

側柏樗皮丸의 抗炎 및 免疫反應에 대한 實驗的 研究

원광대학교 한의과대학 부인과교실

조옥현, 최창민

ABSTRACT

Anti-inflammatory Effect of *Cheukbaekjurpihwan*(*CBJPH*)

Ok-Hyun Jo, Chang-Min Choi

Dept. of Oriental Obstetrics and Gynecology, College of Oriental Medicine,
Wonkwang University

Purpose: It is the purpose of this study to investigate the anti-inflammatory effects and mechanism of *cheukbaekjurpihwan*(*CBJPH*) extract on LPS (lipopolysaccharide)-induced inflammatory mediators in murine peritoneal macrophages.

Methods: To evaluate anti-inflammatory effects of *CBJPH* extract, the production of cytokines(TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL(interleukin)-6, IL-12) and NO(nitric oxide) was measured in vitro and in vivo. And western blot analysis has been done to look into the mechanism.

Results: *CBJPH* extract reduced LPS-induced NO, TNF- α and IL-6, IL-12 productions in peritoneal macrophages. *CBJPH* extract inhibited the activation of JNK(c-Jun N-terminal kinase), but didn't inhibit the activation of MAPKs (mitogen-activated protein kinases) such as p38, ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase1/2) and the degradation of I κ B- α (inhibitory kappa B- α) in the LPS-stimulated peritoneal macrophages. *CBJPH* extract suppressed LPS-induced endotoxin shock and the productions of TNF- α , but not of IL-6, after an oral administration of *CBJPH* extract

Conclusion: *CBJPH* extract suppressed the productions of LPS-induced NO and cytokines by preventing JNK from phosphorylation, which may provide a clinical basis for anti-inflammatory properties of *CBJPH*.

Key Words: *cheukbaekjurpihwan*(*CBJPH*), herbal medicine, LPS, cytokine, inflammation, endotoxin shock

"이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨."

"This reserch was supported by Wonkwang University in 2006"

I. 서 론

帶下는 질염, 자궁경관염, 골반염증성 질환 등 여성생식내강의 염증으로 인해 생기는 출혈 이외의 이상 질 분비를 의미하며, 대개 정상 분비물보다 양이 많거나 소양감, 부종, 통증, 악취를 동반하기도 한다¹⁻³⁾. 帶下는 부인과적 질환에서 흔한 증상 중 하나이지만 적절한 처치가 뒤따르지 않을 경우 만성 골반염 및 불임, 자궁외임신, 조기양막파수 등의 후유증을 유발⁴⁾할 수 있기 때문에 적절한 진단과 치료를 통하여 부작용이나 합병증을 최소화시켜야한다.

側柏樗皮丸은 《丹溪心法》⁵⁾에 처음 언급되고, 側柏樗皮丸이라는 이름으로 《醫學入門·卷七》⁶⁾에 기재된 처방으로 “治白帶 因七情所傷而脈數者”라 하여 七情이나 肝氣鬱結로 발생하는 白帶下 치료에 사용되었다.

실험적 연구를 통해 側柏樗皮丸 煎湯液의 항균력은 입증되었으나⁷⁾, 세균이나 바이러스 등이 염증을 일으켰을 때 염증을 억제하는 기전에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

따라서 본 실험에서는 여성 생식기계 염증질환인 帶下의 치료에 사용된 側柏樗皮丸 추출물이 염증반응에 미치는 영향을 알아보고자 대식세포를 LPS (lipopolysaccharide)로 자극했을때, 側柏樗皮丸 추출물이 염증매개물질인 NO(nitric oxide)와 inflammatory cytokine(TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL(interleukin)-6, IL-12)의 생산을 억제하는지 여부와, MAPK (mitogen-activated protein kinase) family인 ERK(extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase),

p38의 활성화 정도나 I κ B- α (inhibitory kappa B- α)의 분해 정도를 측정함으로써 염증을 억제하는 기전을 알아보고, endotoxin shock을 억제할 수 있는지 연구한 결과 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 동 물

C57BL/6 6주령 mouse 암컷을 (주)오리엔트바이오(S. Korea 성남 경기도)에서 구입하여 사용하였다.

2) 약 재

실험에 사용한 側柏樗皮丸은 음니허브(경북 영천)에서 구입한 후 원광대학교 본초학교실에서 정선하여 사용하였으며, 처방의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The prescription of cheukbaekjurpihwan(CBJPH)

韓藥名	生藥名	藥材量 (g)
樗 皮	<i>Cortex Ailanthi</i>	75
側柏葉	<i>Folium et Ramulus Biotae</i>	18.75
黃 柏	<i>Cortex Phellodendri</i>	18.75
黃 連	<i>Rhizoma Coptidis</i>	18.75
香附子	<i>Rhizoma Cyperi</i>	37.5
白 朮	<i>Rhizoma Atractylodis Macrocephalae</i>	37.5
白芍藥	<i>Radix Paeoniae Lactiflorae</i>	37.5
白 芷	<i>Radix Angelicae Dahuricae</i>	11.25
總量		255

3) 시 약

Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양

용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서, 배양조는 Corning(Rochester, USA)사에서 구입하였다. 사용된 시약 중 chloroform, HEPES, sodium dodesyl sulfate(SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS(Serotype: 055: B5), Tris-HCl 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, anti-phospho-ERK1/2 Ab, anti-phospho-p38 Ab, anti-phospho-JNK Ab, anti-I κ B- α Ab, anti-ERK1/2 Ab, anti-p38 Ab, anti-JNK Ab는 Cell Signaling(Denvers, USA)사에서 구입하였다. ERK1/2, p38, JNK, β -actin은 Santa Cruze Bio Technology(USA)에서 구입하였다. ELISA에 사용한 Anti-mouse TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 antibodies, 재조합 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료의 제조

側柏樗皮丸(Table 1) 255g을 1ℓ의 3차 증류수로 2시간 30분 동안 전탕한 후 동결건조시켜서 용매를 제거하고 그 얻어진 분말 15g을 생리식염수로 녹여서 0.2 μ m syringe filter로 3회 여과한 후 사용하였다.

