한의과대학 부인과교실
신선미, 김수민, 김의일, 이정은, 유동열

ABSTRACT

The Experimental Study on anti-inflammatory Effects of Kagamsunbanghwalmyungeum(KSBH)

Sun-Mi Shin, Soo-Min Kim, Eui-Il Kim, Jung-Eun Lee, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

Purpose: This study was to investigate the anti-inflammatory effects of Kagamsunbanghwalmyungeum(KSBH) which has been medicated the patient such as breast abscess.

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

Results: The cytotoxicity on mouse lung fibroblast cells(mLFC) was not served at all concentration of KSBH. KSBH in RAW264.7 cell inhibited IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 and NOS-II mRNA genes expression in a concentration-dependent manner, and specially inhibited NOS-II production very significantly at 100㎍/㎖. KSBH inhibited NO production significantly in a concentration-dependent manner and ROS production in a concentration-dependent manner. KSBH inhibited IL-1β, IL-6 and TNF-α production significantly in serum of acute anti-inflammation-induced mice. KSBH increased the survival rate from the 3rd day on LPS-induced lethal endotoxemia.

Conclusion: These results suggest that Kagamsunbanghwalmyungeum(KSBH) can be useful in treating a lot of women mammary diseases caused by inflammation such as breast abscess.

Key Words: Kagamsunbanghwalmyungeum(KSBH), anti-inflammatory effects, breast abscess.

교신저자(유동열) : 대전광역시 중구 대흥동 22-5번지 대전대학교부속한방병원
전화 : 042-229-6756 이메일 : purifroggy@hanmail.net

Ⅰ. 緖 論

仙方活命飮은 陳[1]의 ≪婦人良方大全≫에 처음 收錄된 처방으로 癰疽疾患에 사용되는 方劑[2,3]이며, 加減仙方活命飮은 여기에 蒲公英, 紫花地丁, 蓮翹, 黃芩, 黃連을 加하고 陳皮, 貝母, 防風, 穿山甲, 天花粉, 乳香, 沒藥을 祛하여 淸熱解毒, 凉血散瘀의 작용으로 乳疽를 治療할 목적으로 立方되었다[4].

乳疽는 ≪諸病源候論·疽發乳候≫[5]에 최초로 收錄되었으며, 유방의 深部에 膿瘍이 생겨 乳癰보다 더 깊은 곳에서 완만하게 진행되는 慢性 化膿性疾患으로 乳房後位膿腫[4]이라고도 하는데, 初起에는 深部의 병변이기 때문에 뚜렷한 증상 없이 유방에 단단한 結塊가 있으나 피부색은 정상이고 木硬과 같은 은은한 통증만을 느낀다. 그러나 成膿하는 것이 완만하게 진행되어 약 1개월 정도가 경과되면서 潰膿하게 되며, 일단 화농하면 종괴가 점차적으로 증대되면서 통증이 심해지고 惡寒, 發熱, 頭痛, 骨節酸痛, 口渴과 같은 전신증상들이 있게 된다. 그리고 潰破되면 膿腫이 있었던 위치가 深部에 있어서 潰孔도 비교적 깊이 형성되면서 袋膿狀態 및 傳囊膿腫으로 乳瘻가 쉽게 형성되고, 반복되면 유방형태가 변화되기도 한다[4,6].

乳疽의 治療法은 病程에 따라 初起, 成膿, 潰後를 구분해서 적절하게 治法을 강구하는 것이 중요한데, 初起 形寒發熱하는 경우에는 疏肝淸熱·軟堅散結하고, 成膿難潰한 경우에는 透膿托毒하며, 潰後에 氣血兩虛한 경우에는 調氣補血하는 治法을 위주로 한다[6].

乳癰, 乳疽등 乳房의 炎症性 疾患에 대한 實驗的 硏究로 加味消毒飮[7], 內消散[8], 加味蓮翹湯[9], 加味復元通氣散[10], 加減透膿散[11] 등의 抗炎作用에 대한 연구보고들은 있으나, 加減仙方活命飮에 대한 硏究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 加減仙方活命飮의 抗炎症작용을 실험적으로 究明하고자 세포독성에 미치는 영향, RAW264.7 세포주에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응, 염증 관련 cystokines인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 NOS-Ⅱ의 유전자 발현에 미치는 영향, NO, ROS 생성량에 미치는 영향, LPS로 유도된 연증 생쥐 모델의 혈청 내 cystokines 변화에 미치는 영향 및 생명 연장 효과 등을 실험 평가하여 有意한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재 료

1) 동 물

실험동물은 한국생명공학연구원에서 구입한 수컷 ICR계 마우스와 Balb/c계 마우스 8주령을 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일중 12시간은 200-300Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약 물

실험에 사용된 加減仙方活命飮(KSBH)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

Scheme 1. Prescription of Kagamsunbanghwalmyungeum(KSBH)

한약명	생 약 명	중량 (g)
蒲公英	*Taraxaci herba*	30
紫花地丁	*Violae herba*	30
皂角刺	*Gleditsiae spina*	15
當 歸	*Angelicae gigantis radix*	12
金銀花	*Lonicerae flos*	12
赤芍藥	*Paeonia radix rubra*	9
蓮 翹	*Forsythiae frucyus*	9
黃 芩	*Scutellariae radix*	9
白 芷	*Angelicaedahuricae radix*	9
甘 草	*Glycyrrhizae radix*	9
黃 連	*Coptidis rhizoma*	6
Total		150

