대한한방부인과학회지 pISSN 1229-4292 / eISSN 2508-3619
J Korean Obstet Gynecol. VOL.32 NO.3 : 032-056 (2019)
https://doi.org/10.15204/jkobgy.2019.32.3.032

帶下 처방 3종의 항염, 항소양, 항균 효능에 관한 실험 연구 : 銀花瀉肝湯, 少腹逐瘀湯, 完帶湯

[1]열린부부한의원, [2]상쾌한365한의원, [3]동신대학교 한의과대학 한방부인과교실
이은규[1], 박찬욱[2], 김수현[3], 최유진[3], 박경미[3], 양승정[3], 조성희[3]

ABSTRACT

An Experimental Study on the Anti-inflammatory, Anti-pruritic and Anti-microbial Effects of the Three Herbal Prescription: *Eunhwasagan-tang* (EST), *Sobokchukeo-tang* (SCT), *Wandae-tang* (WDT)

Eun-Kyu Lee[1], Chan-Wook Park[2], Soo-Hyeon Kim[3], Yoo-Jin Choi[3], Kyung-Mi Park[3], Seung-Jeong Yang[3], Seong-Hee Cho[3]
[1]Yeollin-bubu Korean Medical Clinic, [2]Fresh-365 Korean Medical Clinic
[3]Dept. of Korean Gynecology and Obstetrics, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

Objectives: The purpose of this study was to investigate the *in vitro* anti-inflammatory, anti-pruritic and antimicrobial effects of the three herbal prescription (EST, SCT, WDT), which has been traditionally used for treating leukorrhea induced by various infections in the female genital tract.

Methods: In this experiment, the anti-inflammatory effects were evaluated by Nitric oxide (NO), Interlukine-1β (IL-1β), Interlukine-2 (IL-2), Interlukine-6 (IL-6), Tumor necrosis factor-α (TNF-α), Prostaglandin E_2 (PGE_2), Leukotriene B_4 (LTB_4) production amount and Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Nuclear factor kappa B (NF-κB), Cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression levels in RAW264.7 cells. And the anti-pruritic effects were evaluated by Histamine, Acetylcholine (ACh), Acetylcholinesterase (AChE), Substance P production amount in Mast cell/9 (MC/9) and Pheochromocytoma 12 (PC12) cells. The anti-microbial effect was measured by inhibition zone diameter on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*.

Results: As a result of measuring anti-inflammatory efficacy, IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, PGE_2, and LTB_4 production amounts were significantly reduced in the EST, SCT, WDT extraction groups compared with the control group, and significantly decreased the amount of NF-κB, iNOS, and COX-2 gene expression and the amount of Phospho-Inhibitor kappa B alpha (p-IκB-α)/Inhibitor kappa B alpha (IκB-α) and NF-κB p65 protein expression. In addition, As a result of measuring the anti-pruritic effect, the amounts of histamine, ACh and Substance P were significantly decreased, and AChE production was slightly decreased, but it's significance did not appear. Finally the anti-microbial effects of EST, SCT, WDT extraction groups against *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* was inhibited, however the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was not inhibited.

Conclusions: These data suggest that EST, SCT, WDT can be used to treat patients with leukorrhea.

Key Words: *Eunhwasagan-tang* (EST), *Sobokchukeo-tang* (SCT), *Wandae-tang* (WDT), Anti-inflammatory, Anti-pruritic, Anti-microbial

Corresponding author(Seong-Hee Cho) : Korean Hospital of Dong-Shin University, 141 Wolsan-ro, Namgu, Gwangju
Tel : 062-350-7213 E-mail : drlmp72@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

帶下는 여성 성기의 분비물을 통틀어 이르며, 여성 생식기의 병변 여부와 양상을 알 수 있는 직관적인 증거로 부인과 임상 진단 상 중요한 자료가 된다. 정상 상태의 여성생식기 점막은 분비물로 적셔져 있으며 대개의 경우 질 밖으로 배출되지 않으나 분비물의 양이 과다하거나, 性狀, 色調, 臭氣에 이상이 있고 기타 음부 자극증상을 동반하는 경우 내생식기의 염증과 연관되어 있는 경우가 많다[1,2]. 주로 질염, 자궁경관염, 난관염, 난소염 등의 질환에서 나타나며[1], 원인균은 각종 세균, 트리코모나스(*Trichomonas*), 칸디다(*Candida albican*), 임균(*Neisseria gonorrheae*), 클라미디아(*Chlamydia trachomatis*) 등이 대부분이며 질염 및 자궁경관염의 치료에 준하여 균종에 따른 적절한 항생제 및 항진균제를 투여한다[3].

한의학에서는 風冷, 寒濕, 濕熱, 濕痰, 食毒, 七情, 瘀血 등의 원인으로 脾腎虛하여 任帶脈이 약해지고 견고하지 못하게 되면 水濕이 생식기로 下注하여 帶下가 발생한다고 보고 辨證에 따라 完帶湯, 內補丸, 知柏地黃湯加味, 止帶方, 五味消毒飮 등을 활용한다[1,4].

肝經濕熱로 인한 여성생식기의 염증성 질환에 널리 활용되고 있는 銀花瀉肝湯은 龍膽瀉肝湯에 金銀花, 牧丹皮와 玄胡索을 配伍하여 消炎, 散瘀, 抗菌, 鎭痛 작용을 한층 강화시킨 처방으로서[5-7] 항암 및 면역증강 효과[7], 소염・진통・해열・진정・이뇨・항균・항산화 효과[8] 등이 보고되어 있다. 少腹逐瘀湯은 少腹 積塊疼痛脹滿, 經血 接連不斷 粉紅兼白帶를 치료할 목적으로 王淸任이 創方하였으며[9] 항혈전 및 소염, 진통 효과[10] 등이 보고되어 있다. 完帶湯은 補中健脾 化濕止帶하는 대표적인 固崩止帶方으로[11] 이뇨, 소염, 항균 효과[8], *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균 효과 및 Clindamycin과의 병용 효과[12] 등이 보고되어 있다.

이에 銀花瀉肝湯, 少腹逐瘀湯, 完帶湯의 현재까지 밝혀진 이러한 효능이 여성생식기의 염증으로 유발된 帶下를 치료하는데 적합하다고 생각되었으나 처방별 항염, 항소양, 항균 효과에 대한 실험적 비교 연구는 아직 접하지 못하였다.

본 연구자는 帶下 처방인 銀花瀉肝湯(*Eunhwasagan-tang*, EST), 少腹逐瘀湯(*Sobokchukeo-tang*, SCT), 完帶湯(*Wandae-tang*, WDT)의 항염, 항소양, 항균 효능을 *in vitro*에서 알아보기 위하여 RAW264.7 세포, MC/9 세포, PC12 세포를 사용하였다. 세포생존율을 측정하여 세포독성 여부를 판별한 후 Nitric Oxide(NO), Cytokine, Prostaglandin E_2(PGE_2), Leukotriene B_4(LTB_4)의 생성량과 유전자 발현량을 측정하고 Immunoblot 분석을 통해 항염 효능을 평가하였고, Histamine, Acetylcholine (ACh), Acetylcholinesterase(AChE), Substance P 생성량을 측정하여 항소양 효능을 평가하였으며, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*의 생장억제환 크기를 측정하여 항균 효능을 평가하여 유효한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 EST[5], SCT[9], WDT[11]

의 구성 약재들은 ㈜옴니허브에서 구입하여 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터에서 정선 후, 사용하였고, 각 1첩의 내용 및 분량은 다음과 같다(Table 1, 2, 3).