2) 복강 대식 세포의 배양

실험 3~4일 전에 염증물질(thiogluccolate 2.5ml)를 mouse의 복강내에 주사하고, 10% FBS가 함유된 7ml의 RPMI-1640를 복강내에 주사하여 잘 혼든 다음, 복강액을 뽑아내 원심분리한 후 cell을 counting해서 1 \times 10⁶cells/ml로 6cm dish에 분주하여 대식세포가 바닥에 부착되도록

5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 3시간 배양하고, 상등액을 버린 후에 dish에 부착한 세포를 실험에 사용하였다.

3) MTT 분석

대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법⁸⁾으로 측정하였다. 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640 배지에서 1 \times 10⁶cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 0.1, 0.3, 0.5 및 1.0mg/ml 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간동안 배양한 뒤 1mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT 용액을 첨가하고 다시 2시간동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n, n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가하여 용해한다음, 24시간동안 배양하였다. Formazan의 양은 540nm에 흡수되는 양을 측정하였다.

4) NO 농도의 측정⁹⁾

그리스 시약(Griess reagent: 0.5%의 sulfanilamide, 2.5%의 인산 및 0.5%의 naphthylethyleneamine)은 nitrite과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하는데 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 nitrite의 농도를 측정하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 sample 1내지 5의 각각에 100 μ l씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. Sample의 흡광도는 spectrophotometer(MD, U.S.A)로 540nm에서 측정하였다. NO의 농도는 nitrite의 표준커브로부터 계산하였다.

5) TNF- α , IL-6, IL-12의 측정¹⁰⁾

대식세포에 側柏樗皮丸 추출물을 0.05, 0.1 및 0.3mg/ml의 농도로 30분동안 전처리하고 LPS(500ng/ml)로 자극하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증 매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해 LPS로 자극한 후 24시간뒤에 이들 염증 매개물질을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다.

6) RT-PCR(Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR이란 Seeburg PH(1986)에 의해 RNA를 찾고 분석하는데 도입된 방법으로 mRNA로부터 역전사 과정을 통해 얻어진 cDNA를 PCR로 증폭하는 방법이다. Tri-zol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. PCR 반응이 끝난 후 sampling buffer(1x)를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10 μ l씩 넣고 전기영동한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

사용한 primer는 다음과 같다.

iNOS (306bp): TGG GAA TGG AGA CTG TCC CAG (forward)

GGG ATC TGA ATG TGA TGT TTG (reverse)

TNF- α (276bp): ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC (forward)

TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT (reverse)

IL-6 (463bp): CAT CCA GTT GCC TTC TTG GGA (forward)

CAT TGG GAA ATT GGG GTA GGA AG (reverse)

IL-12 (110bp): AGG CGA GAC TCT GAG CCA C (forward)

CTT CAC ACT TCA GGA AAG

TCT (reverse)

β -actin (514bp): TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G (forward)

TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C (reverse)

7) Western blot analysis¹¹⁾

대식세포를 60mm culture dish에 1 \times 10⁶cells/ml로 배양하고 serum free media (RPMI-1640)로 12시간 starvation 시킨 후, 側柏樗皮丸 추출물(0.3mg/ml)로 전처리하고 30분 후에 LPS(500ng/ml)로 자극한 다음 cold PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척하였다. 시간 별(0, 15, 30, 60mins)로 cell을 수확한 뒤 원심분리(5000rpm, 5mins)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. Lysis buffer(lysis buffer 1ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + protease inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 용해시키고, 원심분리(15000rpm, 20mins)한 후 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질에 sampling buffer(4x)를 같이 넣어 섞은 다음, 그 sample을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 membrane에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 동안 blocking하였다. ERK, p38, JNK의 인산화와 I κ B- α 를 ECL detection 용액(Amersham)으로 확인하였다.

8) Endotoxin shock 동물실험

Endotoxin shock은 mouse에 LPS (from *E. coli* serotype O55:B5, 50mg/kg)를 복강내 주사하여 유발하였다. 먼저 mouse를 10마리씩 3개의 그룹으로 나누고 매일 첫 번째 그룹은 생리 식염수를, 두 번째 그룹은 側柏樗皮丸 추출물 100mg/kg을, 세 번째 그룹은 側柏樗皮丸 추출물 500mg/kg을 매일 1회 일주

일 동안 경구투여하고 일주일째 경구투여 3시간 후 복강에 LPS(50mg/kg)를 주사하여 mouse의 생존율을 12시간 단위로 72시간 동안 관찰하였다.

9) in vivo 실험모델

側柏樗皮丸 추출물을 mouse 한 그룹에 5마리씩으로 마리당 100mg/kg과 500mg/kg 두 가지 농도로 존대를 이용하여 매일 1회 경구투여한 뒤, 일주일 후에 치사량의 LPS(50mg/kg)를 복강에 주사하였다. 2시간 후에 mouse를 마취하여 심장에서 혈액 1ml를 syringe로 뽑아낸 후 2000rpm으로 4℃에서 20분간 원심분리하고 상층액 serum만 분리하였다. 분리한 serum에서 ELISA법으로 TNF- α , IL-6를 정량하였다.