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

실험에 사용된 시약은 lipopolysaccaride(LPS), chlorosulforrodamin -B(SRB), diethyl pyrocarbonate(DEPC), tris-base, tris-HCL, ethanol, trypsin-EDTA, trichloroacetic acid(TCA), acetic acid, dulbecco's minimum essential medium(DMEM), DNase type I, penicillin, streptomycin, amphotericin, 2,7-dichlorodihydro fluorescin diacettate (DCFH-DA), anti-bady avidin-HRP, chloroform, naphthylethylen diamine dihydrochloride, sulfonylamide, H_3PO_4, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), RNAzolB, RNA inhibitor, ACK solution, KCl, isopripanol, magnesium chloride($MgCl_2$)는 Sigma(USA)사 제품을 사용하였으며, fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone Logan(USA)사 제품을, RNase는 Pharmingen Torreyana(USA)사 제품을, IL-1β, IL-6, TNF-α ELISA kit는 R&D system(USA)사 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge(Beckman Co., USA), rotary vacuum evaporator(Büchi 461, Swiss), vacuum pump(Büchi 461 Co., Swiss), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), roller mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), 열탕추출기(대웅, Co., Korea), CO_2 incubator(Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo Co., Japan), micro-pipet (Gilson Co., France), water bath(Vision scientific Co., Korea), heating block(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer(Shimazue Co., Japan), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), plate shaker(Lab-Line Co., USA), ELISA reader (Molecular Devices Co., USA), 7500 Fast Real -Time PCR system (Applied Biosystems Co., USA), flow cytometer(Becton Dickinson Co., USA) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출물 분리

KSBH 2첩 분량을 증류수 2,000㎖에 가하여 열탕 추출기로 3시간 추출하고 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치(Rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결 건조기(Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조하여 KSBH 추출액 20.8g을 얻어 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Mouse lung fibroblast cells(mLFCs) 배양

정상 Balb/c 생쥐의 폐조직(1g)을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거한 후, cool D-PBS로 3회 세척하여 conical tube 15㎖에 넣고 1,400rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM {containing collagenase A 5mg/㎖ (BM, Indianapoilis, IN, USA)와 DNase type I 0.15mg/㎖, antibiotics (penicillin 10^4U/㎖, streptomycin 10mg/㎖, amphotericin B 25㎍/㎖)}를 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30분간 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리 하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하는 작업을 3회 반복한 후 최종적으로 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

3) 세포독성 측정

mLFCs에 KSBH(200㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한 후, 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50㎕ 가하고, 1 시간 동안 4℃에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 다시 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

4) RAW264.7 세포에서의 정량적 중합효소연쇄 반응

(1) RAW264.7 세포 배양

Murine macrophage cell line RAW264.7 세포주는 10% FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1500rpm에서 원심분리 하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하는 작업을 3회 반복하여 살아있는 부착 세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

(2) RAW264.7 cell에서 RNA 분리

먼저 RAW264.7 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 KSBH(100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖)를 처리하고 1시간 후 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에

chloroform($CHCl_3$) 50㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량 혼합하여 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 DNase I(10U/㎕) 2 U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5㎕ 10 mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/25㎕), RNA inhibitor로서 1㎕ RNase inhibitor(20U/㎕), 1㎕ 100 mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer(250mM, Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(4) 정량적 중합효소 연쇄반응

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 primers는 아래와 같다.

Scheme 2. Nucleotide Sequence of Primers

G3PDH	F	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	R	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
TNF-α	F	5'TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCG GTCC 3'
	R	5'GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTG TGGG 3'
IL-6	F	5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'
	R	5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
IL-1β	F	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
	R	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
COX-2	F	5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA3'
	R	5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
NOS-II	F	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
	R	GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

염증 사이토카인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도가 200nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은

pre-denaturation은 2min at 50℃, 10min at 94℃, 그리고 40cycles을 0.15min at 95℃, 1min at 60℃에서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 아래의 수식으로 target group의 Quantitative PCR을 정량하여 RQ(relative quantitative) 값을 측정하였다.

y = x (1+e)n

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

e = efficiency

5) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포주를 96 well plate에 2×10^4cells/well로 분주하였다. 여기에 KSBH(100, 50, 10㎍/㎖) 처리하고 1시간 후 LPS(2㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonylamide in 5% H_3PO_4)를 1:1로 혼합 처리하였다. 다시 배양 상층액 100㎕를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100㎕를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

6) 세포내 reactive oxygen species (ROS)의 분석

RAW264.7 세포주내의 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate에 5×10^5cells/well로 분주하였다. 여기에 KSBH(100㎍/㎖, 50㎍/㎖)를 처리하고 1시간 후 LPS(2㎍/㎖)를 처리한 다음, 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μM을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer(Becton Dickinson Co., USA)로 세포내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

7) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) 혈청 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정

Lipopolysaccharide(LPS)를 1 mg/kg을 Balb/c계 마우스 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100㎕(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibady cytokine- biotined conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibady Avidin-HRP conjugated 100㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 염증 생쥐 모델의 생명 연장율 측정

일주일간 KSBH를 경구투여 한 후 LPS 3mg/kg을 복강에 주사하고 실험군은 1시간 전에 다시 한번 KSBH를 경구투여 하여, 5일간 생쥐의 생존율을 관찰하여 생명 연장 곡선을 만들었다.

8) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석방법을

이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 實驗成績

1. 세포독성에 미치는 영향

mLFCs에 대한 세포독성 평가에서 KSBH는 200, 100, 50, 10, 1㎍/ml 농도에서 대조군(100%)에 비해 각각 92.6 ± 1.8, 94.6 ± 2.8, 97.6 ± 5.5, 102.5 ± 3.8, 99.6 ± 4.6%로 세포독성이 없는 것으로 나타났다.(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Cytotoxicity of KSBH Extract on Mouse Lung Fibroblast Cells

Drug	Dose (㎍/ml)	% of Control Data mLFC
Control	0	100 ± 5.4
KSBH	200	92.6 ± 1.8
	100	94.6 ± 2.8
	50	97.6 ± 5.5
	10	102.5 ± 3.8
	1	99.6 ± 4.6

