

慢益方이 염증 관련 cytokines의 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
곽상호, 유동열

ABSTRACT

The Experimental Study on Anti-inflammatory Effect of *Manbunbang*

Sang-Ho Kwak, Dong-Youl Yoo

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Purpose: This study was performed to evaluate the anti-inflammatory effect of *Manbunbang* extract (MBB).

Methods: In order to understand the mechanism of anti-inflammatory effect of MBB, expression of cytokines and its levels in RAW 264.7 cell lines, as well as changes of cytokine gene expressions in serum, spleen, and liver tissues in acute inflammation induced mouse model were investigated.

Results:

1. MBB significantly suppressed the expression levels of IL-1 β , TNF- α and COX-2 mRNAs at 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations, and IL-6 and NOS-II genes at 100, 50 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations in RAW 264.7 cell lines, compared to those of the control.

2. MBB significantly reduced the production level of IL-1 β , IL-6 and TNF- α at 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations in RAW 264.7 cell lines compared the those of the control.

3. MBB significantly reduced the production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in sera of acute inflammation induced mice.

4. MBB significantly suppressed the expression level of IL-1 β , TNF- α mRNA in spleen tissues as well as IL-6 mRNA in liver tissues in acute inflammation induced mice.

Conclusion: From the results above, anti-inflammatory effect of MBB through its immune regulation could be experimentally explained. Wide treatment of inflammatory diseases such as pelvic inflammation using MBB are recommended.

Key Words: *Manbunbang* (MBB), anti-inflammatory effect, Pelvic Inflammatory Disease

I. 서 론

골반 염증성 질환(Pelvic Inflammatory Disease, PID)은 임균, chlamydia, mycoplasma 등과, 혹은 드물게 herpes virus 감염에 의한 질염, 자궁경부염이 방치되어 자궁을 통하여 난관이나 골반내까지 염증이 진행된 상태를 말한다. 급성 골반 염증이 반복되면서 치료가 잘 되지 않으면, 염증성 진행이 몇 주 혹은 몇 달간 서서히 진행되어 만성 골반 염증성 질환으로 이행하게 된다¹⁻³⁾.

한의학에서 골반 염증성 질환이란 명칭은 없지만, 발현 증상으로 보아 月經不調, 痛經, 帶下, 熱入血室, 產後發熱, 癥瘕, 不妊 등의 범주에 속하는데⁴⁻⁷⁾, 《婦人良方大全》⁸⁾에는 “婦人月經痞塞不通, 或產後餘穢未盡...血得冷則成瘀血也. 血瘀在內 則時時體熱面黃, 瘀久不消, 則爲積聚癥瘕矣”라 하여 월경 및 산후와 관련된 병리로 어혈과 염증의 상관성을 언급하였다.

羅 등⁹⁾은 慢性 骨盤炎을 濕熱壅滯型, 氣滯血瘀型, 肝鬱脾虛型, 陰虛血熱型 등으로 나누어 辨證施治하였는데, 慢盆方은 滋陰補血, 清熱涼血, 活血散瘀하는 효능이 있어 陰虛血熱型의 만성 골반 염증성 질환에 사용되고 있는 처방이다.

본 실험과 관련한 실험 보고로, 제 등¹⁰⁻¹³⁾은 부인과 영역의 염증 질환에 사용되는 다양한 活血化瘀加味方이 항혈전 효과가 있음을 보고하였고, 정¹⁴⁾은 본 慢盆方이 항혈전 작용이 있음을 보고하였다. 또한 현대의학에서도 혈전과 염증의 병리적 단계에서 일정 부분에 있어 생화학적으로 동일한 기전이 작용한다는 연구 등이 보고¹⁵⁻¹⁷⁾된 바 있어, 慢盆方이

항염증 효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구에 착수하였다.

저자는 慢盆方의 항염증 작용에 대한 기전을 구명하기 위하여, RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokines의 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향과, 급성 염증성 질환 생쥐모델의 혈청내, 비장 및 간 조직내 cytokines 변화에 미치는 영향 등에 대해 실험한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 동 물

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 Balb/c계 생쥐를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2℃, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 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

본 실험에 사용한 慢盆方 (Manbunbang, 이하 MBB로 표기)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 한 첩 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Composition of *Manbunbang* (MBB)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
熟地黃	<i>Rhemaniae Radix</i>	5
龜板	<i>Reevesi Geoclemys</i> (<i>Carapax Testucinis</i>)	5
鱉甲	<i>Carapax Amydae</i>	5
牡丹皮	<i>Moutan Cortex Radix</i>	5
青蒿	<i>Artemisiae Annuae herba</i>	5
丹蔘	<i>Salviae Radix</i>	5
百部根	<i>Stemonaе Radix</i>	5
玄蔘	<i>Scrophulariae Radix</i>	5
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	5
地骨皮	<i>Licii Radicis Cortex</i>	5
野菊花	<i>Chrysanthemum indicum</i>	5
	total	55