Table 1. The Composition of *Eunhwasagan-tang*

Herbal name	Pharmacognostic name	Dose (g)
金銀花	*Lonicerae Flos*	12
龍膽草	*Gentianae Scabrae Radix et Rhizoma*	4
柴 胡	*Bupleuri Radix*	4
澤 瀉	*Alismatis Rhizoma*	4
木 通	*Akebiae Caulis*	4
車前子	*Plantaginis Semen*	4
赤茯苓	*Poria Sclerotium*	4
生地黃	*Rehmanniae Radix*	4
當 歸	*Angelicae Gigantis Radix*	4
牧丹皮	*Moutan Radicis Cortex*	2.8
玄胡索	*Corydalis Tuber*	2.8
梔 子	*Gardeniae Fructus*	2
黃 芩	*Scutellariae Radix*	2
甘 草	*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*	2
	Total	55.6

Table 2. The Composition of *Sobokchukeo-tang*

Herbal name	Pharmacognostic name	Dose (g)
當 歸	*Angelicae Gigantis Radix*	12
蒲 黃	*Typhae Pollen*	12
赤芍藥	*Paeoniae Radix*	8
五靈脂	*Trogopterorum Faeces*	8
沒 藥	*Myrrha*	4
肉 桂	*Cinnamomi Cortex*	4
川 芎	*Cnidii Rhizoma*	4
玄胡索	*Corydalis Tuber*	4
小茴香	*Foeniculi Fructus*	3
乾 薑	*Zingiberis Rhizoma*	0.8
	Total	55.8

Table 3. The Composition of *Wandae-tang*

Herbal name	Pharmacognostic name	Dose (g)
白 朮	*Atractylodis Rhizoma Alba*	30
山 藥	*Dioscoreae Rhizoma*	30
白芍藥	*Paeoniae Radix*	15
車前子	*Bupleuri Radix*	9
蒼 朮	*Atractylodis Rhizoma*	9
人 蔘	*Ginseng Radix*	6
甘 草	*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*	3
柴 胡	*Bupleuri Radix*	1.8
陳 皮	*Citri Unshius Pericarpium*	1.5
荊芥穗	*Schizonepetae Spica*	1.5
	Total	55.6

2) 시 약

사용된 시약은 dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM : Gibco BRL, U.S.A.), fetal bovine serum(FBS : Gibco BRL, U.S.A.), horse serum(Gibco BRL, U.S.A.), penicillin-streptomycin(Sigma, U.S.A.), 2-mercaptoethanol(Gibco BRL, U.S.A.), L-glutamine(Gibco BRL, U.S.A.), T-stim (Corning, U.S.A.), trypan blue(Sigma, U.S.A.), EZ-Cytox(Daeilab, Korea), lipopolysaccharide (LPS : Sigma, U.S.A.), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA : Sigma, U.S.A.), ionomycin (Sigma, U.S.A.), nerve growth factor(NGF : Sigma, U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS : Welgene, Korea), 2′,7′-Dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA : Sigma, U.S.A.), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore, U.S.A.), PGE_2 Parameter Assay Kit(R&D systems Co., U.S.A.), LTB_4 Parameter Assay Kit(R&D systems Co., U.S.A.), Total RNA prep kit(Intronbio,

Korea), AccuPower CycleScript RT PreMix (Bioneer, Korea), SYBR Green(Qiagen, Germany), DEPC-DW(Bioneer Co., Korea), lysis buffer(Intronbio, Korea), BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), tris-buffered saline with Tween20(TBST : Intronbio, Korea), IκB-α Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, U.S.A.), phospho-IκBα Rabbit mAb(Cell Signaling Technology, U.S.A.), anti-NF-κB P65 antibody(abcam, U.K.), anti-β-actin antibody(abcam, U.K.), goat anti-rabbit IgG(abcam, U.K.), western ECL blotting substrates(BIO-RAD, U.S.A.), histamine ELISA Kit(MyBioSource, U.S.A.), acetylcholine ELISA Kit(MyBioSource, U.S.A.), acetylcholinesterase ELISA Kit (MyBioSource, U.S.A.), substance P ELISA Kit(MyBioSource, U.S.A.), nutrient agar (NA : Difco, USA), yeast malt(YM : Difco, USA), bacto agar(Difco, USA) 등을 사용하였다.

3) 기 기

사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), HPLC (Shimadzu, Co., Japan), CO_2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific, Korea), autoclave(Sanyo, Japan), vortex mixer(Vision scientific, Korea), centrifuge(Hanil, Korea), deep-freezer (Sanyo, Japan), ice-maker(Vision scientific, Korea), flow cytometer(Becton Dickinson, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), luminex(Millipore, U.S.A.), micro plate reader(Molecular Devices, U.S.A.), flow cytometer(Becton Dickinson, U.S.A.), Nanodrop(Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), Alpha Cycler 1 PCRmax(PCRmax, U.K.) real time PCR(Qiagen, Germany) Electrophoresis Chambers(BIO-RAD, U.S.A.), Fusion FX (Vilber Lourmat, France) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

EST, SCT, WDT의 각 1첩 분량에 1000 ml의 증류수를 넣어 3시간 동안 환류추출하였으며, 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축 후, freeze dryer로 농축액을 동결 건조하였다. EST는 10.4 g(수율 18.7%), SCT는 11.1 g(수율 19.9%), WDT는 24.9 g(수율 23.3%)의 분말을 획득하여 초저온 냉동고(-80℃)에서 보관하면서 필요에 따라 증류수에 희석하여 농도를 조절하여 사용하였다.

2) 세포 배양

RAW264.7 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% penicillin-streptomycin으로 구성된 DMEM 배지를 사용하였고 MC/9 세포는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 10% T-Stim으로 구성된 DMEM 배지를 사용하였으며, PC12 세포는 10% horse serum과 5% FBS로 구성된 DMEM 배지를 사용하였다. 모든 세포들은 세포배양기에서 37℃, 5% CO_2 환경이 유지된 상태에서 배양하였으며, 2-3일 주기로 계대 배양하였다.

3) 세포생존율 측정

RAW264.7 세포는 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하였고 MC/9 세포는 48 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하였으며, PC12 세포는 collagen으로 코팅된 48 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주

하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 각각의 시료를 50, 100 μg/ml의 농도로 처리하여 RAW264.7 세포는 24시간, MC/9 세포와 PC12 세포는 48시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 끝난 후, 배양액 100 μl당 EZ-Cytox 용액 10 μl를 첨가하여 30분간 세포배양기에서 반응시켰다. 반응 후, 450 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 백분율로 대조군에 대한 세포 생존율을 나타내었다.

4) 항염증 효능평가

(1) NO 생성량 측정

96 well plate에 RAW264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50, 100 μg/ml 농도의 시료와 1 μg/ml의 LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50 μl의 N1 buffer를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응시킨 후, 50 μl의 N2 buffer를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후, 540 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 백분율로 대조군에 대한 NO 생성량을 나타내었다.

(2) Cytokine 생성량 측정

12 well plate에 RAW264.7 세포를 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50, 100 μg/ml 농도의 시료와 1 μg/ml의 LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 5분간 1200 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 25 μl씩 분주하고 assay buffer, matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각각 25 μl씩 가하여 혼합하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 washing 완충 용액을 사용하여 2회 세척하였다. 세척 후, detection antibody를 25 μl 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시키고 추가로 Streptavidin-Phycoerythrin을 25 μl 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 washing 완충 용액을 사용하여 2회 세척하였다. 세척 후, PBS를 150 μl 가하여 5분간 shaking한 후, Luminex를 이용하여 측정하여 절대 값으로 나타내었다.