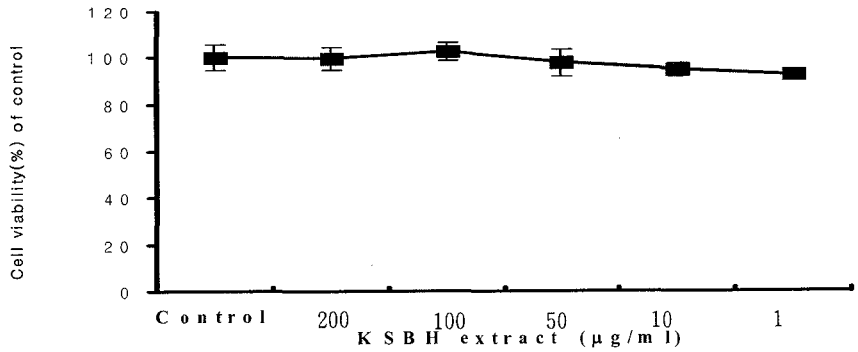

Fig. 1. Cytotoxicity of KSBH extract on mouse lung fibroblast cells.
mLFCs were pretreated with various concentrations of KSBH extract. The data(% viability) in the Figure are expressed as the mean ± sem. Comparison between KSBH-treated and untreated control groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher.

2. RAW264.7 cell line에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응

RAW264.7 세포주에서 mRNA를 분리하여 real-time PCR로 분석하였다(Fig. 2). A는 각각의 실험군에 대한 dissociation 곡선을 그린 것으로 G3PDH, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II의 primer의 design이 정확히 이루어진 상태를 보여주고 있다. 그리고 B는 real-time PCR의 실시간 증폭되는 곡선을 보여주는 것으로 40 cycle이 반복되면서 G3PDH와 염증 싸이토카인의 증폭에 대한 상대정량(RQ)치를 분석한 그림이다.

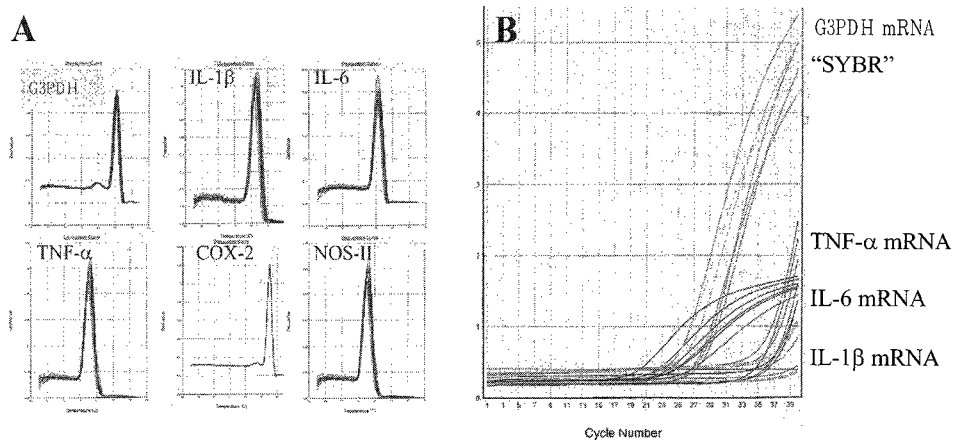

Fig. 2. Dissociation curves (A) and Amplification profiles (B) of inflammatory gene expression in RAW264.7 cell line.

Messenger RNA of G3PDH, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 and NOS-II gene expression in RAW264.7 cells samples were amplified using mouse inflammatory mRNA gene primers by SYBR Green PCR. The dissociation curves (A) for G3PDH, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, and NOS-II mRNA and G3PDH products are shown in panels B, respectively. The *Tm* values of inflammatory gene and G3PDH amplicons are indicated alongside their corresponding dissociation curves.

3. 염증 관련 cytokine에 미치는 영향

1) IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-1β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군(WT)이 0.125, 대조군(CT)이 1.00로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군에서는 각각 0.362, 0.458, 0.875로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다.(Fig. 3).

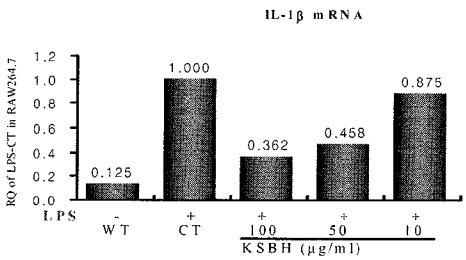

Fig. 3. Inhibitory effects of KSBH extract on IL-1β mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of KSBH extract(100, 50 and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS: 2㎍/㎖) for 6 hr. IL-1β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군(WT)이 0.121, 대조군(CT)이 1.00인데 비하여, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.345, 0.684, 0.889로 나타나, 역시 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다.(Fig. 4).

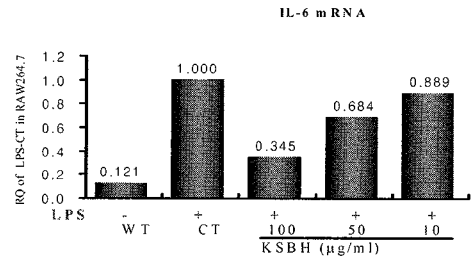

Fig. 4. Inhibitory effects of KSBH extract on IL-6 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of KSBH extract(100, 50 and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS: 2㎍/㎖) for 6 hr. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

3) TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 TNF-α 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군(WT)이 0.041, 대조군(CT)이 1.00로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군에서는 각각 0.458, 0.874, 0.957로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다.(Fig. 5).

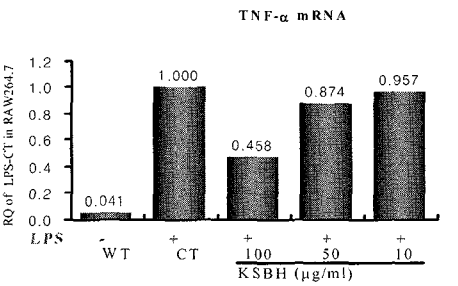

Fig. 5. Inhibitory effects of KSBH extract on TNF-α mRNA expression in RAW264.7 cell line.
RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of KSBH extract(100, 50 and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS: 2㎍/㎖) for 6 hr. TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은 정상군(WT)이 0.242, 대조군(CT)이 1.00로 나타난 반면, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.345, 0.658, 0.786로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다.(Fig. 6).