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, 3.8% sodium citrate, lipopolysaccharide (LPS), diethyl pyrocarbonate (DEPC), dulbecco's minimum essential medium (DMEM), collagenase A, penicillin, streptomycin, amphotericin, anti-body avidin-HRP, complete adjuvant, chloroform, isopropanol, RNAzolB acid, magnesium chloride (MgCl₂)은 Sigma (Sigma Co., USA) 제품을, hexanucleotides, RNase inhibitor는 Takara (Takara, Co., japan) 제품을, M-MLV RT는 Promega (Promega Co., USA) 제품을, normal saline은 중의 제약 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Hyclone Logan, USA) 제품을, RNase는 Pharmingen (Torreyana, USA) 제품을, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II ELISA kit는 Biosource (USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약

은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge (Beckman Co., USA), rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Swiss), deep freezer (Sanyo Co., Japan), freeze dryer (Eyela Co., Japan), roller Mixer (Gowon scientific technology Co., Korea), 열탕추출기 (대웅, Co., Korea), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), heat block (Vision scientific Co., Korea), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Co., Japan), micro pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Co., Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Co., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, Co., USA), plate shaker (Lab-Line, Co., USA), ELISA reader (Molecular Devices, Co., USA), Quantitative real-time-PCR (Abi, Co., USA), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

MBB 2침을 약탕기 (대웅 1800)에 넣고 증류수 1,500 ml를 가한 후, 3시간 가열 추출하여, 침전물을 filter paper를 이용하여, 3회 여과하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -80℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하

여 1첩당 14.5 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) Quantitative real-time-PCR

(1) RAW 264.7 세포배양

Murine macrophage cell line RAW 264.7 세포주는 10% FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 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 부착 세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

(2) RAW 264.7 세포에서 RNA 분리

RAW 264.7 세포주를 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 MBB extract (100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 1시간 후 LPS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500 μl 를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl 를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로

수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 DNase I (10 U/ μl) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5 \times RT buffer (250 mM, Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 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 reaction (PCR)에 사용하였다.

(4) 정량적 중합 효소 연쇄 반응

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

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

Real time PCR의 조건은 다음과 같다 : 50°C에서 2분, 94°C에서 10분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. MBB extract 투여군과 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

3) 염증 관련 cytokines 분석

RAW264.7 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포 수로 분주하였다. 여기에 MBB extract(100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 1시간 후 LPS 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각의 well에 첨가하고 3시간 배양하였다. 배양 후 세포배양 상층만을 취하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비량을 ELISA kit을 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

4) Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량 측정

MBB extract 투여군은 20 g Balb/c계 생쥐를 기준으로 검액 9.6 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 7일 후 lipopolysaccharide (LPS) 1 mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장 천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100 μl (1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100 μl 를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μl 를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μl 씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μl 의 stop 용액을 처리한 다음 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간과 비장 조직에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응

LPS로 유도된 실험 생쥐의 비장 및 간조직 0.1 g과 RNAzolB 500 μl 를 넣고

용해될 때까지 분쇄하고, 이를 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다. 이후 실험은 P.7에 나타난 바와 같이 IL-1β, IL-6, TNF-α를 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다.

5) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

III. 실험 성적

1. RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokines 유전자 발현에 미치는 영향

1) IL-1β 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 IL-1β 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.09 ± 0.03, 대조군이 1.02 ± 0.02로 나타났으며, MBB extract 100, 50, 10 μg/ml 농도에서는 각각 0.62 ± 0.05, 0.71 ± 0.06, 1.24

± 0.21의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 100, 50 μg/ml 농도에서 유의성 있는(***p<0.001, **p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 1).

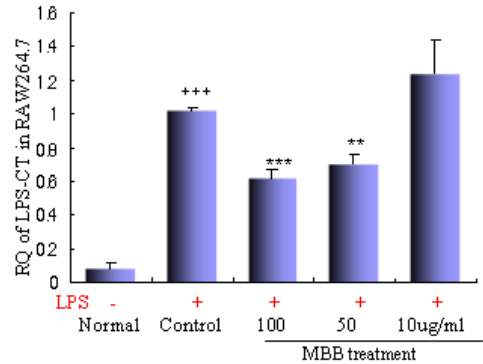


Fig. 1. Inhibitory effects of MBB extract on IL-1β mRNA expression in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of MBB extract (100, 50 and 10 μg/ml) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 μg/ml) for 6hrs. IL-1β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++p<0.001) and compared with control by *t*-test (***p<0.001, **p<0.01).

2) IL-6 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.32 ± 0.09, 대조군이 1.07 ± 0.07로 나타났으며, MBB extract 100, 50, 10 μg/ml 농도에서는 각각 0.61 ± 0.03, 0.79 ± 0.08, 0.90 ± 0.03의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 농도 의존적으로 유의성 있는(***p<0.001, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 2).