(3) PGE_2, LTB_4 생성량 측정

12 well plate에 RAW264.7 세포를 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50, 100 μg/ml 농도의 시료와 1 μg/ml LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 1200 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 100 μl씩 분주하고 37℃에서 90분간 반응시켰다. 반응 후, washing buffer를 이용하여 3회 세척한 후, detection antibody를 100 μl 가하여 다시 37℃에서 60분간 반응시키고 세척하였다. 세척 후, HRP conjugate를 100 μl씩 가하여 37℃에서 30분간 반응시키고 세척한 뒤 다시 substrate reagent를 90 μl씩 가하여 37℃에서 15분간 반응시키고 stop solution을 50 μl 추가하여 ELISA reader기를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준으로 하여 절대 값으로 나타내었다.

(4) 유전자 발현량 측정

① RNA 추출

6 well plate에 RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50, 100 μg/ml 농도의 시료와 1 μg/ml LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후, 1200 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 RAW264.7 세포에 easy blue 1 ml와 chloroform 200

μl를 넣고 vortexing 해준 후, 13000 rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리 해준다. 상층액 400 μl를 binding buffer 400 μl와 1분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 반응액 700 μl를 column에 주입하여 30초 동안 13000 rpm에서 원심분리 한다. Column에 700 μl의 washing buffer A를 넣고 30초 동안 13000 rpm에서 원심분리한 후, 700 μl의 washing buffer B를 넣고 동일하게 원심분리 한다. Column 하단을 Ep tube로 교체한 뒤, column에 50 μl의 elution buffer를 넣고 1분 동안 반응시킨 뒤 1분 동안 13000 rpm에서 원심분리하여 추출된 total RNA를 모은다.

② cDNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture(reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT15 primer)를 사용하여 total RNA가 1 μg이 되도록 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수에 최종 부피가 20 μl가 되도록 첨가하였다. 이 반응 혼합액을 잘 섞은 후 45℃에서 60분간 반응시켜서 first-strand cDNA를 합성한 뒤, 95℃에서 5분간 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후, 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

③ 유전자 증폭

합성이 끝난 cDNA를 증폭시키기 위하여 real-time PCR을 진행하였으며, real-time 전용 tube에 cDNA 1 μl, 각 primer 2 μl, SYBR Green 10 μl, DEPC-DW 5 μl씩을 넣었다. 이후 94℃에서 5분 동안 반응한 다음 94℃에서 15초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초를 총 40회 반복하여 진행하였다. 유전자 발현량은 대조군에 비하여 계산하였으며, 사용된 primer의 sequence는 Table 4와 같다.

Table 4. The Sequences of Primers

Primer	F/R*	Sequences
NF-κB	F	GGATCACATTTGCTTTGTGTTGTT
	R	CACAACTTACAGTAGATGGCTAGAAAGG
iNOS	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA
	R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
COX-2	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT
	R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG
GAPDH	F	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

* F : forward, R : reverse

(5) Immunoblot 분석

① 단백질 분리 및 정량

6 well plate에 RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50, 100 μg/ml 농도의 시료와 1 μg/ml LPS를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후, 1200 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 RAW264.7 세포에 lysis buffer(10 mM Tris-HCl [pH 7.6], 140 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 2% β-mercaptoethanol, 10 μg/ml pepstatin A and 10 μg/ml aprotinin)를 넣고 4℃에서 15분간 방치하였다. 방치 후, 13000 rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리 하여 상층액을 얻었으며, BCA protein assay kit를 이용하여 상층액의 단백질을 정량

하였다.

② 전기영동 및 immunoblot

정량한 단백질을 20 μg씩 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 단백질을 분리시킨 후, PVDF membrane에 분리한 단백질을 transfer하였으며, 비 특이적인 단백질을 blocking하기 위해 5% skim milk에 담가 4℃에서 90분 동안 방치하였다. 이후, membrane을 TBST로 세척하고 희석한 IκB-α(1:1000), p-IκB-α (1:1000), NF-κB P65(1:1000), β-actin (1:1000) antibody에 담가 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST로 세척하고 희석한 goat anti-rabbit IgG(1:1000) antibody에 담가 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, western ECL blotting substrates를 처리하고 Fusion FX을 통해 단백질 발현량을 측정하였다.

5) 항소양증 효능평가

(1) Histamine 생성량 측정

12 well plate에 MC/9 세포를 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50, 100 μg/ml 농도의 시료와 50 ng/ml PMA, 0.5 uM ionomycin을 함께 처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 5분간 1200 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 100 μl씩 넣고 37℃에서 120분간 반응시켰다. 반응 후, washing buffer를 사용하여 3회 세척을 진행하고 Biotin-conjugate를 100 μl씩 넣어 다시 37℃에서 60분간 반응시켰다. 다시 세척을 진행하고 Streptavidin-HRP를 100 μl씩 넣어 37℃에서 30분간 반응시켰다. 마지막 세척을 진행하고 substrate solution을 100 μl씩 넣어 37℃에서 15분간 반응시켰다. 반응 후, 50 μl의 stop solution을 추가하여 ELISA reader기를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준으로 절대 값으로 나타내었다.

(2) Acetylcholine, acetylcholinesterase, substance P 생성량 측정

Collagen으로 코팅된 12 well plate에 PC12 세포를 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 50, 100 μg/ml 농도의 시료와 50 ng/ml NGF를 함께 처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 이후, 배양액을 1200 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 100 μl씩 넣고 conjugate를 50 μl씩 추가하여 37℃에서 60분간 반응시켰다. 반응 후, washing buffer를 사용하여 5회 세척 작업을 진행하고 substrate A와 B를 각각 50 μl씩 넣어 37℃에서 15분간 반응시켰다. 마지막으로 stop solution을 50 μl 추가하여 ELISA reader기를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준으로 절대 값으로 나타내었다.

6) 항균 효능평가

식약처 공시 균주인 대장균 *Escherichia coli*(*E. coli*), 그람 양성균 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*), 그람 음성균 *Pseudomonas aeruginosa*(*P. aeruginosa*), 진균인 *Candida albicans*(*C. albicans*), *Aspergillus niger* (*A. niger*) 5종류로 항균 효능을 측정하였다. *E. coli, S.aureus, P. aeruginosa*는 NA 배지를 사용하였으며, *C. albicans, A. niger*는 YM 배지를 사용하여 배양하였으며, 배양한 균을 각 고체배지에 10^7 CFU/ml로 도말하였다. Paper disc 위에 100 μg/ml 농도의 시료를 30 μl씩 접종하여 건조한 후 각 균주가 도말된 배지 위에 올려놓고 37℃의 배양기에서 24시

간 배양하여 생장억제환의 크기를 측정하였다.

3. 통계처리

통계적 분석은 SPSS 21.0 for windows (SPSS Inc., USA)를 이용하여 평균±표준편차로 나타내었으며, ANOVA를 사용하여 다중 비교하였고 Duncan test를 통해 $p<0.05$, $p<0.01$ 및 $p<0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 세포생존율

1) RAW264.7 세포

RAW264.7 세포에서 세포생존율을 측정한 결과, 3가지 처방은 모든 농도에서 세포에 대한 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

2) MC/9 세포

MC/9 세포에서 세포생존율을 측정한 결과, 3가지 처방은 모든 농도에서 세포에 대한 독성이 나타나지 않았다(Fig. 2).