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 student's t-test에 준하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 側柏樗皮丸 추출물의 대식세포에 대한 독성

Mouse의 대식세포에 側柏樗皮丸 추출물을 농도별(0.1, 0.3, 0.5, 1mg/ml)로 처리하고 24시간 후에 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 側柏樗皮丸 추출물은 0.1mg/ml, 0.3mg/ml의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). (IC_{50} =0.887 mg/ml)

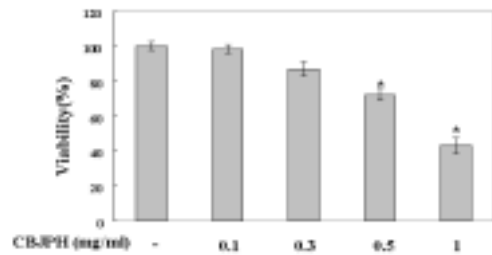


Fig. 1. The effect of *CBJPH* on cytotoxicity in peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages were incubated for 24hrs in the presence or absence of *CBJPH* at indicated dose. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. (* $P < 0.05$: significant as compared to control)

2. 側柏樗皮丸 추출물의 NO 생성 억제 효과

대식세포에 아무 처리도 하지 않은 정상군, LPS로만 자극한 대조군 및 側柏樗皮丸 추출물을 다양한 농도로 30분 전처리 후 LPS로 자극한 실험군을 ELISA 방법으로 측정하였다. 실험군은 세포독성 실험결과를 바탕으로 側柏樗皮丸 추출물이 세포독성을 나타내지 않는 범위 내 농도(0.05, 0.1, 0.3mg/ml)로 전처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후, 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정한 결과, 정상군에서는 $0.823 \pm 0.194 \mu\text{M}$, 대조군은 $38.844 \pm 1.658 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 대식세포에 側柏樗皮丸 추출물을 0.05, 0.1, 0.3mg/ml의 농도로 전처리한 실험군은 각각 $14.382 \pm 0.521 \mu\text{M}$, $8.404 \pm 1.2 \mu\text{M}$, $4 \pm 0.838 \mu\text{M}$ 로 나타나 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 2A), RT-PCR 방법으로 조사한 결과, mRNA 수준에서 iNOS의 생성을 억제하였다(Fig. 2B).

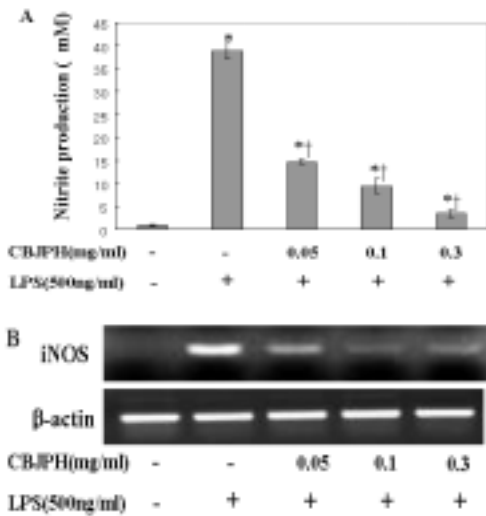


Fig. 2. (A) The inhibitory effect of *CBJPH* on LPS-induced NO production in peritoneal macrophages. Cells were pretreated with or without *CBJPH* extract at indicated concentration for 30mins, and then incubated with or without 500ng/ml LPS for 24hrs. The production of NO was measured by the method of Griess. (B) Inhibition of LPS-stimulated iNOS mRNA expression by RT-PCR. The levels of iNOS mRNA were monitored 24hrs after treatment of cells with LPS(500ng/ml) with or without *CBJPH* pretreatment. Data represent the mean \pm SEM with three separate experiments. (* $P < 0.05$: significant as compared to control, $^{\dagger} P < 0.05$: significant as compared to LPS alone.)

3. 側柏樗皮丸 추출물의 TNF- α 생성 억제 효과

TNF- α 의 생성을 측정한 결과, 정상군에서는 $0.171 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$, 대조군에서는 $1.516 \pm 0.08 \text{ ng/ml}$ 로 나타났다. 대식세포에 側柏樗皮丸 추출물을 0.05, 0.1, 0.3mg/ml의 농도로 전처리한 실험군은 각각 $1.803 \pm 0.048 \text{ ng/ml}$, $0.617 \pm 0.034 \text{ ng/ml}$, $0.363 \pm 0.029 \text{ ng/ml}$ 로 나타나 0.05mg/ml의 농도를 제외하고 TNF- α 의 생성을 억제하였으며(Fig. 3A), mRNA 수준에

서도 TNF- α 의 생성을 억제하였다(Fig. 3B).

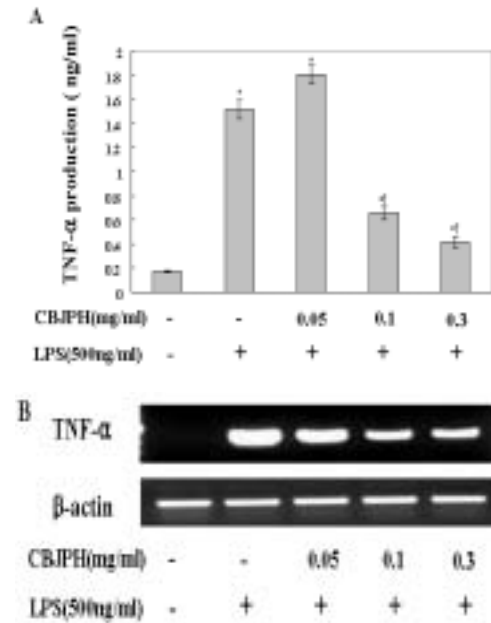


Fig. 3. (A) The inhibitory effect of *CBJPH* on LPS-induced TNF- α production in peritoneal macrophages. Cells were pretreated with or without *CBJPH* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated with LPS (500ng/ml) for 24hrs. TNF- α production was measured by ELISA. (B) Inhibition of LPS-stimulated TNF- α mRNA expression by RT-PCR. The levels of TNF- α mRNA were monitored 24hrs after treatment of cells with LPS (500ng/ml) with or without *CBJPH* pretreatment. Data represent the mean \pm SEM with three separate experiments. (* $P < 0.05$: significant as compared to control, $^{\dagger} P < 0.05$: significant as compared to LPS alone.)

