

銀甲方이 염증 관련 cytokines의 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
이보라, 유동열

ABSTRACT

The Experimental Study on Anti-inflammatory Effects of *Eungapbang*(EGB)

Bo-Ra Lee, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

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

Methods: To evaluate the anti-inflammatory effects of EGB, we nourished RAW 264.7 cell lines in the laboratory dish. Next, inflammatory cytokine concentrations were analyzed. Then, sera were prepared from blood after lipopolysaccharide (LPS) injection in chemically induced mouse models of intestinal inflammation, and Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) were measured using ELISA kits.

Results:

1. EGB significantly suppressed the expression levels of IL-1 β and NOS-II genes at 100, 50 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations, and IL-6, TNF- α and COX-2 mRNAs at 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations.
2. EGB significantly reduced the production level of IL-1 β and TNF- α at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations, and IL-6 at 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations.
3. EGB significantly decreased the production level of IL-1 β and IL-6 in sera of acute inflammation induced mice.
4. EGB could suppress the expression level of IL-1 β and IL-6 mRNA in spleen tissues in acute inflammation induced mice.

Conclusion: On the basis of the above results, it is confirmed that the anti-inflammatory effects of EGB were recognized. Therefore, EGB is recommended as promising therapy for treatment of such ailments as pelvic inflammatory disease.

Key Words: *Enngapbang* (EGB), anti-inflammatory effect, pelvic inflammatory disease

I. 서 론

銀甲方은 《實用中醫婦科學》¹⁾에 수록된 처방으로 金銀花, 茵陳 등이 清熱利濕하고 蒲黃, 鱉甲 등이 祛瘀散結하는 효능²⁻⁵⁾을 지니고 있어 濕熱壅阻와 瘀血로 인한 만성 골반염에 활용되고 있다.

골반 염증성 질환(Pelvic Inflammatory Disease, PID)은 子宮內膜, 卵管, 卵巢를 포함한 여성 상부 생식기에 발생하는 감염과 그로 인해 발생한 염증 질환을 말한다⁶⁾.

골반 염증성 질환은 병정에 따라 급성과 만성으로 나뉘며, 만성 골반염은 급성 골반염의 치료가 미진했을 때 시간이 지남에 따라 염증성 진행이 만성화 되는 것으로 간혹 급성 염증이 완치되었다가 재발되는 경우도 이에 포함된다⁶⁻⁹⁾.

골반 염증성 질환의 증상은 매우 광범위하여 다양하나 골반통 또는 하복부 동통, 경관의 움직임에 따른 통각 및 부속기 통증, 고열, 분비물 증가, 빈맥 등이 흔한 증상이다⁸⁻¹¹⁾. 이러한 증상들을 호소하는 골반 염증성 질환의 대부분은 급성으로 발현되므로, 초기에 정확한 진단과 항생제 투여 등으로 완화 및 치료가 되나, 급성 골반염의 치료가 부적절하거나 항생제 남용으로 불응성 혹은 재발성 만성 골반 염증성 질환이 점차 증가 추세에 있다^{6,7,9)}. 또한 만성 골반염은 유착이나 불임, 자궁외 임신, 만성 골반통증 등의 심각한 합병증을 초래하기도 한다^{9,12-14)}.

한의학에서는 골반 염증성 질환이란 명칭은 없으나 產後發熱, 帶下, 經病疼痛, 婦人腹痛, 熱入血室, 月經不調, 癥瘕, 不妊^{7,15-20)} 등에서 이 질환과 관련된 증

상을 볼 수 있는데, 《婦人良方大全·婦人腹中瘀血論》²¹⁾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 언급하였으며, 申¹⁰⁾은 本病의 발생 원인을 濕毒이 胞脈을 막고 있거나 평소에 濕熱이 下焦에 蘊積되어 있어서 氣血을 막아 형성된다고 하였다.

銀甲方이외에 紅藤敗醬散, 清熱解毒化瘀湯, 利濕解毒湯加減方 등이 만성 골반염에 활용되고 있으며²²⁾, 항염증 작용에 대한 실험적 연구로는 康寧湯²³⁾, 行經紅花湯²⁴⁾, 清熱解毒加鷄血藤²⁵⁾ 등이 부인과 영역의 염증 질환에 효과가 있음이 보고되었고, 李²⁶⁾는 銀甲方加減이 항혈전 작용이 있음을 보고하였다. 또한 현대의학에서도 혈전과 염증의 병리적 단계에서 일정 부분에 있어 생화학적으로 동일한 기전으로 작용한다는 연구 등이 보고^{27,28)}된 바 있기 때문에 銀甲方이 염증에 유효하리라 사료되어 본 연구에 착수하였다.