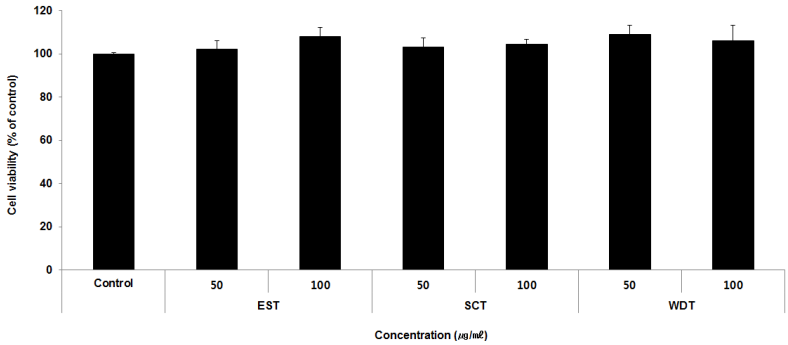

Fig. 1. Cell viability of RAW264.7 cells treated with samples.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples for 24 h. Treated cells were exposed by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using microplate reader. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments.

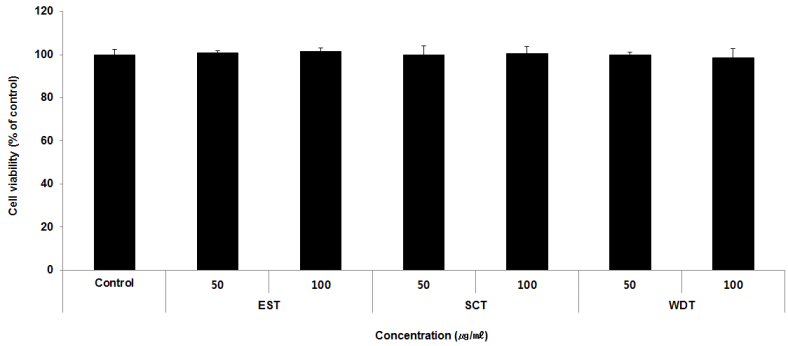

Fig. 2. Cell viability of MC/9 cells treated with samples.
MC/9 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples for 48 h. Treated cells were exposed by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using microplate reader. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments.

3) PC12 세포

PC12 세포에서 세포생존율을 측정한 결과, 3가지 처방은 모든 농도에서 세포에 대한 독성이 나타나지 않았다(Fig. 3).

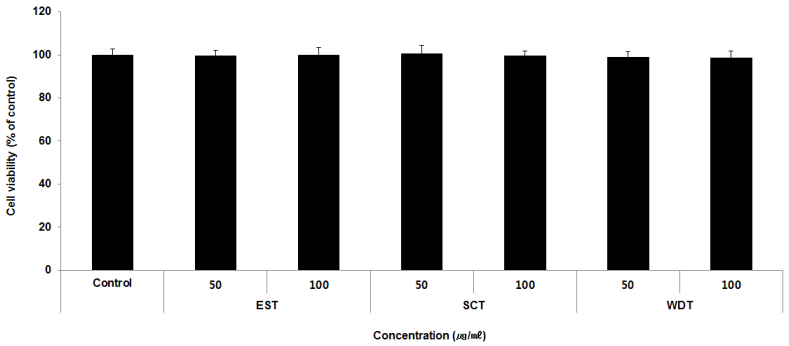

Fig. 3. Cell viability of PC12 cells treated with samples.
PC12 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples for 48 h. Treated cells were exposed by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using microplate reader. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments.

2. 항염증 효능평가

1) NO 생성량

NO 생성량을 측정한 결과, EST는 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* : p<0.05, ** : p<0.01) 감소가 나타났으며, SCT와 WDT는 100 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : p<0.05) 감소가 나타났다(Fig. 4).

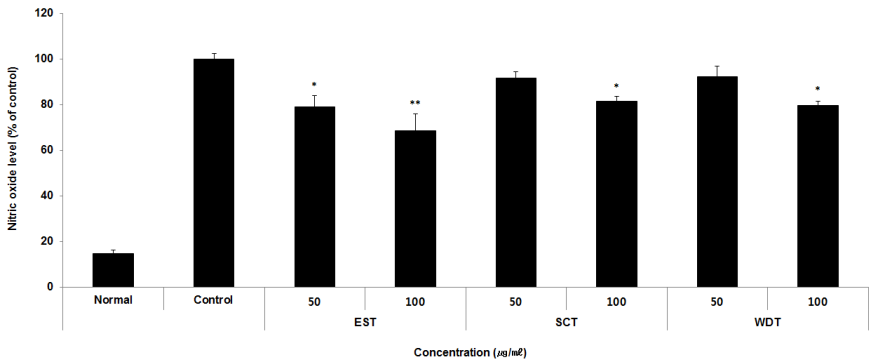

Fig. 4. Effects of samples on NO level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. NO level were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : p<0.05, ** : p<0.01 compared to control).

2) Cytokine 생성량

(1) IL-1β

IL-1β 생성량을 측정한 결과, SCT 50 μg/ml를 제외한 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 5).

(2) IL-2

IL-2 생성량을 측정한 결과, EST 100 μg/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의한 (** : p<0.01) 감소가 나타났다(Fig. 6).

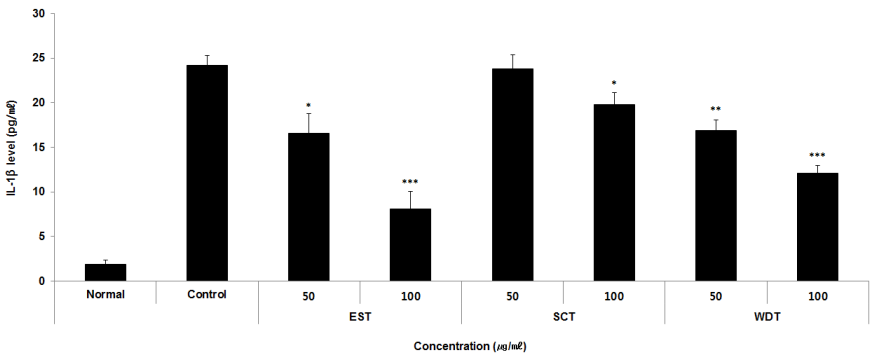

Fig. 5. Effects of samples on IL-1β level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse cytokine milliplex map immunoassay kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

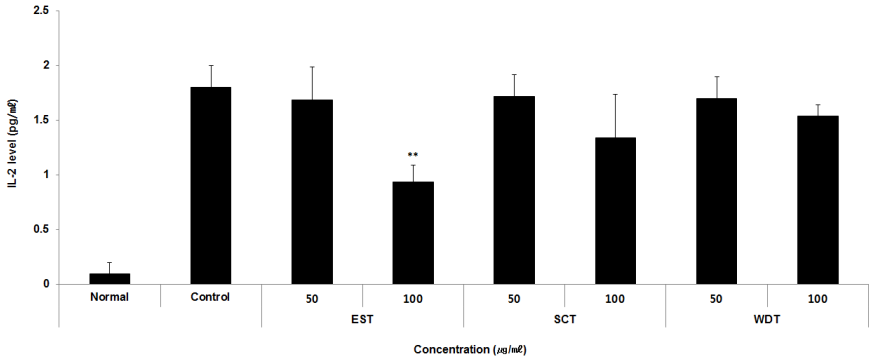

Fig. 6. Effects of samples on IL-2 level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse cytokine milliplex map immunoassay kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, ** : p<0.01 compared to control).

(3) IL-6

IL-6 생성량을 측정한 결과, EST 50, 100 μg/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의한(** : p<0.01, *** : p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 7).

(4) TNF-α

TNF-α 생성량을 측정한 결과, SCT 50 μg/ml를 제외한 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 8).