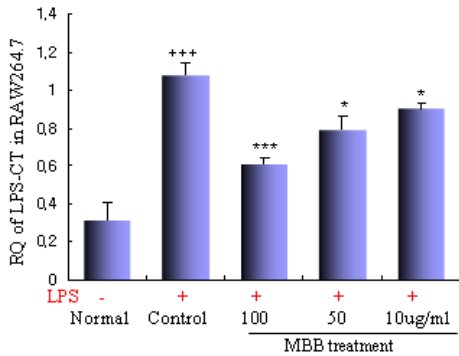


Fig. 2. Inhibitory effects of MBB extract on IL-6 mRNA expression in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of MBB extract (100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 6hrs. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++ $p < 0.001$) and compared with control by *t*-test (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

3) TNF- α 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.18 ± 0.06 , 대조군이 1.04 ± 0.04 로 나타났으며, MBB extract 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 각각 0.32 ± 0.06 , 0.51 ± 0.09 , 0.99 ± 0.13 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

4) COX-2 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.27 ± 0.04 , 대조군이 0.99 ± 0.01 로 나타났으며, MBB extract 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 각각 0.65 ± 0.10 , 0.92 ± 0.03 , 1.14 ± 0.21 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

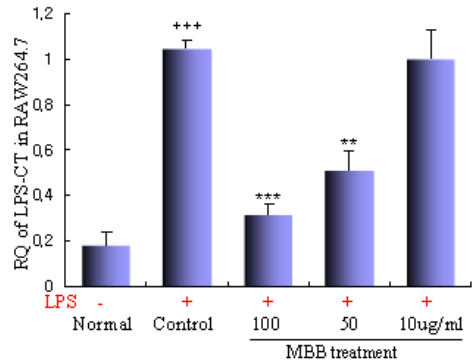


Fig. 3. Inhibitory effects of MBB extract on TNF- α mRNA expression in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of MBB extract (100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 6hrs. TNF- α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++ $p < 0.001$) and compared with control by *t*-test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

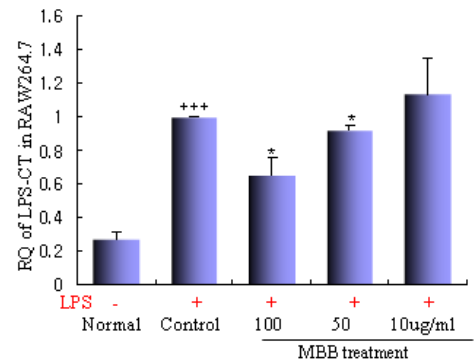


Fig. 4. Inhibitory effects of MBB extract on COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of MBB extract (100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 6hrs. COX-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++ $p < 0.001$) and compared with control by *t*-test (* $p < 0.05$).

5) NOS-II 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.038 ± 0.017 , 대조군이 0.984 ± 0.017 로 나타났으며, MBB extract 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 각각 0.566 ± 0.105 , 0.554 ± 0.129 , 0.927 ± 0.012 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

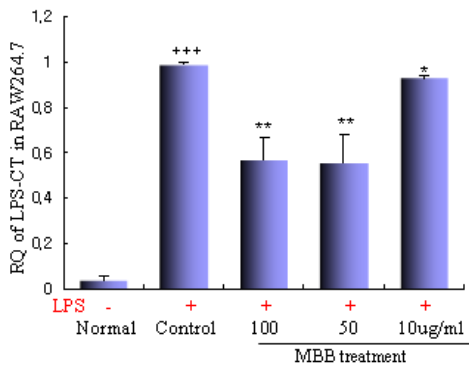


Fig. 5. Inhibitory effects of MBB extract on NOS-II mRNA expression in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of MBB extract (100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 6hrs. NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t-test* (+++ $p < 0.001$) and compared with control by *t-test* (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

2. RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokines 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 β 생성량

RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 생성량은 정상군은 38.5 ± 18.2 (pg/ml), 대조군은 701.0 ± 59.4 (pg/ml)로 나타났으며, MBB extract 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 각각 318.0 ± 62.2 (pg/ml), $425.0 \pm$

52.3 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 6).

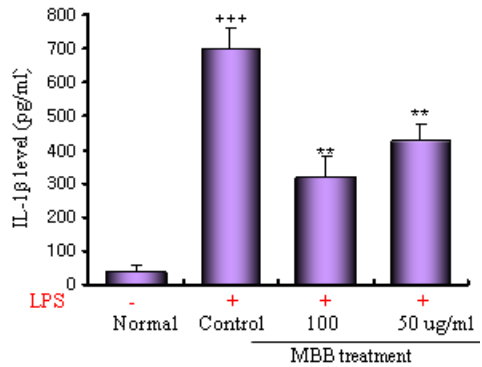


Fig. 6. Effect of MBB extract on the levels of IL-1 β in the RAW 264.7 cell. The levels of IL-1 β were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t-test* (+++ $p < 0.001$) and compared with control by *t-test* (** $p < 0.01$).