저자는 銀甲方의 항염증 작용에 대한 기전을 究明하기 위하여, RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokines의 유전자 발현 및 생성량에 미치는 영향과, 급성 염증성 질환 생쥐모델의 혈청 내, 비장 및 간 조직 내 cytokines에 미치는 영향 등에 대해 실험한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 동 물

실험동물은 대한 실험동물센터에서 구입한 Balb/c계 생쥐를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2°C, 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, 항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용한 銀甲方 (*Eungapbang*, 이하 EGB로 표기)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Compositions of *Eungapbang* (EGB)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	4
鱉甲	<i>Carapax Amydae</i>	4
蒲黃	<i>Typhae Pollen</i>	4
紅藤	<i>Mucunae Caulis</i>	4
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	4
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	4
蒲公英	<i>Taraxaci Herba</i>	4
椿根皮	<i>Ailanthi Cortex</i>	4
大青葉	<i>Isatidis Folium</i>	4
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	4
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4
紫花地丁	<i>Viola Herba</i>	4
琥珀	<i>Succinum</i>	4
Total		52

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약중 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, 2,7-dichloro-dihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA), anti-body avidin-HRP, complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), RNAzolB acid, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma (USA) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (USA) 제품을, RNase는 Pharmingen (Torreyana, USA) 제품을, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II ELISA kit는 Biosource (USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge (Beckman Co., USA.), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), 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), heate 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) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

EGB 2접을 약탕기(대용 1800)에 넣고 증류수 1,500 ml를 가한 후, 3시간 가열 추출하여, 침전물을 3회 여과(3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1접당 13 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 정량적 실시간-중합효소 연쇄반응

(1) RAW 264.7 세포배양

Murine macrophage cell line RAW 264.7 세포주는 10% FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37°C CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 2회 씻고 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 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

먼저 RAW 264.7 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 EGB 추출물 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 1시간 후 LPS 2

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB $500 \mu\text{l}$ 를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl_3) $50 \mu\text{l}$ 를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 $200 \mu\text{l}$ 의 상층액을 회수하여 2-propanol $200 \mu\text{l}$ 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 $20 \mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 heating block 75°C 에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA $3 \mu\text{g}$ 을 DNase I ($10 \text{ U}/\mu\text{l}$) $2 \text{ U}/\text{tube}$ 를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C 에서 10분 동안 변성시키고, 이에 $2.5 \mu\text{l}$ 10 mM dNTPs mix, $1 \mu\text{l}$ random sequence hexanucleotides ($25 \text{ pmole}/25 \mu\text{l}$), RNA inhibitor로서 $1 \mu\text{l}$ RNase inhibitor ($20 \text{ U}/\mu\text{l}$), $1 \mu\text{l}$ 100 mM DTT, $4.5 \mu\text{l}$ 5 \times RT buffer (250 mM, tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2)를 가한 후, $1 \mu\text{l}$ 의 M-MLV RT ($200 \text{ U}/\mu\text{l}$)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 $20 \mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 $20 \mu\text{l}$ 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-중합효소 연쇄반응

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

G3PDH	Forward Primer 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3' Reverse Primer 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
TNF-alpha	Forward Primer 5'TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATC GGTCC 3' Reverse Primer 5'GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
IL-6	Forward Primer 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3' Reverse Primer 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
IL-1β	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. EGB 추출물 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

RAW 264.7 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 EGB 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 1시간 후 LPS 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각의 well에 첨가한 후 3시간 배양하고 세포

를 harvest하여 -20°C의 냉동고에 보관한 후 IL-1β, IL-6, TNF-α의 분비량을 ELISA kit를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

4) Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) IL-1β, IL-6 생성량 측정

EGB 추출물 투여군은 검액 8.6 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 7일 후 LPS 1 mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장 천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1β, IL-6 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 다시 세척하였다. 2 시

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

(2) 간과 비장 조직에서의 정량적-중합효소 연쇄반응

LPS로 유도된 실험 생쥐의 비장 및 간조직 0.1g과 RNazolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하고, 이를 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 여기에 RNazolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였으며, 이 혼합 부유액에 chloroform ($CHCl_3$) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 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 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

5) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm 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-1 β 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.086 ± 0.029 , 대조군이 1.020 ± 0.020 로 나타났으며, EGB 추출물 100, 50, 10 μ g/ml 농도에서 각각 0.493 ± 0.051 , 0.721 ± 0.027 , 0.845 ± 0.050 의 RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 (***p*<0.001, ****p*<0.001, **p*<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 1).

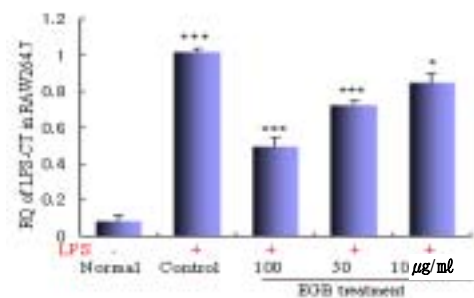


Fig. 1. Effects of EGB extract on IL-1 β mRNA expression in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of EGB extract (100, 50, and 10 μ g/ml) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 μ g/ml) for 6 hrs. IL-1 β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (****p*<0.001). Statistically significant value compared with control by *t*-test (****p*<0.001, **p*<0.05).