(5) PGE_2

PGE_2 생성량을 측정한 결과, WDT 50 μg/ml를 제외한 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 9).

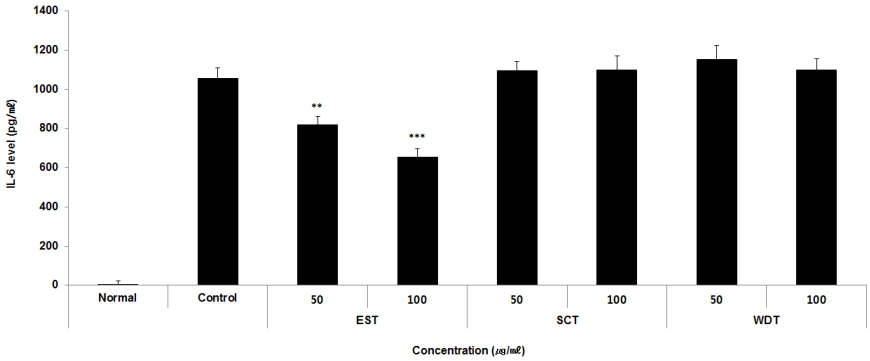

Fig. 7. Effects of samples on IL-6 level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse cytokine milliplex map immunoassay kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compared to control).

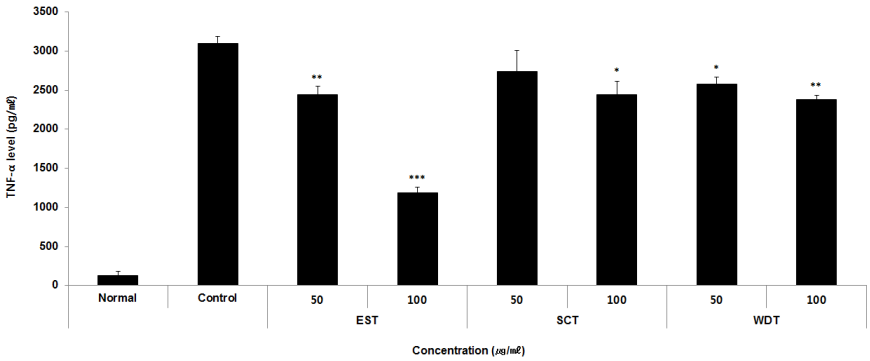

Fig. 8. Effects of samples on TNF-α level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by mouse cytokine milliplex map immunoassay kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compared to control).

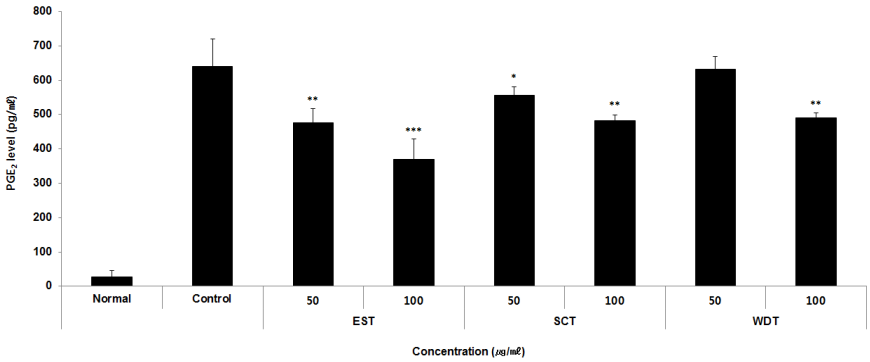

Fig. 9. Effects of samples on PGE_2 level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by PGE_2 Parameter Assay Kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compared to control).

(6) LTB_4

LTB_4 생성량을 측정한 결과, 3가지 처방은 100 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소가 나타났다(Fig. 10).

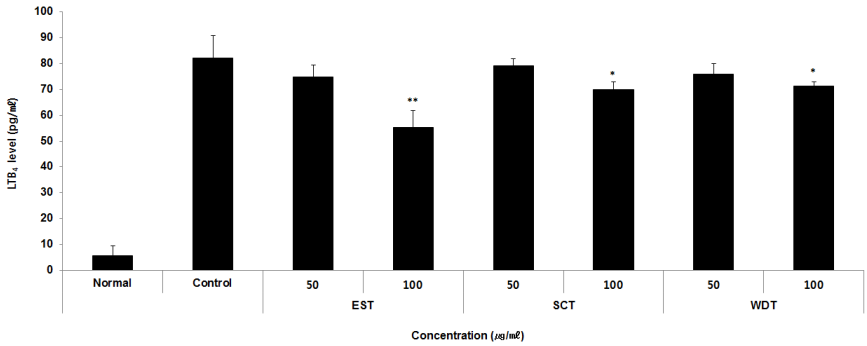

Fig. 10. Effects of samples on LTB_4 level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. Treated cells were measured by LTB_4 Parameter Assay Kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compared to control).

3) 유전자 발현량

(1) NF-κB

NF-κB 유전자 발현량을 측정한 결과, 3가지 처방은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 11).

(2) iNOS

iNOS 유전자 발현량을 측정한 결과, 3가지 처방은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 12).

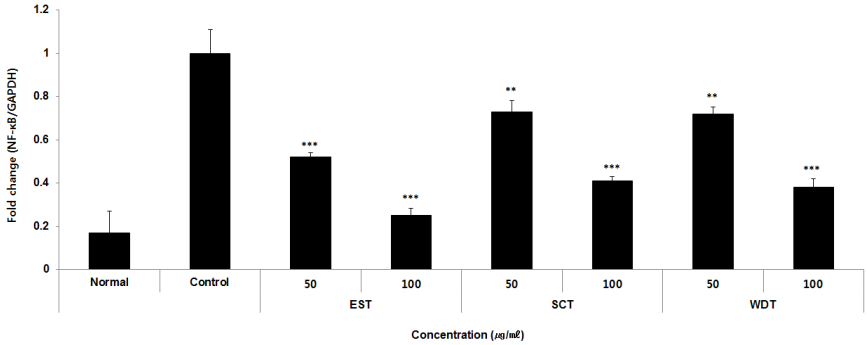

Fig. 11. Effects of samples on NF-κB mRNA expression level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. The mRNA expression level were measured by polymerase chain reaction. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compared to control).

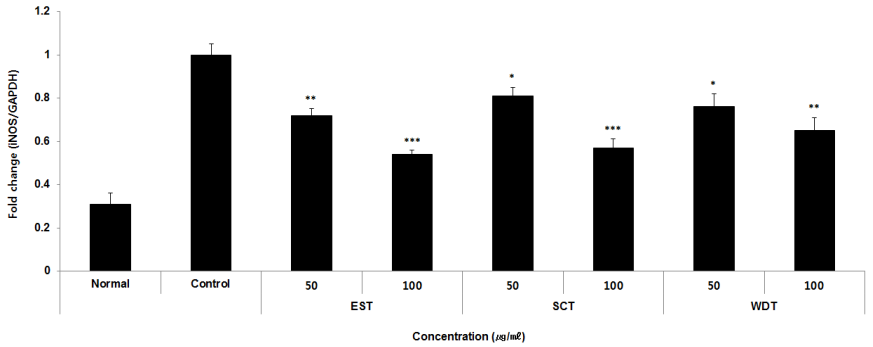

Fig. 12. Effects of samples on iNOS mRNA expression level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. The mRNA expression level were measured by polymerase chain reaction. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compared to control).

(3) COX-2

COX-2 유전자 발현량을 측정한 결과, EST는 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(*** : $p<0.001$) 감소가 나타났으며, SCT와 WDT는 100 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : $p<0.05$, *** : $p<0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 13).