2) IL-6 생성량

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군은 363.0 ± 77.8 (pg/ml), 대조군은 6002.0 ± 729.7 (pg/ml)로 나타났으며, MBB extract 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 는 2402.0 ± 342.9 (pg/ml), 4043.5 ± 178.8 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 7).

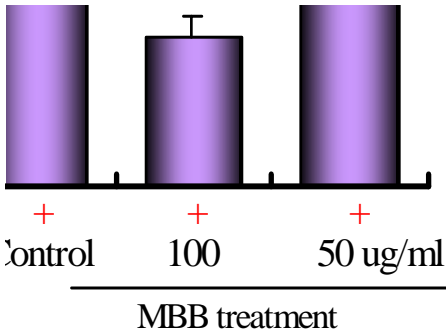


Fig. 7. Effect of MBB extract on the levels of IL-6 in the RAW 264.7 cell. The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t-test* (+++*p*<0.001) and compared with control by *t-test* (***p*<0.01, **p*<0.05).

3) TNF-α 생성량

RAW 264.7 세포주에서 TNF-α 생성량은 정상군은 272.5 ± 81.3 (pg/ml), 대조군은 3243.5 ± 392.4 (pg/ml)로 나타났으며, MBB extract 100, 50 μg/ml 농도에서는 각각 1745.0 ± 84.85 (pg/ml), 2186.5 ± 309.0 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 (***p*<0.01, **p*<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

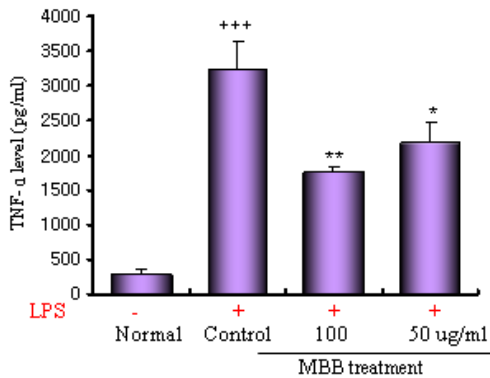


Fig. 8. Effect of MBB extract on the levels of TNF-α in the RAW 264.7 cell. The levels of TNF-α were determined using

a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t-test* (+++*p*<0.001) and compared with control by *t-test* (***p*<0.01, **p*<0.05).

3. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokines 변화에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량

혈청내 IL-1β 생성량을 측정된 결과, 정상군은 50.3 ± 11.3 (pg/ml), 대조군은 75.8 ± 0.4 (pg/ml)로 나타난 반면, MBB extract 투여군에서는 67.2 ± 14.0 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (***p*<0.001) 억제를 나타냈다(Fig. 9).

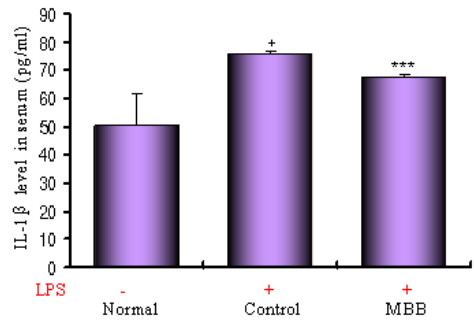


Fig. 9. The effect of MBB extract on IL-1β production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with MBB extract (9.6 mg/20 g/day) and LPS (1 mg/kg). Total IL-1β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t-test* (+*p*<0.05) and compared with control by *t-test* (***p*<0.001).

2) IL-6 생성량

혈청내 IL-6 생성량을 측정된 결과, 정상군은 153.0 ± 12.3 (pg/ml), 대조군은 497.0 ± 0.8 (pg/ml)로 나타난 반면, MBB extract 투여군에서는 482.0 ± 0.1 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (***p*<0.001) 억제를 나타냈다

(Fig. 10).

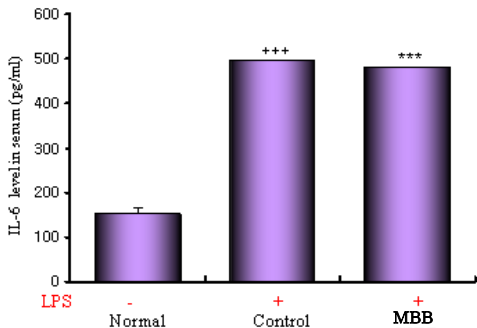


Fig. 10. The effect of MBB extract on IL-6 production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with MBB extract (9.6 mg/20 g/day) and LPS (1 mg/kg). Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t-test* (+++*p*<0.001) and compared with control by *t-test* (****p*<0.001).

3) TNF-α 생성량

혈청내 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 94.8 ± 9.8 (pg/ml), 대조군은 1687.0 ± 83.11 (pg/ml)로 나타난 반면, MBB extract 투여군에서는 339.6 ± 64.2 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (***p*<0.001) 억제를 나타냈다(Fig. 11).