4. 側柏樗皮丸 추출물의 IL-6 생성 억제 효과

IL-6의 생성을 측정한 결과, 정상군에서는 $0.057 \pm 0.005 \text{ ng/ml}$, 대조군에서는 $6.557 \pm 0.147 \text{ ng/ml}$ 로 나타났다. 대식세포에 側柏樗皮丸 추출물을 0.05, 0.1, 0.3mg/ml 농도

로 전처리한 실험군에서는 각각 $7.726 \pm 1.058 \text{ ng/ml}$, $4.558 \pm 0.31 \text{ ng/ml}$, $1.215 \pm 0.035 \text{ ng/ml}$ 로 나타나 0.05 mg/ml 의 농도를 제외하고는 IL-6의 생성을 억제하였으며(Fig. 4A), mRNA 수준에서도 IL-6의 생성을 억제하였다(Fig. 4B).

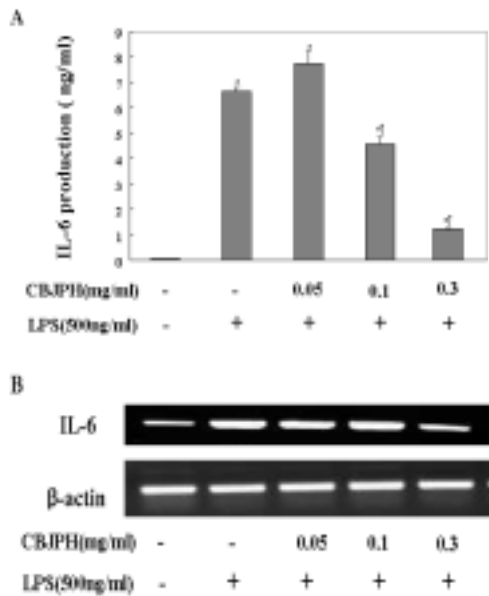


Fig. 4. (A) The inhibitory effect of *CBJPH* on LPS-induced IL-6 production in peritoneal macrophages. Cells were pretreated with or without *CBJPH* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated with LPS (500ng/ml) for 24hrs. IL-6 production was measured by ELISA. (B) Inhibition of LPS-stimulated IL-6 mRNA expression by RT-PCR. The levels of IL-6 mRNA were monitored 24hrs after treatment of cells with LPS(500ng/ml) with or without *CBJPH* pretreatment. Data represent the mean \pm SEM with three separate experiments. (* $P < 0.05$: significant as compared to control, † $P < 0.05$: significant as compared to LPS alone.)

5. 側柏樗皮丸 추출물의 IL-12 생성 억제 효과

IL-12의 생성을 측정된 결과, 정상군에서는 $0.035 \pm 0.001 \text{ ng/ml}$, 대조군에서는 $22.994 \pm 2.662 \text{ ng/ml}$ 로 나타났다. 대식세포에 側柏樗皮丸 추출물을 0.05 , 0.1 , 0.3 mg/ml 의 농도로 전처리한 실험군은 각각 $17.56 \pm 1.5 \text{ ng/ml}$, $16.23 \pm 2.13 \text{ ng/ml}$, $4.11 \pm 0.617 \text{ ng/ml}$ 로 나타나 IL-12의 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 5A), mRNA 수준에서 IL-12의 생성을 억제하였다(Fig. 5B).

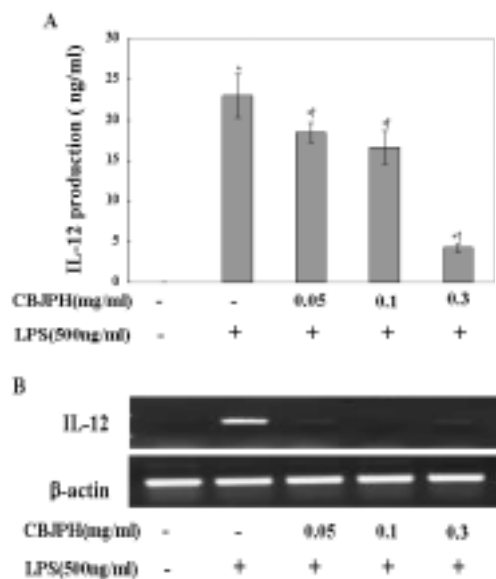


Fig. 5. (A) The inhibitory effect of *CBJPH* on LPS-induced IL-12 production in peritoneal macrophages. Cells were pretreated with or without *CBJPH* extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated with LPS(500ng/ml) for 24hrs. IL-12 production was measured by ELISA. (B) Inhibition of LPS-stimulated IL-12 mRNA expression by RT-PCR. The levels of IL-12 mRNA were monitored 24hrs after treatment of cells with LPS(500ng/ml) with or without *CBJPH* pretreatment. Data represent the mean \pm SEM with three separate experiments. (* $P < 0.05$: significant as compared to control, † $P < 0.05$: significant as compared to LPS alone.)

6. 側柏樗皮丸추출물의 LPS로 유도된 NF-κB 및 MAPK 활성억제효과

側柏樗皮丸 추출물이 TNF-α, IL-6, IL-12의 생성을 억제하는 기전을 알아보기 위하여, NF-κB 및 MAPK인 ERK1/2, p38, JNK1/2의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 대식세포에 側柏樗皮丸 추출물 0.3mg/ml 농도로 전처리하고 LPS로 자극한 후, IκB-α 및 ERK1/2, p38, JNK1/2의 분해 정도를 확인하였다. 側柏樗皮丸 추출물은 IκB-α의 분해를 억제하지 못하여 NF-κB의 활성을 억제하지 못하였다. MAPK에서는 p38과 ERK1/2의 인산화를 억제하지 못하였으나, JNK1/2 인산화를 억제하였다(Fig. 6).