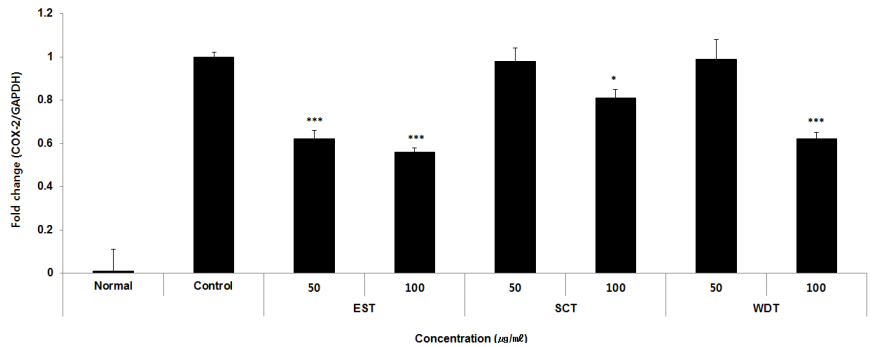

Fig. 13. Effects of samples on COX-2 mRNA expression level in RAW264.7 cells.
RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. The mRNA expression level were measured by polymerase chain reaction. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, *** : $p<0.001$ compared to control).

4) Immunoblot

(1) p-IκB-α/IκB-α

p-IκB-α/IκB-α 단백질 발현량을 측정한 결과, 3가지 처방은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(*** : $p<0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 14).

(2) NF-κB p65

NF-κB p65 단백질 발현량을 측정한 결과, 3가지 처방은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 15).

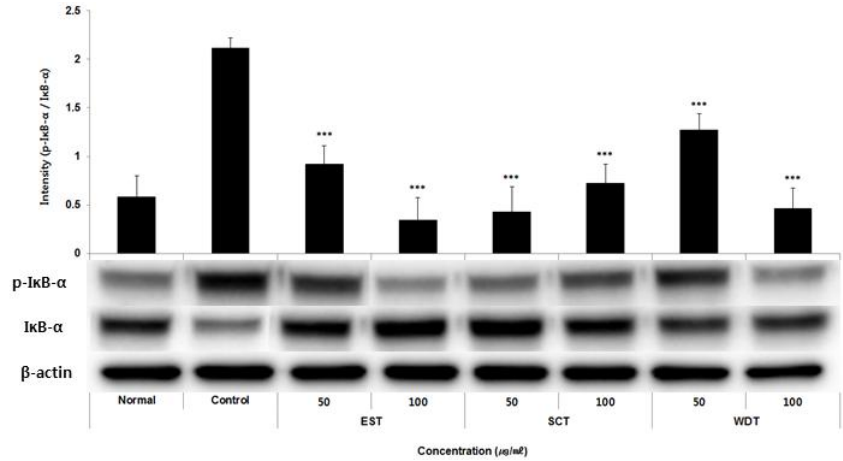

Fig. 14. Effect of samples on p-IκB-α/IκB-α protein expression level in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. The protein expression level were measured by immunoblot. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, *** : p<0.001 compared to control).

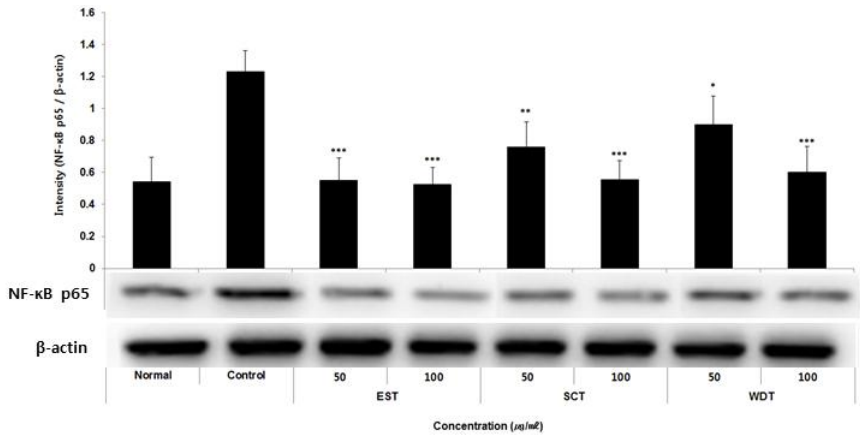

Fig. 15. Effects of samples on NF-κB protein expression level in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 1 μg/ml LPS for 24 h. The protein expression level were measured by immunoblot. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

3. 항소양증 효능평가

1) Histamine

Histamine 생성량을 측정한 결과, EST 50, 100 μg/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의한(* : p<0.05, *** : p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 16).

2) Acetylcholine

Acetylcholine 생성량을 측정한 결과, 3가지 처방은 100 μg/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의한(* : p<0.05, ** : p<0.01) 감소가 나타났다(Fig. 17).

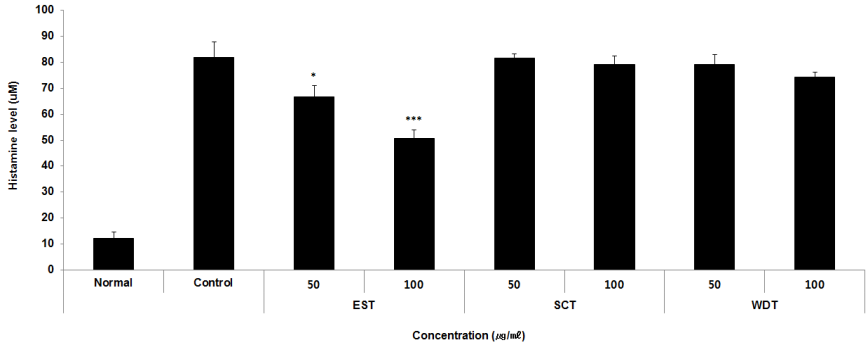

Fig. 16. Effects of samples on histamine level in MC/9 cells.
MC/9 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 50 ng/ml PMA and 0.5 uM ionomycin for 48 h. Treated cells were measured by histamine ELISA kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, *** : $p<0.001$ compared to control).

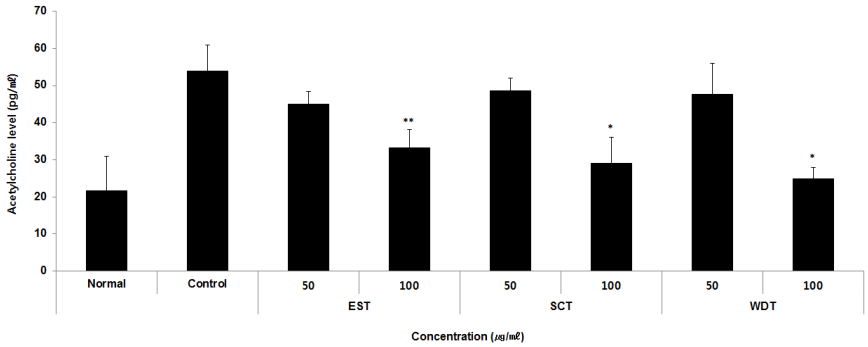

Fig. 17. Effects of samples on acetylcholine level in PC12 cells.
PC12 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 50 ng/ml NGF for 48 h. Treated cells were measured by acetylcholine ELISA kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compared to control).

3) Acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase 생성량을 측정한 결과, 3가지 처방 모두 대조군에 비해 약간 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 18).

4) Substance P

Substance P 생성량을 측정한 결과, WDT 50 μg/ml를 제외한 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 19).