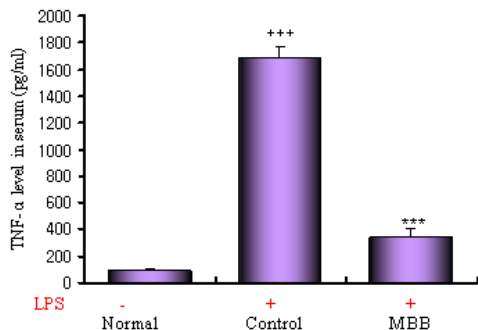


Fig. 11. The effect of MBB extract on TNF-α production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with MBB extract (9.6 mg/20 g/day) and LPS (1 mg/kg). Total TNF-α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t-test* (+++*p*<0.001) and compared with control by *t-test* (****p*<0.001).

4. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간 조직내 cytokines 변화에 미치는 영향

1) IL-1β mRNA 유전자 발현

간 조직 내 IL-1β mRNA 유전자 발현의 RQ 값은 정상군은 0.088 ± 0.014, 대조군은 1.066 ± 0.006로, MBB extract 투여군은 0.871 ± 0.020로 나타났다. 반면, 비장 조직에서 정상군은 0.064 ± 0.010, 대조군은 0.995 ± 0.006, MBB extract 투여군은 0.618 ± 0.090로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (***p*<0.01) 억제되었다(Fig. 12).

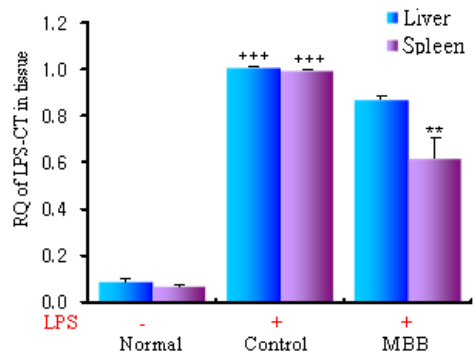


Fig. 12. Inhibitory effects of MBB extract on IL-1β mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with MBB extract (9.6 mg/20 g/day) and LPS (1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-1β mRNA express were measured real-time PCR. Statistically significant value compared with normal data (+++*P*<0.001) and compared with control data (***P*<0.01).

2) IL-6 mRNA 유전자 발현

간 조직내 IL-6 mRNA 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군은 0.196 ± 0.008 , 대조군은 1.051 ± 0.051 , MBB extract 투여군에서는 0.696 ± 0.06 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 억제 효과가 나타났다. 반면, 비장조직에서 정상군은 0.290 ± 0.045 , 대조군은 0.989 ± 0.011 , MBB extract 투여군은 0.682 ± 0.02 로 나타났다(Fig. 13).

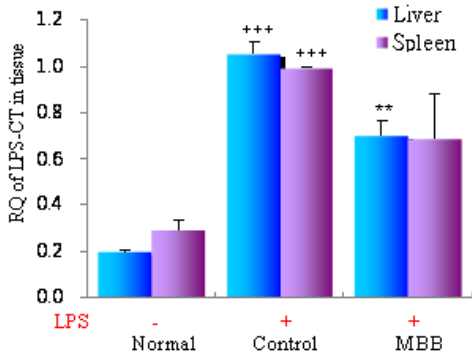


Fig. 13. Inhibitory effects of MBB extract on IL-6 mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with MBB extract (9.6 mg/20 g/day) and LPS (1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-6 mRNA express were measured real-time PCR. Statistically significant value compared with normal data (+++ $P < 0.001$) and compared with control data (** $P < 0.01$).

3) TNF- α mRNA 유전자 발현

간 조직내 TNF- α mRNA 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군은 0.581 ± 0.067 , 대조군은 1.107 ± 0.107 , MBB extract 투여군에서는 0.922 ± 0.123 로 나타났다. 반면, 비장조직에서 정상군은 0.806 ± 0.058 , 대조군은 0.999 ± 0.002 , MBB extract 투여군에서는 0.886 ± 0.029 로 나타나 대조

군에 비하여 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 억제 되었다(Fig. 14).

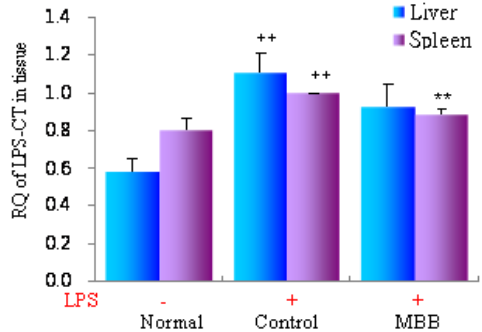


Fig. 14. Inhibitory effects of MBB extract on TNF- α mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with MBB extract (9.6 mg/20 g/day) and LPS (1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and TNF- α mRNA express were measured real-time PCR. Statistically significant value compared with normal data (++ $P < 0.01$) and compared with control data (** $P < 0.01$).