2) IL-6 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.315 ± 0.090 , 대조군이 1.073 ± 0.073 로 나타났으며, EGB 추출물 100, 50, 10 μ g/ml 농도에서 각각 0.501 ± 0.023 , 0.667 ± 0.076 , 0.914

± 0.080의 RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 100, 50 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소를 나타내었다(Fig. 2).

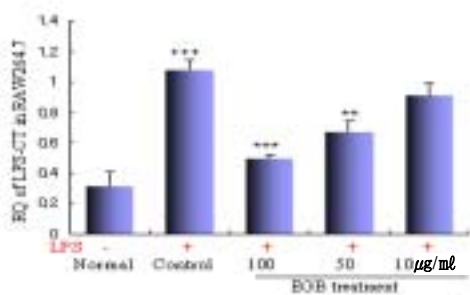


Fig. 2. Effects of EGB extract on IL-6 mRNA expression in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of EGB extract (100, 50, and 10 µg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 µg/ml) for 6 hr. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by *t*-test (***p<0.001, **p<0.01).

3) TNF-α 유전자 발현

RAW 264.7 세포주에서 TNF-α 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.178 ± 0.060, 대조군이 1.043 ± 0.043로 나타났으며, EGB 추출물 100, 50, 10µg/ml 농도에서 각각 0.529 ± 0.004, 0.604 ± 0.057, 1.025 ± 0.147의 RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 100, 50µg/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 0.272 ± 0.043, 대조군이 0.994 ± 0.007로 나타났으며, EGB 추출물 100, 50, 10µg/ml 농도에서 각각 0.654 ± 0.090, 0.799 ± 0.065,

1.521 ± 0.201의 RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 100, 50µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

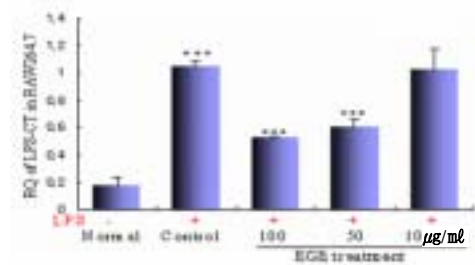


Fig. 3. Effects of EGB extract on TNF-α mRNA expression in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of EGB extract (100, 50, and 10 µg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 µg/ml) for 6 hr. TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by *t*-test (***p<0.001).

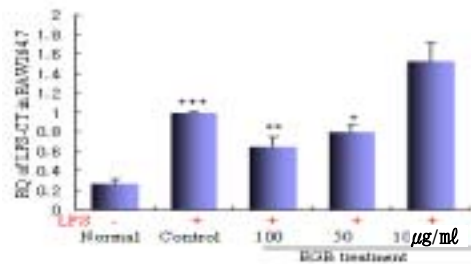


Fig. 4. Effects of EGB extract on COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of EGB extract (100, 50, and 10 µg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 µg/ml) for 6 hr. COX-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by *t*-test (**p<0.01, *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, EGB 추출물 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 0.460 ± 0.098 , 0.511 ± 0.080 , 0.827 ± 0.060 의 RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

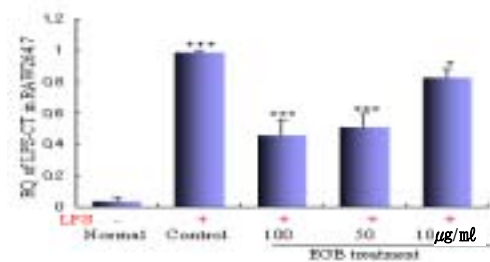


Fig. 5. Effects of EGB extract on NOS-II mRNA expression in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of EGB extract (100, 50, and 10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 6 hr. NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by *t*-test (*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

2. RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokines 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 β 생성량

RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 생성량은 정상군이 38.5 ± 18.2 (pg/ml), 대조군이 701.0 ± 59.4 (pg/ml)로 나타났으며, EGB 추출물 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 549.0 ± 35.4 (pg/ml), 604.5 ± 24.7 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 6).

2) IL-6 생성량

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군이 363.0 ± 77.8 (pg/ml), 대조

군이 6002.0 ± 729.7 (pg/ml)로 나타났으며, EGB 추출물 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 3278.5 ± 358.5 (pg/ml), 4031.5 ± 222.7 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 7).