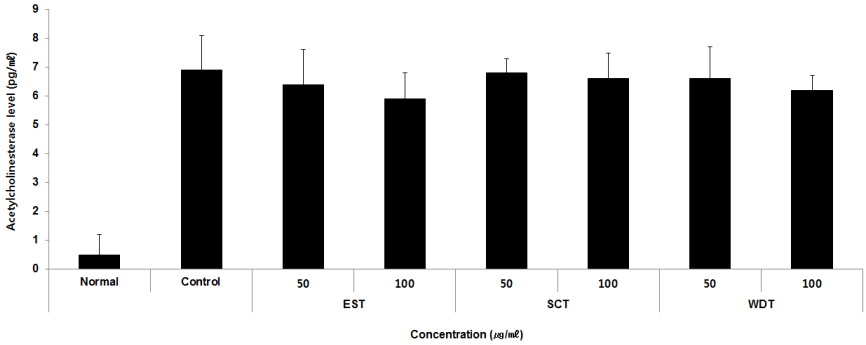

Fig. 18. Effects of samples on acetylcholinesterase level in PC12 cells.
PC12 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 50 ng/ml NGF for 48 h. Treated cells were measured by acetylcholinesterase ELISA kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments.

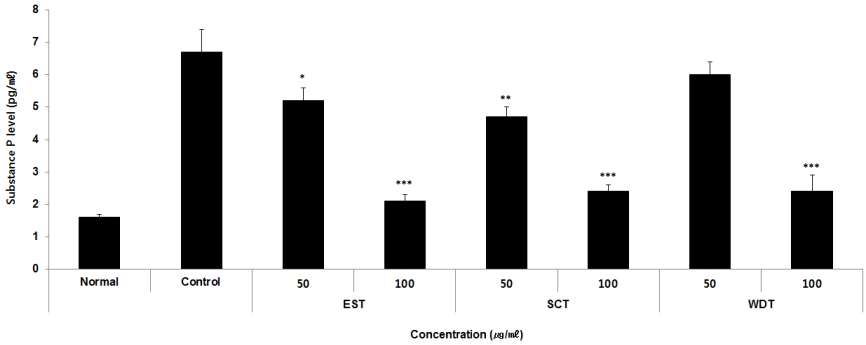

Fig. 19. Effects of samples on substance P level in PC12 cells.
PC12 cells were treated by 50 and 100 μg/ml of each samples with 50 ng/ml NGF for 48 h. Treated cells were measured by substance P ELISA kit. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compared to control).

4. 항균 효능평가

생장억제환 크기를 측정한 결과, 3가지 처방 모두 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*의 생장은 억제하지 못하였으나 *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*의 생장을 억제하는 효능이 EST, WDT, SCT 순으로 나타났다 (Fig. 20).

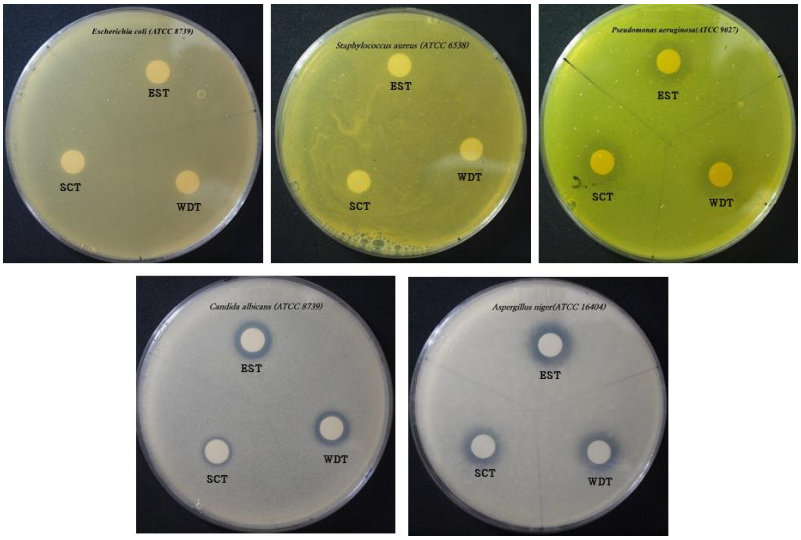

Fig. 20. Effects of samples on clear zone diameter of bacteria.
100 μg/ml of each samples were loaded into the solid medium inoculated with bacteria and the clear zone diameter was measured after 24 hours. (mean±standard deviation, n=four independent experiments).

Ⅳ. 고 찰

帶下는 출혈 이외의 질 밖으로 흐르는 분비물을 말한다. 정상 상태의 여성생식기 점막은 분비물로 적셔져 있으며, 호르몬 변화에 따라 월경전후나 배란기 또는 임신기간 중에 양이 비교적 증가하나 대개의 경우 질 밖으로 배출되지 않는다. 그러나 분비물의 양이 과다하거나, 性色臭味에 있어 생리적인 한계를 넘어서고 나아가 소양감이나 작열감, 통증, 출혈까지도 동반하는 경우 질이나 자궁경관의 염증과 연관된 병리적인 상태로 볼 수 있다[1,2].

질 내에는 수많은 종류의 정상 세균총이 있는데, 이 중 호기성 세균인 유산균이 가장 큰 비율을 차지한다. 유산균은 질 내를 산성 상태로 유지하고 질 미생물들 간의 균형을 유지하여 병균에 대한 저항성을 지니게 하며, 만일 질 내 산성도가 유지되지 못하면 정상 세균군의 생태계가 교란되어 감염의 기회가 증가한다[3].

가임기 여성에게 발생하는 외음부 및 질염, 자궁경관염의 원인 대부분은 세균, 트리코모나스, 칸디다이며 黃綠色 농성 분비물(mucopus)이 나오는 화농성 내자궁경관염은 임균(*Neisseria gonorrheae*), 클라미디아(*Chlamydia trachomatis*) 등이 원인이다. 치료로는 Metronidazole, Clindamycin, Metronidazole, Azole 약제와 경구 항진균 약제인 Fluconazole 등을 사용한다[3]. 그러나 항생제에 저항하는 균주가 늘어나고, 당뇨병과 같은 내분비장애가 있는 경우 세포전파 면역 기능이 감소하여 난치성, 재발성 경과를 보이는 경우가 많으며[1], 더불어 호르몬제 복용, 성생활의 개방화, 스트레스의 증가 등에 따른 비특이적 요인이 차지하는 비율이 점차 높아지고 있어 국소요법에 기반을 둔 서양

의학적 치료만으로는 적지 않은 한계가 있다[3,13].

한의학에서 帶下는 ≪素問≫에서 처음으로 그 내용이 보이는데 〈骨空論〉에서 "任脈爲病 男子內結七疝 女子帶下瘕聚"라 하여 胞中에서 起始하는 任脈이 위로 帶脈을 지나 臍上을 관통하므로 女子의 任脈에 병이 들면 帶下와 癥瘕積聚가 생긴다고 하였고[14,15], 현재는 內因과 外因으로 나누어 病因病機를 설명하고 있다. 즉, 風冷, 寒濕, 濕熱, 濕痰, 食毒, 七情, 瘀血 등의 원인으로 脾腎虛하거나 任帶脈이 약해지고 견고하지 못하게 되면 水濕이 생식기로 下注하여 帶下가 발생한다고 보고 脾虛, 腎陽虛, 腎陰虛, 濕熱, 濕毒 등으로 辨證한다[1,4].