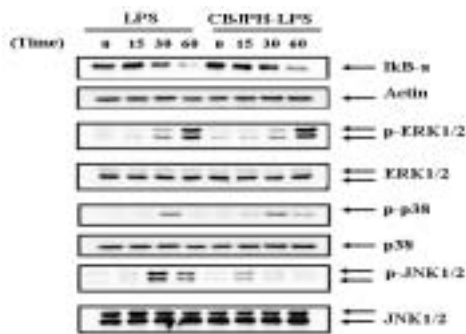


Fig. 6. Effects of CBJPH on the expression of IκB-α degradation and MAPK activity in LPS-stimulated peritoneal macrophages.

Cells were pretreated with or without CBJPH extract at indicated concentrations for 30mins, and then incubated with 500ng/ml LPS for indicated time. Detail methods were described in the materials and methods.

7. 側柏樗皮丸 추출물이 mouse의 생존율에 미치는 영향

LPS(50mg/kg)만을 복강내에 주사한 대조군(n=10)과 側柏樗皮丸 추출물을

100mg/kg, 500mg/kg의 농도로 매일 1회 일주일간 경구투여한 후 LPS(50mg/kg)를 복강내에 주사한 실험군(n=10 per group)의 생존율을 관찰하였다. 24시간 후 대조군의 생존율은 0%, 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg, 500mg/kg의 농도로 투여한 실험군의 생존율은 각각 80%, 100%를 보였다. 36시간 후 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg, 500mg/kg의 농도로 투여한 실험군의 생존율은 각각 40%, 20%를 보였다. 48시간 후 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg, 500mg/kg의 농도로 투여한 실험군의 생존율은 각각 20%, 0%를 보였다(Fig. 7). 側柏樗皮丸 추출물을 500mg/kg 투여한 실험군에서는 생존이 약간 연장되긴 하였으나 LPS로 인한 endotoxin shock를 억제하지 못하였고, 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg 투여한 실험군에서는 endotoxin shock를 약간 억제하였다.

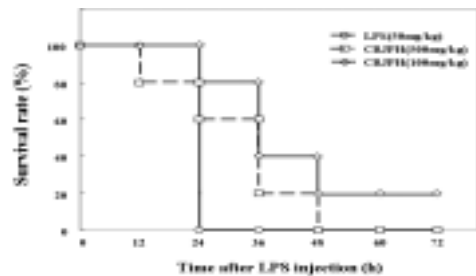


Fig. 7. The effect of CBJPH on LPS-induced endotoxin shock in vivo. Age-matched mice(n=10 per group) were injected by i.p. with *E. coli*-derived LPS(50mg per kg body weight), and survival was monitored for 72hrs. Similar results were obtained in two additional independent experiments with LPS challenges of 50mg/kg.

8. 側柏樗皮丸 추출물이 혈청 내 TNF-α, IL-6 생성에 미치는 영향

대식세포에 아무 처리도 하지 않은 정상군, LPS(50mg/kg)로만 자극한 대조군 및 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg, 500mg/kg의 농도로 매일 1회 일주일간 경구투여한 후 LPS(50mg/kg)를 복강내에 주사한 실험군의 혈청에서 TNF- α , IL-6를 측정하였다. TNF- α 의 경우 정상군은 0.044 \pm 0.002ng/ml, 대조군은 1.992 \pm 0.084ng/ml로 나타났다. 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg, 500mg/kg의 농도로 경구투여한 실험군은 각각 0.754 \pm 0.069ng/ml, 0.81 \pm 0.072ng/ml로 나타나 側柏樗皮丸 추출물이 in vivo에서 LPS로 유도된 TNF- α 의 생성을 억제하였다. IL-6의 경우 정상군은 0.074 \pm 0.004ng/ml, 대조군은 32.005 \pm 1.15ng/ml로 나타났다. 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg, 500mg/kg의 농도로 경구투여한 실험군은 각각 26.924 \pm 3.4ng/ml, 43.306 \pm 4.1ng/ml로 나타나 in vivo에서 IL-6의 생성은 고농도에서 더 높게 나타났다(Fig. 8).

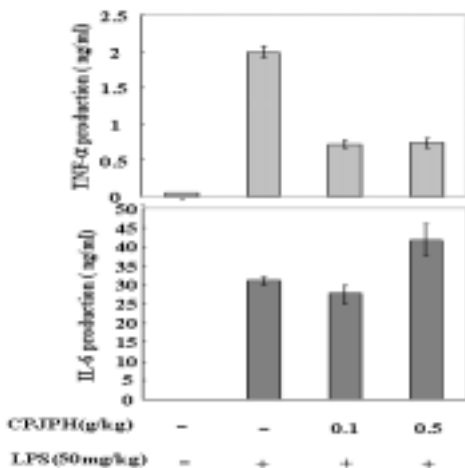


Fig. 8. The effect of CBJPH on LPS-induced TNF- α , IL-6 production in vivo. Age-matched mice(n=5) were injected by

i.p. with *E. coli* - derived LPS(50mg/kg), and blood was collected 2hrs later. Serum concentrations of TNF- α and IL-6 were measured by ELISA.

IV. 고찰

정상 상태의 여성 생식기 점막에는 자체의 분비물이나 내강 상부로부터 나온 분비물이 있으나 질 밖으로는 배출되지 않는다. 그러나 질내를 산성상태로 유지하면서 병균에 저항하는 정상 세균군의 생태가 변화되면, 감염 기회가 증가하여 질염이나 자궁경부염, 난관염, 골반염을 비롯한 생식기계 염증성 질환 및性病 등에 노출되기 쉽다. 이로 인해 소양감, 다량의 질 분비물을 보이는데 이를 帶下症(leukorrhea)이라고 한다¹⁻³⁾.