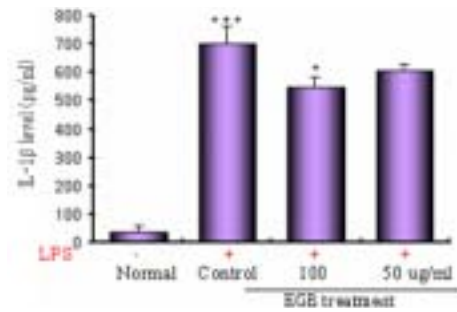


Fig. 6. Effect of EGB extract on the levels of IL-1 β in the RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IL-1 β were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by *t*-test (* $p < 0.05$).

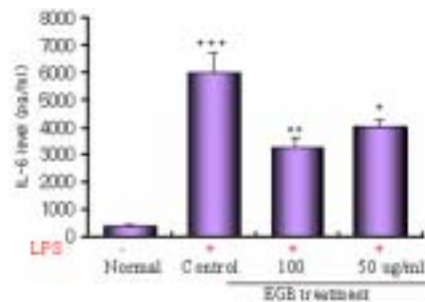


Fig. 7. Effect of EGB extract on the levels of IL-6 in the RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by *t*-test (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

3) TNF- α 생성량

RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 생성량은 정상군이 272.5 ± 81.3 (pg/ml), 대조군이 3243.5 ± 392.4 (pg/ml)로 나타났으며, EGB 추출물 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 1978.5 ± 174.6 (pg/ml), 2353.5 ± 269.4 (pg/ml)로, 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 8).

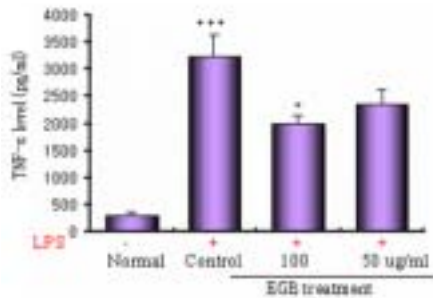


Fig. 8. Effect of EGB extract on the levels of TNF- α in the RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of TNF- α were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t*-test ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by *t*-test (* $p < 0.05$).

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

1) IL-1 β 생성량

혈청 내 IL-1 β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 50.30 ± 11.24 (pg/ml), 대조군은 75.80 ± 0.42 (pg/ml)로 나타났으며, EGB 추출물 투여군은 64.40 ± 2.82 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 억제를 나타내었다(Fig. 9).

2) IL-6 생성량

혈청내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 153.0 ± 12.3 (pg/ml), 대조군은 497.0 ± 0.84 (pg/ml)로 나타났으며, EGB 추출물 투여군은 478.6 ± 7.56 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 억제를 나타내었다(Fig. 10).

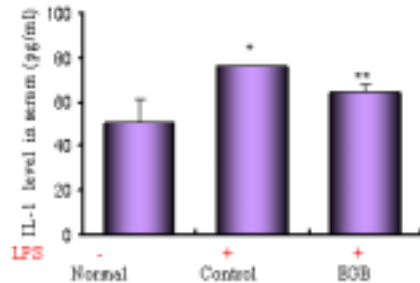


Fig. 9. The effect of EGB extract on IL-1 β production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with EGB extract (8.6 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Total IL-1 β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t*-test ($+p < 0.05$). Statistically significant value compared with control by *t*-test (** $p < 0.01$).

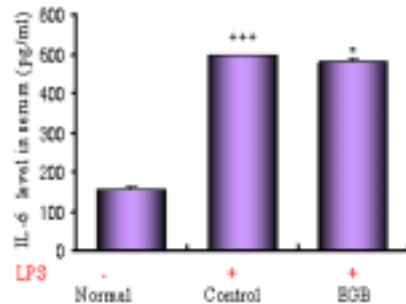


Fig. 10. The effect of EGB extract on IL-6 production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with EGB extract (8.6 mg/20 g) 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 ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by *t*-test (* $p < 0.05$).

4. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간 조직 내 cytokines 에 미치는 영향

1) IL-1 β mRNA 발현량

비장 및 간 조직 내 IL-1 β mRNA 생성량을 측정한 결과, 간 조직에서 정상군은 0.088 ± 0.014 (pg/ml), 대조군은 1.066 ± 0.006 (pg/ml)로 나타난 반면, EGB 추출물 투여군은 0.877 ± 0.113 (pg/ml)로 나타났다. 비장 조직에서 정상군은 0.064 ± 0.010 (pg/ml), 대조군은 0.995 ± 0.006 (pg/ml)로 나타난 반면, EGB 추출물 투여군은 0.595 ± 0.070 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (***) 억제 되었다(Fig. 11).

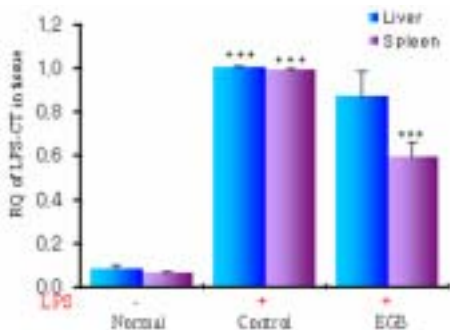


Fig. 11. Effects of EGB extract on IL-1 β mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with EGB extract (8.6 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-1 β mRNA express were measured real-time PCR. Statistically significant value compared with normal data (***P<0.001). Statistically significant value compared with control data (***)P<0.001).