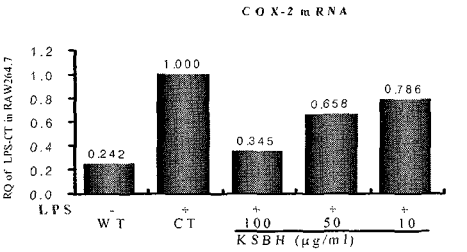

Fig. 6. Inhibitory effects of KSBH extract on COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cell line.
RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of KSBH extract(100, 50 and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS: 2㎍/㎖) for 6 hr. COX-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현의 RQ 값은 정상군(WT)이 0.048, 대조군(CT)이 1.00로 나타난 반면, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.522, 0.745, 0.798로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다.(Fig. 7).

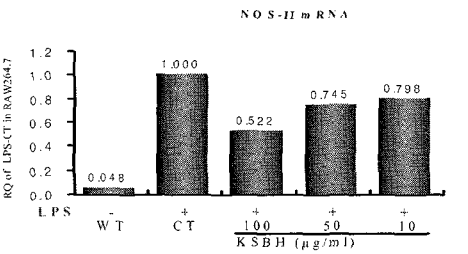

Fig. 7. Inhibitory effects of KSBH extract on NOS-II mRNA expression in RAW264.7 cell line.
RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of KSBH extract(100, 50 and 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS: 2㎍/㎖) for 6 hr. NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

4. Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는

영향

RAW264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군(WT)의 OD값이 0.054 ± 0.012 nm, 대조군(CT)이 1.458 ± 0.236nm로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.636 ± 0.225, 0.725 ± 0.175, 0.986 ± 0.245로 나타나 대조군에 비하여 100, 50㎍/㎖ 농도에서 유의성 ($p<0.05$, $p<0.05$) 있게 NO 생성을 억제하였다.(Fig. 8).

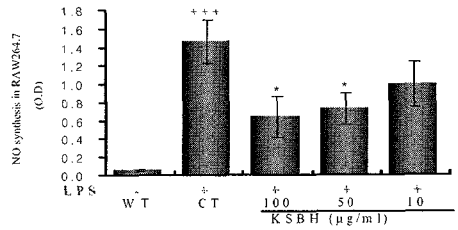

Fig. 8. Inhibitory effect of KSBH extract on the nitric oxide release in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of KSBH extract(100, 50, 10㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2㎍/㎖) for 48 hr. The culture supernatent was collected 24 hr later and NO(nitric oxide) concentration in the supernatent was assayed. The data are expressed as the mean ± sem.

+: Statistically significant value compared with normal data(+ : $P<0.05$, ++ : $P<0.01$, +++ : $P<0.001$)

*: Statistically significant value compared with control data(* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$)

5. 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성량에 미치는 영향

ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, KSBH 투여군(100㎍/㎖ C, 50㎍/㎖ D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다.(Fig. 9).

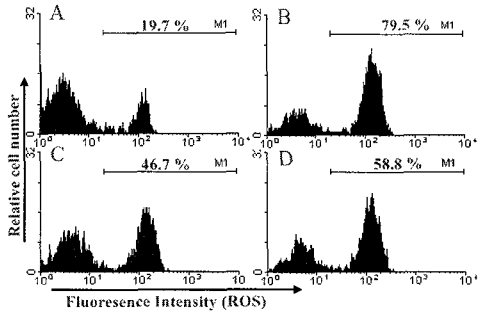

Fig. 9. Inhibitory effect of KSBH extract on the ROS production in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were treated with various concentrations of KSBH extract(C: 100㎍/㎖, D: 50㎍/㎖) in the presence(control, B) or absence (A) of LPS(2㎍/㎖) for 48hr. After culture, cells were treated with DCFH-DA reagent(50mM), harvested, and assayed for ROS positive cells(M1) by flow cytometry.

6. 급성염증성질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokine 변화에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

급성 염증 유발 생쥐 모델의 혈청 내 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.3 ± 0.7ng/㎖, 대조군은 57.4 ± 5.2ng/㎖로 나타난 반면, KSBH 투여군에서는 32.1 ± 5.5ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소하였다.(Fig. 10).

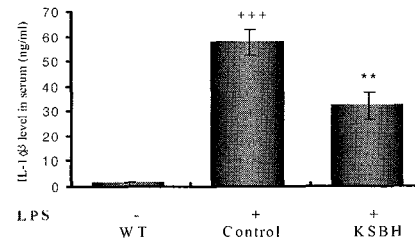

Fig. 10. The effect of KSBH extract on IL-1β production in sera following LPS co-treatment.

Mice were co-treatment with KSBH extract(6.9㎎/20g) and LPS(1mg/kg). Total IL-1β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. The data are expressed as the mean ± sem(n=6). Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test.
+: Statistically significant value compared with normal data(+ : P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001)
*: Statistically significant value compared with control data(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

급성 염증 유발 생쥐 모델의 혈청내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 3.7 ± 1.4ng/㎖, 대조군은 326.4 ± 27.41ng/㎖로 나타난 반면, KSBH 투여군에서는 247.3 ± 21.3ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 감소하였다.(Fig. 11).

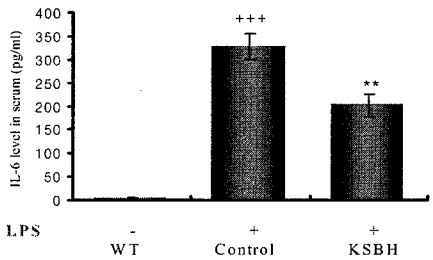

Fig. 11. The effect of KSBH extract on IL-6 production in sera following LPS co-treatment.