韓醫學的으로 帶下는 腎氣가 부족하거나 脾의 기능에 장애가 생겼을 때, 任脈이 약해지고 帶脈의 기능이 견고하지 못하여 몸의 水濕이 생식기로 흘러 내려가 體外로 帶下가 많이 흐르게 된다고 본다. 原因은 대개 脾虛, 腎虛, 濕熱, 濕毒으로 보고 脾虛의 경우 健脾益氣, 升陽除濕, 腎陽虛의 경우 溫補腎陽, 固澀止帶, 腎陰虛의 경우 益腎滋陰, 清熱止帶, 濕熱로 인한 경우는 清熱利濕止帶하는 치법을 사용한다¹⁾.

側柏樗皮丸은 《丹溪心法》⁵⁾에서 최초로 “七情損傷이 原因이 되어 脈이 數하고 白帶下가 流出되는 것을 治療한다”고 하였으나 處方名없이 구성 내용만을 수록하였고, 明代 李梴⁶⁾에 이르러 樗根皮를 樗根皮로 바꾸어 사용하면서 側柏樗皮丸이라 이름하였다. 側柏樗皮丸은 樗根白皮, 香附子, 白朮, 白芍藥, 側柏葉, 黃柏, 黃連, 白芷로 구성되어 있으며⁶⁾,

각 구성약물의 效能을 살펴보면 君藥으로 쓰인 栲根白皮는 淸熱燥濕, 收澁止帶, 止瀉止血의 효능으로 赤白帶下, 濕熱瀉痢 등의 병증을 치료한다. 현대 의학적으로는 급·만성 痢疾, 赤白帶下, 膀胱炎, 尿道炎, 트리코모나스 膺炎 등에 응용되고 있다^{12,13}. 香附子는 理氣解鬱, 調經止痛하여 肝鬱氣滯, 乳房脹痛, 月經不調, 經閉痛經의 병증을 치료한다. 주로 자궁수축을 억제하고 鎮痛효과를 나타내며, 항균작용이 있다고 알려져 있다¹²⁻¹⁵. 白朮은 健脾益氣, 燥濕利水하는 효능이 있어 腹脹泄瀉, 水腫 등의 병증을 치료한다. 白朮煎湯液은 황색 포도상구균, 용혈성 연쇄상구균, 녹색 연쇄상구균, 고초균에 대해 항균작용이 있으며, 세포성 면역기능을 촉진시킨다고 알려져 있다^{12,14,15}. 白芍藥은 緩中止痛, 斂陰收汗하여 瀉痢腹痛, 月經不調, 崩漏帶下の 병증을 치료하고, 이질, 장티푸스균, 대장균 등에 항균작용이 있다는 보고가 있다¹²⁻¹⁵. 側柏葉은 涼血止血하여 崩漏下血, 崩中赤白 등의 병증을 치료한다. 출혈과 혈액응고 시간을 단축하고 황색 포도상구균, 백색 포도상구균에 항균작용을 보이고 항박테리아 활성을 지닌다는 보고가 있다¹²⁻¹⁵. 黃柏은 淸熱燥濕, 瀉火解毒하기 때문에 濕熱瀉痢, 심한 赤白帶下, 濕疹搔痒 등의 병증을 치료한다. 황백색 포도상구균에 항균력이 뛰어나고, 외음부의 트리코모나스균에 대한 억제작용도 있지만, 항진균작용은 비교적 약하다¹²⁻¹⁵. 黃連은 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능으로 瀉痢, 濕疹, 婦人陰中疼痛 등의 증상을 치료한다. 광범위한 균주에 대한 항균작용이 있어 장내 세균 및 이질균에 강한 억제작용이 있으며 용혈성 연쇄상

구균과 황색 포도상구균, 外陰의 트리코모나스균에 대해서도 비교적 강한 항균작용이 있다¹²⁻¹⁵. 白芷는 散風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿하므로 赤白帶下, 瘡瘍腫毒을 치료하고 대장균, 티푸스균, 콜레라균, 병원성 진균에 대해 어느정도 억제작용을 보인다¹²⁻¹⁵.

본 실험에서는 炎症性 帶下에 활용되어 온 側柏栲皮丸의 항염효과나 그 면역학적 기전을 알아보려고 側柏栲皮丸 추출물이 대식세포에 미치는 영향을 조사하였다.

먼저 側柏栲皮丸 추출물이 대식세포에 대한 독성을 가지고 있는지 알아보기 위하여 MTT 방식으로 조사한 결과 0.5mg/ml, 1mg/ml의 농도에서 세포독성을 나타냈으며 약 0.887mg/ml의 농도에서 IC₅₀ (inhibitory concentration 50)을 나타내고 있었다(Fig. 1). 따라서 세포 독성을 나타내지 않은 0.3mg/ml의 농도 이하에서 재조정하여 0.05, 0.1, 0.3mg/ml의 농도로 이후의 실험을 진행하였다.

LPS는 대장균이나 살모넬라균과 같은 그람음성균의 외부 세포막 구성성분으로, 낮은 농도에서는 면역세포가 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식한 후 활성화되어, 염증반응의 원인이 되는 TNF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15 등의 pro-inflammatory cytokine을 합성하도록 한다. 그러나 고농도의 LPS는 組織傷害, 散在性 血管內 凝集, 그리고 종종 사망의 원인이 되는 septic shock을 유발한다¹⁶⁻¹⁸.

NO는 대식세포에서 생성되어 신경전달, 혈관이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 IFN- γ (interferon-gamma) 또는 IL-1, TNF- α ,

LPS로 자극될 때 inducible NOS(iNOS)가 발현되어 NO를 생성하는데, 과도하게 생성된 경우에는 혈관을 이완시켜 혈압을 하강시키는 등 septic shock의 증상을 유발하게 된다^{16,19-23}).