IV. 고 찰

골반 염증성 질환 (PID)은 골반 염증성 질환(Pelvic Inflammatory Disease, PID)은 임균, chlamydia, mycoplasma와 E. coli균, streptococcus viridans균, anaerobic cocci균, bacteroides fragalis균 등, 혹은 드물게 herpes virus 감염에 의한 질염이나 자궁 경부염, 성병의 후유증으로 발생하며 자궁을 통하여 난관이나 골반내까지 염증이 진행된 상태를 말하는데, 해부학적 위치에 따라 염증성 변화는 혈관, 임파선을 통하여 자궁내막에서 시작하여 난관, 난소, 복막 및 인접 장기로 전파됨으로써 자궁내막염, 난관염 및 복막염 등을 유발한다^{1-4,18)}.

급성 골반 염증성 질환은 월경주기의 첫 5일간 증상이 악화되며, 급성 골반 염증이 반복되면서 치료가 잘 되지 않으면, 염증성 진행이 몇 주 혹은 몇 달간 서서히 진행되어 만성 골반 염증성 질환으로 이행하게 된다^{2,3}.

최근 성생활의 문란, 자궁내 장치 삽입, 산후나 유산후의 후유증 등으로 골반 염증성 질환이 발생하여 상당수가 고통을 받고 있으며, 약 25%에서 난관이 막혀서 임신이 안 되는 난관 폐색성 불임이 초래되고 있다. 또한 적기에 치료가 이루어지지 않는 경우 월경통, 난소 난관 농양, 자궁외 임신, 만성 골반통, 방광염, 조기 폐경 등의 다양한 후유증이 발생한다^{12,14}.

대개의 경우 골반 염증성 질환의 진단은 골반통 또는 하복부 동통, 경관 움직임에 따른 통각 및 부속기 통증, 그리고 발열 등의 3가지 증상과 징후로 이루어진다. 골반 염증성 질환의 진단 목표는 경증의 경우도 놓치지 않고 진단할 수 있도록 하며 감염되지 않은 환자에게 항생제가 남용되지 않도록 특이도를 증가시키는 일이다³.

치료법으로는 항생제 주사나 먹는 항생제 등이 사용되나, 심한 경우 자궁 적출술이나 양측 난관 난소 절제술이 시행되는데, 최근 항생제 남용으로 인하여不應性 혹은 재발성 만성 골반 염증성 질환이 점차 증가 추세에 있어 사회적 문제가 되고 있다^{1-3,14}.

한의학에서 골반 염증성 질환이란 명칭은 없지만 이와 관련하여 《女科經綸》¹⁹에서는 “月水行房，精血相射，入于任脈，留于脈中，以治小腹結病”이라 하여 골반 염증성 질환과 성관계, 임맥 및 어

혈과의 연관성을 말하였고, 《婦人良方大全》⁸에서는 “婦人月經痞塞不通，或產後餘穢未盡…血得冷則成瘀血也。血瘀在內則時時體熱面黃，瘀久不消，則爲積聚癥瘕矣”라 하여 골반 염증성 질환의 病因과 積聚, 癥瘕의 형성을 서술하고 있다.

慢盆方은 《實用中醫婦科學》⁹에 수재된 慢性 盆腔炎 處方으로, 滋陰補血 清虛熱 효능의 熟地黃 菁蒿, 涼血除蒸 瀉火 효능의 地骨皮, 滋陰潛陽 軟堅散結 補腎 효능의 龜板 鱉甲, 清熱涼血 活血散瘀 消癰 효능의 牡丹皮 丹蔘, 潤肺下氣止咳 효능의 百部根, 涼血平肝 斂陰 효능의 白芍藥, 滋陰清熱 解毒 효능의 玄蔘 野菊花로 구성되어, 전체적으로 滋陰補血, 清熱涼血, 活血散瘀하는 처방임을 알 수 있다.

羅 등⁹은 慢性 骨盤炎을 크게 濕熱壅阻型, 寒凝血滯型, 氣滯血瘀型, 肝鬱脾虛型, 腎虛瘀滯型, 陰虛血熱型으로 나누어 辨證施治하였는데, 慢盆方은 滋陰補血, 清熱涼血, 活血散瘀하는 효능이 있어 陰虛血熱型의 慢性 骨盤 炎症性 疾患에 사용되고 있다고 보여진다.

최근 한의학계에서 보고된 실험 연구 대부분은 清熱解毒, 活血化瘀 약물로 구성된 攻法 처방이 위주였으며, 慢盆方과 같이 滋陰補血과 活血散瘀의 攻補兼法의 치료 처방에 관한 연구는 미진한 편이었다.