Mice were co-treatment with KSBH extract(6.9㎎/20g) and LPS (1mg/kg). Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. The data are expressed as the mean ± sem(n=6). Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test.
+: Statistically significant value compared with normal data(+ : P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001)
*: Statistically significant value compared with control data(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

3) TNF-α 생성량에 미치는 영향

급성 염증 유발 생쥐 모델의 혈청 중 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.1 ± 0.6ng/㎖, 대조군은 77.8 ± 4.7ng/㎖로 나타난 반면, KSBH 투여군에서는 64.5 ± 4.3ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (p<0.05) 결과를 나타내었다.(Fig. 12).

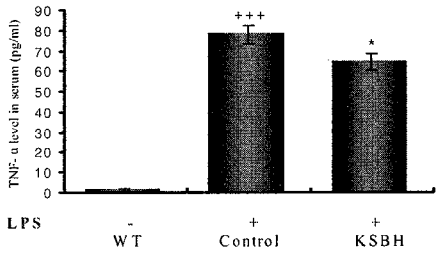

Fig. 12. The effect of KSBH extract on TNF-α production in sera following LPS co-treatment.

Mice were co-treatment with KSBH extract(6.9㎎/20g) and LPS (1mg/kg). Total TNF-α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. The data are expressed as the mean ± sem(n=6). Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test.
+: Statistically significant value compared with normal data(+ : P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001)
*: Statistically significant value compared with control data(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

7. LPS로 유도된 lethal endotoxemia

에 대한 생명연장효과

생쥐의 복강에 LPS(3mg/kg) 주사하여 5일간 관찰한 결과, KSBH 투여군은 LPS 투여 3일째부터 대조군에 비하여 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.(Fig. 13).

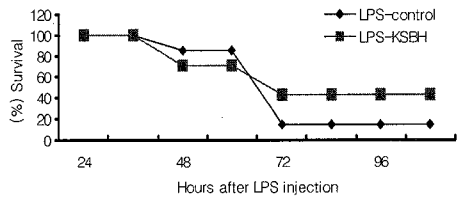

Fig. 13. Protective Effect of KSBH on LPS-induced lethality.

Groups of 7 ICR mice were injected i.p. with 100㎍ of LPS(3mg/kg) after oral administration of normal saline*(control)* or KSBH(6.9㎎/20g) for 7 days. Survival was monitored over the next 5 days. The survival curves from all five experiments were analyzed by the Kaplan-Meier method.

Ⅳ. 考 察

仙方活命飮은 陳[1]의 ≪婦人良方大全≫에 처음 收錄된 처방으로, 許[12]는 "一切癰疽毒腫 未成者內消 已成者潰 排膿止痛消毒之聖藥也."라하여 淸熱, 散風, 行瘀, 活血의 작용으로 癰疽疾患에 널리 사용되는 方劑[2,3]이고, 加減仙方活命飮은 여기에 蒲公英, 紫花地丁, 蓮翹, 黃芩, 黃連을 加하고 陳皮, 貝母, 防風, 穿山甲, 天花粉, 乳香, 沒藥을 祛하여 淸熱解毒, 凉血散瘀의 효능으로 乳疽를 治療할 목적으로 立方되었다[4].

乳房에 대하여 ≪東醫寶鑑≫[12]에서는 "男女乳腎爲根本"이라 하여 그 중요성을 설명하였으며, "女人屬陰, 陰極則必自下而上衝, 故乳房大而陰戶縮也"라 하여 女子는 陰에 屬하고, 陰이 極하면 반드시 스스로 내려와 위로 上衝하므로 乳房은 커지고 陰戶는 줄어든다고 하여 乳房의 발생에 대하여 설명하였고, ≪醫學入門≫[13]에서는 "乳房은 膽胃에 屬하고, 乳頭는 肝에 屬한다" 고 하여 肝胃와의 상관관계를 설명하였다.

乳疽는 유방의 深部에 膿瘍이 생겨 乳癰보다 더 깊은 곳에서 완만하게 진행되는 慢性 化膿性疾患의 하나이다. 임신이나 수유기와는 관계없이 모든 연령층에서 발생되나, 특히 중년 이하의 여성 중에서 유방이 풍만한 경우 또는 수유기에서 많이 발생되고 있다. 임상증상으로는 初起에는 深部의 병변이기 때문에 뚜렷한 증상 없이 유방에 단단한 結塊가 있으나 피부색은 정상이고 木硬과 같은 은은한 통증만을 느낀다. 그러나 成膿하는 것이 乳癰보다 완만하게 진행되어 약 1개월 정도가 경과되면서 潰膿하게 되며, 일단 화농하면 종괴가 점차적으로 증대되면서 통증이 심해지고 惡寒, 發熱, 頭痛, 骨節酸痛, 口渴과 같은 전신증상들이 있게 된다. 그리고 潰破되면 처음에는 황색의 粘稠한 농액이 유출된 후에 점차 희박해지고, 농종이 있었던 위치가 심부에 있어서 潰孔도 비교적 깊이 형성되면서 袋膿狀態 및 傳囊膿腫으로 乳瘻가 쉽게 형성되며, 그리고 반복적인 증상으로 유방형태가 변화되기도 한다. 때로는 전신적인 감염이 유발되기도 한다[4,6].

乳疽에 대한 최초의 내용은 ≪諸病源候論·疽發乳候≫[5]에 "足陽明之脈 ... 其脈虛則腠理開, 寒氣客之, 寒搏于血, 則血澁不通, 故結腫而氣又歸之, 熱氣洪盛, 故成疽也. 熱久不散, 則肉敗爲膿也"라 하여 乳疽의 병인병리에 대하여 논술한 바가