2) IL-6 mRNA 발현량

비장 및 간 조직 내 IL-6 mRNA 생성량을 측정한 결과, 간 조직에서 정상군은 0.196 ± 0.008 (pg/ml), 대조군은 1.051 ± 0.051 (pg/ml)로 나타난 반면, EGB 추출

물 투여군은 0.985 ± 0.217 (pg/ml)로 나타났다. 비장조직에서 정상군은 0.290 ± 0.045 (pg/ml), 대조군은 0.989 ± 0.011 (pg/ml)로 나타난 반면, EGB 추출물 투여군은 0.611 ± 0.063 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게 (***) 억제 되었다(Fig. 12).

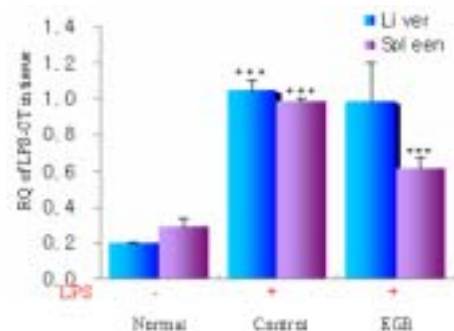


Fig. 12. Effects of EGB extract on IL-6 mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with EGB extract (8.6 mg/20 g) 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). Statistically significant value compared with control data (***)P<0.001).

IV. 고 찰

골반 염증성 질환(Pelvic Inflammatory Disease, PID)은 하부 생식기에 침입한 각종 세균의 상행성 감염을 통하여 子宮, 卵管, 卵巢 및 인접 조직을 침범하는 질환이다⁶⁾.

골반 염증성 질환의 증상은 매우 광범위하며 다양하나 가장 보편적인 증상으로는 양측의 하복부 통증, 내진 시 자궁 경부 운동압통 및 자궁 부속기 압통, 발

열 등이 있고 다른 혼한 증상으로는 비정상적인 질 분비물, 월경과다, 성교후 출혈, 비정상 자궁출혈, 오심 및 구토 등이 있다⁸⁻¹⁰⁾.

이 질환의 위험요소는 젊은 연령, 다수의 성교 상대, 높은 성교 횟수, 골반염의 과거력, 질세척과 자궁내 피임 기구나 골반 기구의 사용 등을 들 수 있는데⁸⁾, 최근 성적 접촉으로 인한 질환 및 자궁내 삽입장치 사용의 증가로 해마다 이에 대한 이환율이 높아지고 있다^{29,30)}.

골반내 염증성 질환은 대부분 급성 질환으로 발현되므로 초기에 정확한 진단과 항생제 투여 등으로 완화 혹은 치료되나, 최근 항생제 남용으로 불응성 혹은 재발성 만성 골반 염증성 질환이 점차 증가 추세에 있어 사회적으로 문제가 되고 있으며, 이러한 골반염은 재발감염, 자궁외 임신, 불임증, 골반내 유착, 골반농양, 재발성 골반동통 등의 후유증을 유발하여 심각한 문제를 야기하고 있다^{6,9,13,14,30)}.

한의학 고전에서는 産後發熱, 帶下, 經病疼痛, 婦人腹痛, 熱入血室, 月經不調, 癥瘕, 不妊^{7,15-20)} 등의 증상과 관련이 있으나, 골반 염증성 질환에 대한 명확한 인식이 없었으며 宋³¹⁾은 邪客子門에서 이를 다루고 있다. 또한 申¹⁰⁾은 本病의 발생 원인을 유산, 분만, 수술후 毒邪의 감염으로 인하여 濕毒이 胞脈을 막고 있어서 氣血과 相搏하다가 蘊結되거나, 평소에 濕熱이 下焦에 蘊積되어 있어서 氣血을 막아 형성된다고 하였다. 이외에 급성 골반염은 熱毒^{18,20)}, 濕熱^{16,18-20)}, 瘀結^{19,20)} 등이, 만성 골반염은 濕熱^{16,19,20)}, 氣滯血凝¹⁸⁻²⁰⁾, 寒濕^{18,19)} 등의 邪毒이 胞脈에 침입하여 발생한 것으로 본다. 그리고 이와 관련하여 《婦人良方大全·婦

人腹中瘀血論》²¹⁾에 “婦人月經痞塞不通, 或産後餘穢未盡 …… 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.