慢盆方 구성 약물 중 본 실험과 유관한 실험 보고로 조 등^{20,21}은 熟地黃, 부²²는 牡丹皮, 정²³과 최²⁴는 白芍藥에 대한 抗酸化 효과를 보고한 바가 있으며, 정⁴은 본 慢盆方이 항혈전 작용이 있음을 보고하였다. 또한 제 등¹¹⁻¹⁴은 부인과 염증에 사용되는 다양한 活血化瘀加味方

이 항혈전 효과가 있음을 보고하였고, 현대의학에서도 혈전과 염증의 병리적 단계에서 일정 부분에 있어 생화학적으로 동일한 기전이 작용한다는 연구 등¹⁵⁻¹⁷⁾이 보고된 바가 있기에, 慢盆方이 항염증 효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구에 착수하였다.

본 연구에서는 慢盆方이 RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α , COX-2, NOS-II 등의 유전자 발현에 미치는 영향과 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성량에 미치는 영향을 관찰하였으며, *in vivo*에서 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량과 비장, 간조직내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α mRNA 발현량을 측정 하였다.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokines 중 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokines으로, IL-6는 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조혈계에 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^{25,26)}. TNF- α 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되어 종양세포에서 세포독작용을 하며 염증세포에서 IL-1 β 와 유사한 염증유발 작용과 세포의 증식과 분화를 조절하고 만성염증이나 감염에서도 역할을 하며 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시켜 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 특히 TNF- α 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하며, 최근에는 TNF- α 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연

구되고 있다²⁷⁻²⁹⁾. 또한 용모 양막염에서의 IL-6 및 TNF- α 의 증가³⁰⁾, pro-inflammatory cytokines 중 IL-6 및 TNF- α 가 초기 급성 염증 시 증가³¹⁾, 여성의 감염 시 pro-cytokines의 증가³²⁾ 등의 다양한 보고가 있어 염증과 면역반응에 있어서 IL-6과 TNF- α 의 조절이 중요하다고 할 수 있다.

慢盆方의 항염증 효과에 대한 연구에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 유전자 발현 RQ 값은 MBB extract 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 1). RAW 264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은 MBB extract 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현 RQ 값은 MBB extract 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3).

Nitric oxide(이하 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(이하 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(이하 iNOS)의 세 가지 아형으로 존재한다. 혈관내

피세포성 NOS, 신경세포성 NOS는 활성화하는데 칼슘과 calmodulin이 필요하며 지속적으로 분비되는 반면 iNOS는 칼슘과 무관하게 활성화되며 염증성 cytokine이나 LPS등에 반응하여 분비된다³³⁾. NO와 PG 그리고 이들과 관련된 두 효소, NOS와 COX-2는 염증반응의 단계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 iNOS와 COX-2는 염증반응에서의 중요성이 대두되고 있는데, 염증반응 및 염증 초기반응 물질에 의해 상승 조절되고, 활성화된 이들 효소에 의한 생성물이 급성 및 만성 염증반응의 중요한 매개체로 작용한다고 알려져 있다³⁴⁾.

RAW 264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현과 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향에서는 RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현 RQ 값은 MBB extract 100, 50, $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).

RAW 264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현 RQ 값은 MBB extract 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5).

RAW 264.7 세포주에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 측정된 결과, IL-1 β 생성량은 MBB extract 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6). RAW 264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 MBB extract 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7). RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 생성량은 MBB extract 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).

급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청내 cytokines 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해, 혈청내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 측정된 결과, 혈청 내 IL-1 β 생성량은 MBB extract 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 억제력을 나타내었으며(Fig. 9), 혈청 내 IL-6 생성량은 MBB extract 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 억제력을 나타내었고(Fig. 10), 혈청 내 TNF- α 생성량은 MBB extract 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 11). 그리고 비장 및 간조직내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α mRNA 유전자 발현을 측정된 결과, 간조직에서 IL-1 β mRNA 유전자 발현은 대조군에 비해 유의성 있는 감소 결과가 나타나지 않았고, 비장조직에서는 MBB extract 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 12). IL-6 mRNA 유전자 발현은 간조직에서는 MBB extract 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 감소 결과를 나타내었고, 비장조직에서 MBB extract 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소가 없었다(Fig. 13). TNF- α mRNA 유전자 발현은 간조직에서는 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타나지 않았고, 비장조직에서는 MBB extract 투여군에서 대조군에 비하여 각각 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 14).

이상의 실험적 연구 결과, 慢益方은 RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 및 NOS-II 유전자 발현 및 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성량을 유의성 있게 감소 시켰다. 또한 급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 유의성 있게 억제

하였으며, 생쥐의 비장 조직내 IL-1 β , TNF- α mRNA 발현과 간 조직내 IL-6 mRNA 발현을 유의성 있게 억제함으로써 다양한 면역 조절 작용을 통한 抗炎症 효과가 실험적으로 입증되었다.

이 같은 결과는 본 慢盆方이 항혈전 작용이 있음을 보고한 정⁶⁾의 연구 보고 결과와 종합하여 볼 때 염증과 혈전에 본 처방이 동시에 유의적인 효능을 발휘함으로써, 골반염을 비롯한 부인과 제염증 질환에 다양하게 응용될 수 있음을 시사한다.