側柏樗皮丸 추출물이 염증에 미치는 효과를 알아보기 위하여 側柏樗皮丸으로 전처리한 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성과 mRNA 수준에서 iNOS의 생성을 측정 한 결과, 側柏樗皮丸 추출물이 iNOS의 생성을 억제함으로써 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

활성화된 대식세포는 세포성 면역이나 급 · 만성 염증에 관여하는 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12와 같은 pro-inflammatory cytokine를 생산한다^{16,22,23}. TNF- α 는 염증매개 cytokine으로 내독소, 면역복합체, 독소, 물리적 자극 및 여러 염증과정에서 분비되며, 종양 세포만을 죽이는데 관여하는 물질이다. 소량 및 생리적 농도에서는 백혈구와 상피세포의 조절기능을 통해 효율적인 염증반응을 유발시켜 숙주를 보호하지만, 다량 생성되면 secondary cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8 등을 과량 분비함으로써 sepsis의 증상을 나타낸다^{16,22-24}.

IL-6는 TNF- α , IL-1과 함께 급성기 단백반응의 유도체로서 작용하는 cytokine이며, mitogen에 의해 자극된 B-cell의 immunoglobulin의 생성을 증가시키고, hepatocyte에 의한 acute phase protein의 생성을 자극하여 조직이 손상되었을 때 급성기 반응의 유발에도 깊이 관여한다고 한다^{16,25-28}).

IL-12는 활성화된 대식세포에서 분비되는 초기 cytokine으로 세포매개면역에

서 중요한 역할을 담당하는데, 활성화된 T 림프구를 증식시키고 NK(natural killer) 세포나 T 림프구에서 IFN- γ 의 분비를 촉진시키며 Th(T-helper)2형 반응의 대표적인 cytokine인 IL-4의 작용을 억제하여 Th1형 반응을 강화하는데 주로 작용한다^{16,17,26,29}).

이상에서 본 바와 같이 급성기 염증과정에서는 다량의 cytokine이 생성되는데 이러한 cytokines의 생성억제 여부를 알아보기 위해 側柏樗皮丸 추출물을 농도별로 전처리하고 LPS로 TNF- α , IL-6, IL-12 등의 cytokine 생성을 유도하였다. 그 결과, 0.05mg/ml의 농도를 제외하고 TNF- α , IL-6의 생성을 억제하였으며, IL-12의 경우 실험농도 내(0.05~0.3mg/ml)에서 모두 농도 의존적으로 생성을 억제하였다(Fig. 2-5).

대식세포를 LPS로 자극했을 때 cytokine 및 MIP(macrophage infiltrating protein)와 같은 chemokine을 비롯하여 염증반응을 일으키는 prostanoid, leukotriene, NO의 생성을 증가시키는 기전을 보면, LPS가 혈액에 있을 경우 즉각적으로 LBP(lipopolysaccharide binding protein)와 접합하고, CD14와 결합되어 형성된 LPS/LBP/CD14 복합체가 세포 표면에 작용하여 NF- κ B(nuclear factor-kappa B)의 활성화 및 MAPK의 활성화를 일으킨다^{30,31}.

NF- κ B는 세포질에서 I κ B- α 와 결합하여 비활성형으로 존재하다가 자극에 노출되면 활성화되어 target DNA의 특정 부위와 결합하여 전사인자로 작용함으로써, cytokine과 세포 접합 분자 등을 비롯한 활성화 유전자의 발현을 유도한다^{30,32,33}).

MAPK는 serine/threonine kinase로써 세포증식, 분화, 사망 및 종양생성 등의 다양한 생물학적 과정에서, 세포외부의 자극에 대한 신호를 세포내로 전달하는데, LPS에 의하여 활성화되는 MAPK로 ERK1/2, p38, JNK 등이 있고, 각 MAPK는 각기 다른 세포의 자극에 의해 활성화되고, 또한 각각의 기질특이성을 보이며, 상이한 경로를 통해서 활성화된다^{34,35}.

따라서 側柏樗皮丸 추출물이 NO와 cytokine의 생성을 어떤 경로를 통해 억제되는지 알아보기 위해 western blot 방법으로 MAPK 구성요소인 ERK, JNK, p38의 인산화와 I κ B- α 의 분해정도를 조사한 결과 側柏樗皮丸 추출물이 I κ B- α 의 분해와 ERK1/2, p38의 인산화는 억제하지 못했지만, JNK1/2가 인산화되는 것을 억제하였다(Fig. 6). 이러한 결과들로 보아 側柏樗皮丸이 대식세포에서 JNK1/2 인산화 억제를 통하여 pro-inflammatory cytokine의 발현과 NO의 생산을 억제한다고 사료된다.

Endotoxin shock이란 LPS가 혈액을 통해 각 장기에 전달되어 중요 장기들을 shock에 빠지게 함으로서 생명을 잃게 하는 치명적 병리현상 중의 하나이다. 그 기전에 대해 현재까지 알려진 바로는 세포수준에서 보면 세포가 LPS에 의해 공격을 받으면 칼슘의 passive influx가 증가되고 증가된 칼슘에 의해 NO 합성이 활성화되며, 그로 인해 혈압이 하강한다. 면역학적 측면으로는 LPS가 조직 내에 존재하는 대식세포를 활성화시키고, 활성화된 대식세포가 다량의 TNF- α 를 분비하면, secondary cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8 등이 과량으로 분비된다. 이들 물질은 본래 소량

분비되어 인체의 면역체계를 적절하게 자극하고 조절하지만, 지나치게 많은 양이 분비되면 sepsis의 증상을 나타내어 개체를 죽음에 이르게 한다²⁴.