급성 골반염의 치료가 부적절했을 때 전변되어 발생하는 만성 골반염은 병정이 길고 재발 확률이 높다. 만성 골반염은 염증성 소견이 미미하거나 없기 때문에 치료 목표를 痛症과 不妊에 두고 치료하지만, 여러 종류의 항생제 치료에도 耐性이 생겨 완치가 되지 않고 계속 再發하므로 그 치료 효과를 기대할 수 없는 반면에, 한의학적인 治療에서는 급성보다는 만성에 대한 치료법이 많이 보고되고 있다³²⁻³⁴⁾.

銀甲方은 《實用中醫婦科學》¹⁾에 수록된 처방으로 구성약물의 효능을 살펴보면, 金銀花는 清熱解毒, 治癰腫疔瘡, 涼散風熱하며, 連翹는 清熱解毒, 消腫散結, 治癰疽, 瘰癧, 乳癰한다. 蒲公英은 清熱解毒, 消腫散結, 治疔瘡腫, 毒乳癰瘰癧하며, 椿根皮는 清熱燥濕, 收澁止帶, 止血한다. 大靑葉은 清熱解毒, 涼血消癥, 治溫邪入營發癍發疹하며, 升麻는 發表透疹, 清熱解毒, 升舉陽氣한다. 茵陳은 清利濕熱하며, 蒲黃은 收澁止血, 行血祛瘀한다. 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡하며, 鱉甲은 滋陰潛陽, 軟堅散結한다. 桔梗은 宣肺利咽, 祛痰排膿하며, 紫花地丁은 清熱解毒, 涼血消腫한다. 琥珀은 鎮驚安神, 散瘀止血, 利水通淋한다²⁻⁵⁾.

羅¹⁾는 만성 골반염을 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, 銀甲方은 清熱解毒, 消

腫散結, 利濕 작용²⁻⁵⁾이 있는 金銀花, 連翹, 蒲公英, 椿根皮, 大青葉, 升麻, 茵陳, 紫花地丁과 行血祛瘀 散瘀止血 작용²⁻⁵⁾이 있는 蒲黃, 鷄血藤, 琥珀 및 滋陰潛陽 軟堅散結 작용²⁻⁵⁾이 있는 鱉甲, 그리고 祛痰排膿 작용²⁻⁵⁾이 있는 桔梗으로 구성되어, 淸熱利濕, 祛瘀散結, 祛痰排膿하는 효능이 있으므로 만성 골반염 중에서도 濕熱壅阻와 瘀血로 인한 實證의 만성 골반염에 활용되었다.

銀甲方이외에 만성 골반염에 紅藤敗醬散, 淸熱解毒化瘀湯, 利濕解毒湯加減方 등이 활용²²⁾ 되고 있으며, 항염증 작용에 대한 실험적 연구로 康寧湯²³⁾, 行經紅花湯²⁴⁾, 淸熱解毒加鷄血藤²⁵⁾ 등이 부인과 영역의 염증 질환에 효과가 있음이 보고되었다. 銀甲方 구성 약물 중 본 실험과 관련한 실험 보고로 문³⁵⁾은 金銀花, 김³⁶⁾은 連翹, 강³⁷⁾은 茵陳에 대한 항염증 효능을 보고 한 바가 있으며, 李²⁶⁾는 銀甲方加減이 항혈전 작용이 있음을 보고하였다. 또한 현대의학에서도 혈전과 염증의 병리적 단계에서 일정 부분에 있어 생화학적으로 동일한 기전으로 작용한다는 연구 등이 보고^{27,28)}된 바 있기 때문에 銀甲方이 염증에 유효하리라 사료되어 본 연구에 착수하였다.

본 연구에서는 銀甲方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-6의 생성량과 비장, 간 조직 내 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현량을 측정 하였다.

염증 반응은 항원에 의해 활성화된 면

역 세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역 반응이다. 면역 세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부 물질에 노출되면 면역 세포가 활성화된다. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokines 중 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식 세포에서 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 면역 반응, 급성기 반응과 hematopoiesis를 조절하는 역할과 함께 host defense mechanism에서 중요한 역할을 담당 한다^{38,39)}. TNF- α 는 대식 세포와 비만 세포 등에서 분비되어 종양 세포에서 세포독 작용을 하며, 염증세포에서 IL-1 β 와 유사한 염증 유발 작용, 세포의 증식 및 분화를 조절하고 만성 염증이나 감염에서도 역할을 하며, 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시켜 염증 반응에서 중요한 역할을 한다. 특히 TNF- α 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하며, 최근에는 TNF- α 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다⁴⁰⁻⁴²⁾. 또한 용모 양막염에서의 IL-6 및 TNF- α 의 증가⁴³⁾, proinflammatory - cytokines 중 IL-6 및 TNF- α 가 초기 급성 염증 시 증가⁴⁴⁾, 여성의 감염 시 procytokines의 증가⁴⁵⁾ 등의 다양한 보고가 있어 염증과 면역 반응에 있어서 IL-6과 TNF- α 의 조절이 중요하다고 할 수 있다.