V. 결 론

慢盆方の 항염증 작용에 대한 기전을 구명하기 위하여 RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokine의 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐모델의 혈청 내, 비장 및 간 조직내 cytokine 변화에 미치는 영향 등을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 慢盆方은 RAW 264.7 세포주에서 대조군에 비하여 IL-1 β , TNF- α 및 COX-2 유전자 발현을 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서, IL-6, NOS-II 유전자 발현을 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소시켰다.
2. 慢盆方은 RAW 264.7 세포주에서 대조군에 비하여 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성량을 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소시켰다.
3. 慢盆方은 급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 대조군에 비하여 유의성 있게

감소시켰다.

4. 慢盆方은 급성 염증이 유발된 생쥐의 비장 조직내 IL-1 β , TNF- α mRNA 발현과 간 조직내 IL-6 mRNA 발현을 유의성 있게 억제하였다.

이상의 실험 결과, 慢盆方の 면역조절 작용을 통한 항염증 효과가 실험적으로 究明되어, 임상에서 골반염을 비롯한 다양한 염증성 질환에 보다 광범위하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2009년 4월 15일
- 심 사 일 : 2009년 4월 29일
- 심사완료일 : 2009년 5월 10일

참고문헌

1. 대한산부인과학회. 부인과학. 부산: 현대의학서적사. 1987;569-588.
2. 韓國産婦人科學會 教科書編纂委員會. 婦人科學. 서울: 도서출판 칼빈서적. 1997;256-283.
3. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울: 정담출판사. 2002;266-281.
4. 李秀芝. 骨盤炎 1, 2號方治療骨盤炎70例. 山東中醫雜誌. 1993;12(1):21.
5. 朱小南 등. 女科經驗選. 北京: 人民衛生出版社. 2006;132-134.
6. 夏桂成. 中醫臨床婦科學. 北京: 人民衛生出版社. 1994;285-293.
7. 牛建昭. 現代中西婦科學. 北京: 中國科學技術出版社. 1996;230-260.
8. 陳自明. 婦人良方大全. 北京: 文光圖書有限公司. 1982;7:34.
9. 羅元愷 등. 實用中醫婦科學. 上海: 上

- 海科學技術出版社. 1994;255-259.
10. 제종민. 稜莖消積湯의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 박사학위논문. 2007.
 11. 임동욱 등. 複方紅藤敗醬散의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):151-174.
 12. 이혜경. 加味通經湯의 항혈전, 소염 및 진통작용에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2003;16(1):118-135.
 13. 이상수 등. 少腹逐瘀湯이 항혈전 및 소염, 진통에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):81-96.
 14. 정우석. 慢盆方이 혈전 병태 유관 인자에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 박사학위논문. 2007.
 15. Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2002;88:554-567.
 16. Wakefield TW, Henke PK. The role of inflammation in early and late venous thrombosis: Are there clinical implications?. *Semin Vasc Surg.* 2005;18(3):118-129.
 17. Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. *Thromb Haemost.* 2005;94(2):362-365.
 18. Jeffrey F et al. Clinical predictors of endometritis in women with symptoms and signs of pelvic inflammatory disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* April. 2001;184(5):856-864.
 19. 蕭垠. 女科經綸. 江蘇省: 江蘇科學技術出版社. 1986;40.
 20. 조수인. 흰쥐 신장 조직 손상에 대한 熟地黃의 항산화 효과. 대한본초학회지. 2003;18(4):119-126.
 21. 이용범 등. 식이성 고지혈증에 미치는 숙지황의 영향 및 항산화 활성에 관한 연구. *環境研報.* 2001;11(1):41-57.
 22. 부용출 등. 녹차와 목단피의 항산화 성분. *韓國農化學會誌.* 1993;36(5):326-331.
 23. 정일윤 등. 백작약 열수 추출물의 산화적 스트레스 억제효과 및 유효 성분 동정. *한국식물영양과학회지.* 2003;32(5):739-744.
 24. 최수임 등. 생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성검색. *한국생물공학회지.* 2003;18(4):282-288.
 25. 김세중. 면역학길라잡이. 서울: 고려의학. 2000;65-68.
 26. 홍천수 역. Pathophysiology로 이해하는 내과학. 서울: 도서출판 정담. 2002;10-12.
 27. Aeberli 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.* 2002;132:414-422.
 28. 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.* 1998;30:4126-4127.
 29. Brian TP 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. 2002 ;187(4):894-897.
30. Henrik Dollner. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-cytokines and cytokine inhibitors. An International Journal of Obstetrics and Gynecology. 2002;109:534-539.
31. Matthias Winkler. Role of cytokines and other inflammatory mediators. An International Journal of Obstetrics and Gynecology. 2003;110:118-123.
32. Charles N et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2003;188(5):1174-1176.
33. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아프로시스에 미치는 영향. 대한산부인과학회지. 2002 ;45(5):766-773.
34. Carla B et al. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E2 biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells. Journal of Reproductive Immunology. 2003;60(1) :35-52.