있다[6]. ≪外科啓玄≫[14]에서는 "乳腫最大者曰乳發, 次曰乳癰, 初發卽有頭者曰乳疽"라 하여 有頭疽의 특징이 있는 것을 말했고, ≪外科理例≫[14]에서는 "乳疽一症, 腫硬木悶, 雖破而不潰, 腫亦不消, 尤當急服此散(神效瓜蔞散), 及隔蒜灸. 此二症(乳癆·乳疽), 乃七情所傷, 氣血所損, 亦勞症也. 宜戒怒, 節飮食, 愼起居, 否則不治"라 하여 乳疽의 치법, 섭생법 등을 언급했고, ≪外科大成≫[14]에서는 "生于乳房. 紅腫熱痛者爲癰, 堅硬木通者爲疽, 由肝氣鬱結, 胃熱壅滯而成也."라 하여 乳疽의 병인에 대해 설명하였고, ≪外科秘錄≫[15]에서는 "乳腫最大者, 名曰乳發; 腫而差小者, 名曰乳癰; 初發之時卽有瘡頭, 名曰乳疽. 以上三症, 皆人憎寒壯熱, 惡心作嘔者也."라 하여 乳疽의 전신증상에 대해 설명하였고, ≪瘍科心得集≫[14]에서는 "若其始生硬腫, 卽有頭出, 後復旁生數頭, 頭中有膿不移, 此名乳疽. 是爲陽明痰熱之毒, 兼挾肝膽之火結成. 治當淸理痰氣, 疏通肝邪, 解毒和營."이라 하여 乳疽의 원인, 증상, 치법에 대해 설명하였고, ≪外科證治全書≫[14]에서는 "乳疽, 乳房結腫一塊, 皮色不異, 堅硬木痛, 治法同流注"라 하였고, ≪醫宗金鑑·外科心法要訣≫[16]에서는 "乳疽乳房生, 肝氣鬱結胃火盛. 疽形木硬覺微痛, 疽發月餘始成膿. "이라 하여 乳疽의 원인, 증상들을 언급하기도 했다.

乳疽의 病因病機에 대해서 살펴보면, 裘[6]는 "脇肋部는 足厥陰肝經이 所主하는 곳이며 또한, 乳頭·乳房은 肝·胃二經과 밀접한 관계가 있다. 따라서 乳疽는 乳癰의 傳囊으로 발병할 뿐만 아니라, 肝火의 熾盛 또는 胃熱의 蘊蒸으로 氣血이 凝滯하여 熱毒이 內盛함으로써 化腐成膿하여 발병하는 경우도 있다."고 하였고, 顧[17]는 "肝氣가 鬱結하고 胃熱이 蘊蒸하여 氣血이 凝滯되어 발생한다. 乳癰과 발병원인이 비슷하나, 深部에 발생하는 것을 乳疽라 한다."고 하였다.

治療法에 대해 裘[6]는 "病程에 따라 初起, 成膿, 潰後를 구분해서 적절하게 치법을 강구하는 것이 중요하다. 初起에 形寒發熱에는 疏肝淸熱·軟堅散結을 위주로 하고, 成膿難潰에는 透膿托毒하고, 潰後에 氣血兩虛에는 調氣補血하는 치법들을 위주로 한다"고 하였고, 顧[17]는 "初起에 未潰한 경우에는 疏肝理氣, 和營淸熱하고, 潰後에 氣血兩虛하는 경우에는 培補氣血한다"라고 하였다.

乳疽는 西洋醫學的으로 乳房後位膿腫[6]과 증상상의 유사점이 많은데, 乳房後位膿腫도 일종의 炎症反應이라고 할 수 있다. 炎症(inflammation)은 損傷에 대한 살아있는 조직의 반응으로, 菌의 感染, 熱, 外傷, 抗原抗體反應 등 생체조직의 器質變化를 초래하는 침습에 대한 방어기전이라고 정의하고 있다. 炎症이 발생한 부위는 發赤, 發熱, 疼痛, 腫脹, 機能障礙와 같은 炎症의 5대 징후가 발생되는데, 이러한 炎症을 병리조직학적으로 볼 때는 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라고 할 수 있다[18].

炎症의 증상은 전신증상과 국소증상으로 나뉘는데, 전신증상은 발열, 피로, 식욕감퇴, 쇠약 등이 있고, 국소 증상으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실 등이 있는데, 이와 같은 염증의, 국소적 증상의 발현기전은 혈류 및 혈관크기의 변동, 혈관투과성의 변화, 백혈구침윤에 기인한다[19,20].

염증 반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이는 생체 내 유리되는 공통적인 물질이 존재하기 때문인데, 이런 매개체로서는 활성산소, 산화질소(NO), 프로스타글란딘(PG), 여러 cytokines 등이 있다[19].

본 실험에 쓰인 cytokines의 작용을 살펴보면 이 실험의 방향성과 炎症에의 적용 가능여부를 볼 수 있다.

Cytokines은 면역세포 분화에서부터 면역반응의 여러 단계에 다양하게 반응하며 면역반응을 조절하며 자연면역과 특이면역의 대부분에서 중요한 기능을 한다. 면역반응에 관여하는 림프계 세포, 염증세포, 그리고 이외 조혈계 세포들은 서로 다른 기능을 가진 세포들이 직접 접촉을 하거나 또는 이 세포들이 분비하는 단백에 의하여 자극을 전달하여 효율적인 기능을 하게 되는데 이들 세포들이 분비하는 분자량이 작은 단백을 cytokine이라 하며, cytokine들은 대부분 단핵 식세포들이 분비하며 이들이 분비하는 cytokine을 monokine이라 부르며 특이면역에 관여하는 cytokine들은 대부분 T림프구들이 분비하므로 이들이 분비하는 cytokine은 lympokine이라 부른다. Lympokine들은 다른 세포들의 상호작용을 조절하는 기능을 가진 단백으로 interlukin(이하 IL)으로도 불린다[21]. ILs는 백혈구 전령으로써 주로 작용하는 cytokines이다. IL-1은 염증 반응에서 중요한 매체체이며 다향성 생물학적 활성을 가지고 있다. 또한 적은양에서 CD4cell, β-cell을 활성화하고, 염증 세포를 자극할 수 있다. IL-6은 다향성 면역조혈 효과를 가지고 있으며 간세포에 작용하여 β-cell의 성장을 촉진하며, T-cell이나 thymocytes에 co-stimulator로 작용이 가능하다[22-24].