銀甲方の 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 EGB 추출물 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 1). RAW 264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은 EGB 추출물 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.01$) 감소를 나타내었다 (Fig. 2). RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현 RQ 값은 EGB 추출물 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig. 3).

Nitric oxide(NO)는 생체 내 혈관에서 강력한 혈관확장 작용, 신경전달, 혈액응고, 면역기능, 항균작용 등을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관 내피세포에 부착하는 것을 막는 등의 역할을 한다. 생체 내에서 NO의 전구물질은 L-arginine으로서 nitric oxide synthesis(NOS)의 작용으로 L-arginine이 산화되면 L-citrulline과 NO를 생성하게 된다. NO자체는 매우 불안정한 라디칼기로서 생성 된지 수초 이내에 nitrite 또는 nitrate로 산화된다. NOS는 일종의 산화 효소로서 혈관 내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS 및 유도성 NOS(이하 iNOS)의 세 가지 아형으로 존재한다. 혈관 내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS는 활성화 하는데 칼슘과 calmodulin이 필요하며 지속적으로 분비되는 반면 iNOS는 칼슘과 무관하게 활성화되며 염증성 cytokine이나 LPS등에 반응하여 분비된다⁴⁶⁾. NO와 PG 그리고 이들과 관련된 두 효소, NOS와 COX-2는 염증반응의 단계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있

다. 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 있다⁴⁷⁾.

RAW 264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현과 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향에서는 RAW 264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현 RQ 값은 EGB 추출물 100, 50, $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 4). RAW 264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현 RQ 값은 EGB 추출물 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

RAW 264.7 세포주에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 측정 한 결과, IL-1 β 생성량은 EGB 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 6). RAW 264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 EGB 추출물 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 7). RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 생성량은 EGB 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청내 cytokines 에 미치는 영향을 알아보기 위해, 혈청 내 IL-1 β , IL-6의 생성량을 측정 한 결과, 혈청 내 IL-1 β 생성량은 EGB 추출물 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 억제 되었으며

(Fig. 9), 혈청 내 IL-6 생성량은 EGB 추출물 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 (* $p < 0.05$) 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 10). 그리고 비장 및 간 조직 내 IL-1 β , IL-6 mRNA 유전자 발현을 측정 한 결과, 간 조직에서 IL-1 β mRNA 유전자 발현은 대조군에 비해 유의성이 없었고, 비장 조직에서는 EGB 추출물 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 (** $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 11). IL-6 mRNA 유전자 발현은 간 조직에서는 EGB 추출물 투여군은 대조군에 비해 유의성이 없었고, 비장 조직에서 EGB 추출물 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 (** $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 12).

이상의 실험적 연구 결과, 銀甲方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-6의 생성을 유의성 있게 억제하였으며, 생쥐의 비장 조직 내 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현을 유의성 있게 억제함으로써 다양한 면역 조절 작용을 통한 항염증 효과가 실험적으로 입증되었으니 부인과 질환에서 골반염 등에 활용되면 유용하리라고 사료된다.

V. 결 론

銀甲方의 항염증 작용에 대한 기전을 명확히 하기 위하여 RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokine의 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향, 급성 염증성 질

환 생쥐모델의 혈청 내, 비장 및 간 조직 내 cytokine에 미치는 영향 등을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 銀甲方은 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 IL-1 β , NOS-II 유전자 발현을, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 IL-6, TNF- α 및 COX-2 유전자 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
2. 銀甲方은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 IL-1 β , TNF- α 생성량을, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 IL-6 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 銀甲方은 급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-1 β , IL-6의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.
4. 銀甲方은 급성 염증이 유발된 생쥐의 비장 조직내 IL-1 β , IL-6 mRNA 발현을 유의성 있게 억제하였다.

이상의 실험 결과, 銀甲方의 항염증 효과가 실험적으로 입증되어, 임상에서 骨盤炎을 비롯한 염증성 질환에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

□ 투 고 일 : 2009년 7월 28일

□ 심 사 일 : 2009년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2009년 8월 10일

참고문헌

1. 羅元愷. 實用中醫婦科學. 上海:上海科學技術出版社. 1994:256-9.
2. 전국한의학대학교본 本草學教授 共編. 本草學. 서울:永林社. 1991:151, 198, 199, 201-4, 328, 401, 493.