본 실험에서 側柏樗皮丸 추출물이 LPS 투여에 의한 endotoxin shock을 억제하는지 측정한 결과 側柏樗皮丸 추출물을 100mg/kg의 농도로 경구투여한 실험군에서 억제하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

V. 결 론

側柏樗皮丸 추출물의 염증 억제 기전과 endotoxin shock에 대한 효과를 알아보기 위하여 mouse의 복강 대식세포에 側柏樗皮丸 추출물을 전처리하고 LPS로 자극하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 側柏樗皮丸 추출물은 MTT assay를 수행한 결과 0.1mg/ml, 0.3mg/ml의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 側柏樗皮丸 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 NO 및 TNF- α , IL-6, IL-12 등 pro-inflammatory cytokine의 생성을 억제하였다.
3. 側柏樗皮丸 추출물은 JNK1/2의 인산화를 억제하였으나, 다른 MAPK(ERK, p38)나 I κ B- α 에는 영향을 미치지 못했다.
4. In vivo에서 側柏樗皮丸 추출물은 100 mg/kg의 농도에서 LPS에 의한 endotoxin shock을 약간 억제하였다.
5. In vivo에서 側柏樗皮丸 추출물은 LPS에 의한 혈청내 TNF- α 생성을 억제하였지만, IL-6의 생성은 고농도

에서 오히려 증가하였다.

이와 같은 결과로 보아 側柏樗皮丸 추출물은 대식세포에 작용하여 JNK1/2의 인산화를 억제함으로써 NO와 pro-inflammatory cytokine의 생산을 억제하고, LPS로 유발되는 대식세포의 염증성 반응을 억제함으로써 항염증 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, 앞으로 여성 생식기계 다양한 염증성 질환에 應用할 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 4월 28일
- 심 사 일 : 2008년 4월 29일
- 심사완료일 : 2008년 5월 10일

참고문헌

1. 한의부인과학 교재 편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울: 정담. 2002;260-269.
2. 대한산부인과학회. 부인과학 제4판. 서울: 고려의학. 2007;147-159.
3. 최유덕. 새임상부인과학. 서울: 고려의학. 2001;452-457.
4. Jonathan S. Berek. Berek & Novak's Gynecology. fourteenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2007 ;541-552.
5. 朱震亨. 丹溪醫集. 서울: 서울대학교출판부. 2000;416.
6. 李梴. 醫學入門. 서울: 남산당. 1985;1628.
7. 정진홍, 박병렬. 側柏樗皮丸 煎湯液이 실험동물의 鎮消炎 및 抗菌효과에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1991 ;4(1):7-22.
8. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986;89:271-277.
9. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of relative nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages : Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol. 1988;141: 2407-2412.
10. Bergsdorf N, Nilsson T, Wallen P. An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease. Thromb Haemost. 1983;50(3):740-744.
11. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981; 112(2):195-203.
12. 전국한외과대학 공동교재 편찬위원회. 本草學. 서울: 영림사. 2007;161-163, 218-221, 221-223, 396, 397, 437, 438, 578-580, 634, 635, 679, 680.
13. 김창민 등. 中藥大辭典. 서울: 정담. 1998;2200-2205, 2181-2183, 4784-4786, 5605-5608, 6124-6129, 6482-6492, 6514-6525.
14. 임은미. 女性本草學. 서울: 전국의학사. 2005;24-27, 73-76, 145, 146, 169,

- 170, 220-222, 265-267, 269-271.
15. 한방약리학교재편찬위원회. 한방약리학. 2판. 서울: 신일상사. 2006;166-169, 243-245, 247-249, 374, 375, 633, 634, 670-675, 711-713.
 16. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3rd edition. Philadelphia: W.B.Saunders company. 1997;11, 25-26, 250-264, 397.
 17. Julius MC, Robert EL. ATLAS OF IMMUNOLOGY. CRC pres., 1999;39, 40, 57, 58, 192-199, 385, 397.
 18. 채범석 역, Lehninger, Nelson, Cox. 生化學. 서울외국서적. 1996;337.
 19. Wolfe TA, Dasta JF. Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. Ann. Pharmacother. 1995;29:36-46.
 20. 이화진. Saussurea lappa의 NOS 유도 억제활성성분. 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문. 1997.
 21. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell 78. 1994;915-918.
 22. 김창중, 서병세. 최신 일반병리학. 4th. 서울: 신일상사. 2004;145-168.
 23. Vander, Sherman, Luciano. Human physiology: the mechanisms of body function. 7th. International edition. 1998;203.
 24. 권정이. 치명적 endotoxin shock의 병태생리. 서울대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
 25. 김세중. 면역학. 서울: 고려의학. 1994 ;148-161.
 26. 정태호 등. 최신면역학 강의. 경북대학교 출판부. 1996;211-230.
 27. Akira S, et al.. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF- α). FASEB J. 1990;4 (11):2860-2867.
 28. Pravinkumar B. Sehgal. Interleukin-6: molecular pathophysiology. Journal of Investigative Dermatology. 1990; 94:2S-6S.
 29. 임지현 등. Substance P가 만성 아토피 피부염 환자의 말초혈액 단핵 세포로부터 interleukin-12나 interferon-gamma의 생성에 미치는 영향. 천식 및 알레르기. 2001;21(4):636-646.
 30. 이원하. Innate immunity에서 Toll like receptor(TLR)의 기능. 생화학 분자생물학뉴스. 2003;23(3):195-201.
 31. 박준용, 한동수. 세균과 우리 몸과의 교신: Toll like receptors. 대한소화기학회지. 2002;40(5):287-293.
 32. Bottex-Gauthier C, et al.. The Rel/NF-kappa-B transcription factors: complex role in cell regulation. Pathol Biol (Paris). 2002;50(3): 204-211.
 33. Gilmore TD, et al.. Rel/NF-kappa B/Ikappa B protein and cancer. Oncogene. 1996;13:1367-1378.
 34. 김종훈 등. 백서 해마에서 카이닌산 유도 경련에 의한 JNK 경유 신호 전달경로 활성화의 발달단계에 따른 변화. 대한 신경 정신 의학회. 2001; 40(5):971-980.
 35. 송현. 세포이동성에 있어서 MAPK 신호 전달경로의 조절기관 규명. 덕성여자대학교 대학원 박사학위논문. 2006.