TNF-α는 대식세포와 비만세포 등에서 분비하며 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[21]. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokines중 IL-6 및 TNF-α는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokines으로 융모막염에서의 IL-6 및 TNF-α가 증가되거나[25], pro-inflammatoy cytokine중 IL-6 및 TNF-α의 초기급성염증시 증가 하거나[26], TNF-α는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하거나[27], 여성의 감염시 pro-cytokines의 증가[28]등에 다양한 보고가 있어 염증과 면역반응에 있어서 IL-6 및 TNF-α의 조절이 중요하다고 할 수 있다.

LPS(lipopolysaccaride)는 면역조절물질, 염증 유발 물질로써 세포 파괴 물질을 생산 자극한다. 그람 음성 세균의 세포표면을 구성하는 물질로 병원성 세균과 진핵생물간의 상호작용에 다양한 역할을 한다. LPS의 또 다른 역할은 기주에서 유래한 독성물질이 세균내부로 들어오는 것을 차단함으로써 세균 자신의 생명을 지키는 것이며 세포 방어 시스템을 활성화 시키는 것이다[24].

COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. 이중 I형인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류 조절, 혈소판 응집 등 우리 몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반

면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 그러므로 본 실험에서는 COX-2유전자 발현에 미치는 영향이 유효성이 있다[22-24]. 이러한 cytokines들은 쥐에 투여된 약물이 抗炎作用이 있는지 여부를 판단하는데 有效하다.

본 실험에서는 加減仙方活命飮의 추출물에 항염증 작용이 있는지를 확인하기 위해 細胞毒性에 미치는 영향, RAW264.7 cell line(대식세포주)에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II 등의 유전자 발현에 미치는 영향, 세포내 nitric oxide(NO), reactive oxygen species(ROS) 생성량에 미치는 영향과 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 생성량에 미치는 영향, LPS로 유도된 lethal endotoxemia(치사의 내독소 혈증)에 대한 생명 연장 효과 등을 실험 평가하였다.

mLFCs에 대한 세포독성 평가에서 KSBH는 200, 100, 50, 10, 1㎍/㎖ 농도에서 대조군(100%)에 비해 각각 92.6 ± 1.8, 94.6 ± 2.8, 97.6 ± 5.5, 102.5 ± 3.8, 99.6 ± 4.6%로 세포독성이 없는 것으로 나타났다(Table 1, Fig. 1).

RAW264.7 cell line에서의 정량적 중합효소 연쇄반응에서는 RAW264.7 세포주에서 mRNA를 분리하여 real-time PCR로 분석하였다. 각각의 실험군 모두 G3PDH, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, 그리고 NOS-II의 primer design이 정확히 이루어진 상태를 보여주었다(Fig. 2).

IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향에서는 RAW264.7 세포주에서 IL-1β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.125, 대조군이 1.00로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군에서는 각각 0.362, 0.458, 0.875로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 3).

IL-6 유전자 발현에 미치는 영향에서는 RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.121, 대조군이 1.00로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.345, 0.684, 0.889로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 4).

TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향은 RAW264.7 세포주에서 TNF-α 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.041, 대조군이 1.00로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군에서는 각각 0.458, 0.874, 0.957로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

COX-2 유전자 발현에 미치는 영향은 RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군 값이 0.242, 대조군이 1.00로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.345, 0.658, 0.786으로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 6).

NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향은 RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현의 RQ 값, 정상군이 0.048, 대조군이 1.00로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.522, 0.745, 0.798로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 7).

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내 炎症과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성, 혹은 만성 炎症 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO는 혈관에서 강력한 혈관 확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관 내피세포에 부착하는 것을 막는 역할을 한다[29].

NOS는 Ⅰ형과 Ⅱ형, Ⅲ형의 3종류가 있으며, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 Ⅰ형이나 Ⅲ형과 달리 Ⅱ형은 inducible NOS(iNOS)로 cytikine이나 세균 등에서 분비되는 LPS나 calcium ionophore에 의해 일부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion(O^-)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite($ONOO^-$)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제시키는 것이 중요하다[18,23].

이에 본 연구에서는 加減仙方活命飮의 추출물이 nitric oxide(NO) 생성량 및 NOS-Ⅱ에 미치는 영향에 대해 살펴본 결과 RAW264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군의 OD값이 0.054 ± 0.012nm, 대조군이 1.458 ± 0.236nm으로 나타났으며, KSBH 100, 50, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.636 ± 0.225, 0.725 ± 0.175, 0.986 ± 0.245로 나타나 대조군에 비하여 100, 50㎍/㎖ 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다(Fig. 8).

인체 내에서는 일생을 통하여 끊임없이 반응력이 큰 reactive oxygen species (이하 ROS)와 reactive nitrogen species (이하 RNS)가 불가피하게 생성되고 이들은 세포내의 DNA나 기타 핵산 등과 반응하여 산화적 손상 및 변이를 유발한다[30]. 활성화된 대식세포는 많은 양의 산소 라디칼을 생성하게 되는데 이는 내피세포의 허혈과 재관류 동안에 중성구의 활성화 기간에 보이기도 한다. 세포막 NOS와 NO의 활성화는 hydroxyl radical을 생성하고 ROS를 발생시키며 증가된 Ca^{2+}로 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical들의 생성 증가을 초래하고 free radical들은 DNA 손상 외에도 지질과산화(lipid peroxidation)에 의해 세포막을 손상시켜 세포사에 이르게 한다. 또한 모세혈관이나 blood-brain barrier의 cytokines의 투과성을 높이게 되어 염증과 산화적 스트레스로 인한 ROS와 유관하며 또한 NO와도 밀접한 관계가 있다[31].

그러므로 加減仙方活命飮 추출물이 ROS 생성량에 미치는 영향을 평가하는 것이 항염작용을 판단하는데 유효하다. 평가 결과 세포내 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, KSBH 투여군(100㎍/㎖ C, 50㎍/㎖ D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 9).

LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청내 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.3 ± 0.7ng/㎖, 대조군은 57.4 ± 5.2ng/㎖로 나타난 반면, KSBH 투여군에서는 32.1 ± 5.5ng/㎖로 나타나 대조군

에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 10).

LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 3.7 ± 1.4ng/㎖, 대조군은 326.4 ± 27.41ng/㎖로 나타난 반면, KSBH 투여군에서는 247.3 ± 21.3ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 11).

LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내 TNF-a 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.1 ± 0.6ng/㎖, 대조군은 77.8 ± 4.7g/㎖로 나타난 반면, KSBH 투여군에서는 64.5 ± 4.3ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 12).

LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 생명연장 효과를 살펴보기 위해서, 생쥐의 복강에 LPS(3mg/kg)를 주사하여 5일간 생명연장을 관찰한 결과, 대조군에 비하여, KSBH 투여군은 LPS 투여 3일째부터 대조군에 비하여 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 13).

이상의 실험 결과를 종합하면 加減仙方活命飮은 炎症 유발 cytokines의 유전자 발현을 억제하였고, NO와 ROS의 생성을 억제하였다. 그리고 LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 억제하였으며, LPS로 유도된 염증 생쥐 모델에서 lethal endotoxemia(치사의 내독성혈증)에 대한 생명 연장 효과를 보이는 등 抗炎症 效果가 인정되므로, 乳疽와 같은 婦人科 乳房疾患에 유용하게 활용될 수 있으리라고 思料된다.

V. 結 論

加減仙方活命飮의 抗炎作用의 효과를 평가하기 위해 細胞毒性에 미치는 영향, RAW264.7 세포주에서의 정량적 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 염증 관련 cystokines인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 NOS-Ⅱ의 유전자 발현에 미치는 영향, NO, ROS 생성량에 미치는 영향, LPS로 유도된 연증 생쥐 모델의 혈청 내 cystokines 변화에 미치는 영향 및 생명 연장 효과 등을 실험평가한 결과는 다음과 같다.

1. 加減仙方活命飮은 mLFCs에 대한 세포독성 평가에서 독성이 나타나지 않았다.
2. 加減仙方活命飮은 RAW264.7 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및NOS-Ⅱ 의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.
3. 加減仙方活命飮은 100, 50㎍/㎖ 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다.
4. 加減仙方活命飮은 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다.
5. 加減仙方活命飮은 LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
6. 加減仙方活命飮은 LPS 투여 후 3일째부터 대조군에 비하여 생쥐의 생존율을 증가시켰다.

□ 투 고 일 : 2007년 01월 24일
□ 심 사 일 : 2007년 02월 01일
□ 심사완료일 : 2007년 02월 06일

參考文獻

1. 陳自明. 婦人良方校注補遺. 上海:上海科學技術出版社. 1991:637.
2. 蔡炳允. 癰疽에 응용되는 仙方活命飮의 消炎, 鎭痛, 下熱작용에 관한 연구. 경희대논문집. 1980:3:67-90.
3. 崔仁和, 蔡炳允. 仙方活命飮의 항암 및 면역반응에 관한 실험적 연구. 경희대논문집. 1992:15:341-359.
4. 顧乃强. 實用中醫乳房病學. 上海:上海科學技術出版社. 1997:160-164.
5. 丁光迪. 諸病源候論校注 下. 北京:人民衛生出版社. 1996:1171.
6. 裵鍾局. 한방유방학. 서울:도서출판 정담. 2005:192. 193.
7. 白成俊. 乳癰에 活用되는 加味消毒飮의 消炎 鎭痛 作用에 대한 硏究. 大田大學校大學院. 1996.
8. 朴美淳. 乳癰에 活用되는 內消散의 鎭痛 消炎作用에 대한 硏究. 大田大學校大學院. 1996.
9. 姜東煥. 妬乳에 活用되는 加味連翹湯이 消炎, 鎭痛 및 抗菌作用에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 1992.
10. 金芝惠. 加味復元通氣散의 抗炎作用에 대한 實驗的 硏究. 大田大學校大學院. 2006.
11. 金相珍. 加減透膿散의 抗炎作用에 대한 實驗的 硏究. 大田大學校大學院. 2006.
12. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:686, 1416.
13. 李梴. 醫學入門. 서울:대성문화사. 1990:100, 1841, 1842.
14. 胡曉峰. 中醫外科傷科名著集成. 北京:華夏出版社. 1997:304, 200, 560, 819, 954.
15. 陳士鐸. 外科秘錄. 서울:醫聖堂. 1993:86.
16. 吳謙. 醫宗金鑒. 北京:人民衛生出版社. 1998:228.
17. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:133-134.
18. 박광균. 口腔生化學. 서울:군자출판사. 1999:318-325.
19. 大韓病理學會. 病理學 Ⅱ. 서울:高文社. 1995:71-104, 112-120, 540-542.
20. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울:고려의학.1999:62-94.
21. 오현호 역. 면역학입문. 서울:지구 문화사. 1995:118-128.
22. Muller-Decker K. Cyclooxygenases in the skin. J Dtsch Dermatol Ges..2004:2(8): 668-675.
23. 문태철 외. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998:42: 214-219.
24. 노민수 외. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998:42:558-566.
25. Henrik Dollner. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-cytikines and cytokine inhibitors. An international Jounal of Obstetrics and Gynaecology. 2002:109:534-539.
26. Matthias Winkler. Role of cytokines and other inflammatory mediators. An international Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2003:110:118-123.
27. 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 Jounal of Obstetrics and Gynaecology. 2002;187(4):894-897.

28. Charles N. Landen et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervial endometrial and ovarian malignancies. American Jounal of Obstetrics and Gynaecology. 2003;188(5):1174-1176.
29. 지병철 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. 대한산부회지. 2002;45(5):766-773.
30. 김영태 외. 한국 여성 자궁경부 종양에서의 항산화체계 및 산화적 스트레스. 대한산부인과학회지. 2002;45(1):145-152.
31. 임소영. Nitric Oxide Synthase의 억제가 전외허혈 재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999;36:710-722.