3. 김기의. 국시 本草學. 서울:군자출판사. 2006:24, 61-5, 164, 235, 269, 282, 405, 421, 310.
4. 陶御風. 臨證本草. 北京:人民衛生出版社. 2005:50-3, 124-36, 212-5, 339-44, 355-8, 504-7.
5. 凌一揆. 中藥 本草學. 서울:保健新聞社. 1998:195, 237, 239-40, 242-3, 360-1, 470-1, 498, 536-7, 581-2, 713, 726.
6. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈서적. 1997:165-75, 264-81, 518.
7. 한의부인과학편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울:정담출판사. 2001:266-80.
8. 서울대학교 출판부. 가정의학. 서울:서울대학교출판부. 2001:490-5.
9. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울:고려의학. 2007:153-5.
10. 申天浩. 問答式 부인소아과학. 서울:成輔社. 1992:330-2.
11. 姜明孜. 臨床婦產科學. 서울:成輔社. 1989:193-201.
12. Westrom L. Incidence, Prevalence, and trends of acute pelvic inflammatory disease and its consequences in industrialized countries. *Am J. Obstet Gynecol.* 1980;138:880-92.
13. 최유덕. 새임상 부인과학. 서울:고려의학. 2001:381-95.
14. 宋美蘭. 골반내 염증 질환을 호소하는 가임기 여성에서의 질초음파 및 전산화 단층 촬영의 진단적 유용성. 전북대학교 대학원. 2008.
15. 司徒儀 등. 婦科專病 中醫臨床論治. 北京:人民衛生出版社. 2001:224-64.
16. 夏桂成. 中醫臨床婦科學. 北京:人民衛生出版社. 2007:283-93.
17. 조숙춘. 동의임상부인과학. 서울:법인문화사. 1999:107-54, 582-8.
18. 安崇辰. 中國女性醫學. 北京:中國中醫藥出版社. 2006:359-69.
19. 劉敏如. 中醫婦產科學. 北京:人民衛生出版社. 2007:841-52.
20. 王惠珍. 婦科辨病專方治療叢書. 北京:人民衛生出版社. 2000:214-21.
21. 陳自明. 婦人良方大全. 北京:文光圖書有限公司. 1982:7:34.
22. 김정현, 이태균. 골반염에 관한 문헌적 고찰. *한방부인과학회지.* 1994;7(1):31-46.
23. 송미선. 康寧湯의 經口와 直腸投與의 抗炎症 效果 比較研究. *대한한방부인과학회지.* 2003;16(3):147-61.
24. 민병호. RAW 264.7 세포주와 염증 생쥐모델에서 抗炎症 作用에 대한 行經紅花湯의 效果. *대한한방부인과학회지.* 2005;18(4):36-53.
25. 한충희. RAW 264.7 세포주와 염증 생쥐모델에서 抗炎症 작용에 대한 清熱活血湯加鷄血藤의 效果. *대한한방부인과학회지.* 2005;18(3):92-109.
26. 이수정. 銀甲方加減이 血栓 病態 有關 因子와 酸化的 損傷에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지.* 2008;21(2):125-51.
27. Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2002; 88:554-67.
28. Wakefield TW, Henke PK. The role of inflammation in early and late venous thrombosis: Are there clinical implications? *Semin Vasc Surg.* 2005; 18(3):118-29.
29. 權赫璨. 여성의 골반 염증과 불임. *대한의사협회지.* 1999;42(9):868-74.

30. 민혜원. 여성 골반 염증성 질환의 치료에 있어서 Cefbuperazone 의 임상효과. 대한산부회지. 1994;37(5):941-5.
31. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:행림출판. 1998;451.
32. 王淑雲. 內外合治盆腔炎36례. 遼寧中醫雜誌. 1993;12:30.
33. 반혜란. 만성 골반염에 대한 治驗1例 보고. 대한한방부인과학회지. 2007;20(2): 206-13.
34. 金楨洙. 骨盤炎症性疾患을 유발하는 Neisseria gonorrhoeae 菌의 生育을 抑制하는 韓藥材 探索에 關한 研究. 대한한방부인과학회지. 1995;8(1):63-8.
35. 문태철. 금은화 플라보노이드성분의 항염증작용. 대한약학회지. 1999;43(1): 117-23.
36. 김성윤. 연교 추출물의 Microglia에서 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성 억제 효과. 대한본초학회지. 2008; 23(3):93-102.
37. Seong Yeob Kang. Effect of Artemisiae Capillaris Herba on Anti-inflammatory Properties in RAW 264.7 Cell Line. Korea J. Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(6):1832-42.
38. 김세중. 면역학길라잡이. 서울:고려의학. 2000:65-8.
39. 홍천수 역. Pathophysiology로 이해하는 내과학. 서울:도서출판 정담. 2002:10-2.
40. 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;132:414-22.
41. 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: 4126-7.
42. 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):894-7.
43. Henrik D. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-cytokines and cytokine inhibitors. An International Journal of Obstetrics and Gynecology. 2002;109:534-9.
44. Matthias W. Role of cytokines and other inflammatory mediators. An International Journal of Obstetrics and Gynecology. 2003;110:118-23.
45. Charles N et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2003;188(5):1174-6.
46. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아프트시스에 미치는 영향. 대한산부인과학회지. 2002; 45(5):766-73.
47. 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.