帶下에 대한 실험 연구 중 원인균에 대하여 항염, 항균 작용이 있는 단일 약재로는 艾葉[16], 訶子, 車前子, 川芎, 蒲公英, 黃芩[17], 收澁藥[18]과 芳香化濕藥[19], 活血祛瘀藥[20]과 淸熱藥[21], 利水滲濕藥[22]과 溫裏藥[23] 등이 있고, 복합약물로는 完帶湯[24], 易黃湯[25], 側柏楮皮丸[26], 加減攝營煎[27], 蛇床子洗方[28], 銀花瀉肝湯약침[8] 등이 있다. 임상증례보고로는 蜀葵[29], 銀花瀉肝湯, 溫胞種玉湯, 補血安神湯, 補血湯, 膠艾止血湯[6], 益氣除濕湯[30], 完帶湯[31] 등을 활용하여 유의한 효과를 얻은 사례가 있다. 앞선 연구 결과들을 살펴보면 帶下에 주로 淸熱藥, 芳香化濕藥, 利水滲濕藥, 溫裏藥, 理氣藥, 止血藥, 活血祛瘀藥, 補益藥, 收澁藥을 사용하였으며, 陰陽虛實辨證과 兼症에 따라 처방을 응용하였다는 사실을 알 수 있다. 이를 토대로 본 연구에서는 원인별 帶下에 항염, 항소양, 항균 작용이 있는 처방들 중 세 가지를 선정하여 효능을 비교하고자 하였다. 帶下의 원인을 크게 脾虛, 腎虛, 濕熱, 瘀血로 분류하고 脾虛인 경우 健脾益氣除濕하는 完帶湯을, 濕熱인 경우 舒肝利水淸熱하는 銀花瀉肝湯을, 瘀血인 경우 活血祛瘀行氣하는 少腹逐瘀湯을 선정하였고 노인성인 腎虛 처방은 제외하였다.

銀花瀉肝湯은 龍膽瀉肝湯의 加味方이다. 龍膽瀉肝湯은 ≪蘭室祕藏≫[32]에 "治陰部時復熱痒及臊臭"한다고 처음 수록되어 있으며 이후 赤茯苓, 梔子, 黃芩, 甘草가 추가되어 肝膽實火로 인한 實證의 濕熱 질환에 폭넓게 활용되고 있다[33]. 主治는 "肝臟濕氣 男子陰挺 女人陰痒瘡"이며[34] 처방 구성은 龍膽草, 柴胡, 澤瀉, 木通, 車前子, 赤茯苓, 生地黃, 當歸, 梔子, 黃芩, 甘草로 이루어져 있다. 銀花瀉肝湯은 여기에 淸利濕熱 消腫排膿하는 金銀花를 君藥으로 加하고 氣血兼治를 위하여 凉血熱 散瘀血하는 牧丹皮와 行滯散氣 破癥止痛하는 玄胡索을 配伍하여 消炎, 散瘀, 抗菌, 鎭痛 작용을 강화시킨 처방이다[5-7]. 銀花瀉肝湯에 대한 연구로는 항암 및 면역증강 효과[7], 소염·진통·해열·진정·이뇨·항균·항산화 효과[8] 등이 보고되어 있다.

少腹逐瘀湯은 ≪醫林改錯≫[9]에 처음 수록되어 있다. 主治는 "少腹積塊疼痛 或有積塊不疼痛 或疼痛而無積塊 或少腹脹滿或經血見時 先腰痠少腹脹 或經血一月三五次 接連不斷 斷而又來 其色或黯 或黑或塊 或崩漏兼小腹疼痛 或粉紅兼白帶"이며 처방 구성은 當歸, 蒲黃, 赤芍藥, 五靈脂, 沒藥, 肉桂, 川芎, 玄胡索, 小茴香, 乾薑으로 이루어져 있다. 少腹逐瘀湯에 대한 연구로는 항혈전 및 소염, 진통 효과[10] 등이 보고되어 있다.

完帶湯은 ≪傅靑主婦科≫[11]에 수록되

어있으며 補中健脾 化濕止帶하는 대표적인 固崩止帶方이다[12]. 主治는 白帶下이며 病因病機를 "夫白帶 乃濕盛而火衰 ; 肝鬱而氣弱 則脾土受傷 濕土之氣下陷. 是以脾精不守 不能化榮血 以爲經水 反變成白滑之物 有陰門直下 欲自禁而不可得也"라고 언급하였다. 처방 구성은 白朮, 山藥, 白芍藥, 車前子, 蒼朮, 人蔘, 甘草, 柴胡, 陳皮, 荊芥穗로 이루어져 있다. 完帶湯에 대한 연구로는 이뇨, 소염 및 항균효과[8], *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균효과 및 Clindamycin과의 병용 효과[12] 등이 보고되어 있다.

상술한 세 가지 처방은 부인과의 제반 염증성 질환에 임상적으로 사용할 수 있는 처방으로, 단일 약재 및 처방에 대한 연구는 이루어져 있으나 처방 별 효능의 비교 연구는 현재까지 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 *in vitro*에서 銀花瀉肝湯(EST), 少腹逐瘀湯(SCT), 完帶湯(WDT)을 가지고 RAW264.7 세포에서 항염증 효능, MC/9 및 PC12 세포에서 항소양증 효능, 여러 균주에 대한 항균 효능을 규명하기 위한 실험을 진행하였다.

EST, SCT, WDT의 투여는 RAW264.7, MC/9 및 PC12 세포 모두 100 μg/ml 농도에서 98% 이상의 세포생존율을 나타내어 정상세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다.

항염증 효능을 평가하기 위하여 RAW264.7 세포를 가지고 NO, Cytokine, PGE_2, LTB_4의 생성량과 유전자 발현량을 측정하였다. RAW264.7 세포는 murine macrophage cell line으로 생체 방어에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 염증반응 시에 다양한 염증촉진성 cytokine을 생산한다[35,36]. NO는 생체 생성 radical로 신경전달, 혈관 이완, 세포매개성 면역에서 중요한 역할을 하며 NOS에 의해 L-arginine과 O_2로부터 생성된다[37]. 일반적으로 포유류의 활성화된 대식세포의 염증반응 시에는 NO가 iNOS에 의해 가장 많이 생성되며[38,39] NO의 과다한 생성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이, 신경손상 등을 일으킨다[40-3]. 한편 RAW264.7 세포가 염증반응 시 생산하는 cytokine으로 TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6 등이 있다. 염증반응의 개시를 촉진하는 TNF-α는 주로 대식세포와 T-cell로부터 분비되며 내피세포와 중성구를 활성화하여 염증반응을 매개할 뿐만 아니라, 시상하부에 작용하여 발열을 유도하고 혈관내피세포의 표면에 세포접합분자의 발현을 유도한다[44]. 분비된 TNF-α는 IL-1β와 IL-6의 생성을 유도하여 염증반응을 지속시킨다[45]. IL-1β와 IL-2는 TNF-α처럼 염증반응을 매개하고 발열을 유도하며, T-cell과 NK cell의 활성화, B-cell의 성숙에도 관련되어 있으며, 시상하부에 작용하여 발열을 유도한다[46]. IL-6는 급성 감염이나 외상 시 단백질합성과 B-cell의 분화와 증식을 촉진시키고, 항체를 분비하도록 자극한다고 알려져 있다[47]. PGE_2는 염증반응 시 phospholipase A2와 COX-2에 의해 arachidonic acid로부터 생성되며 혈관 확장, 혈관투과성 증가, 백혈구의 염증 부위로의 화학주성 증가 작용을 한다[48]. LTB_4 또한 arachidonic acid로부터 합성된 후 몇 단계의 불안정한 상태를 거쳐 비만세포, 대식세포, 호중구 등에서 발현되는데, 일차적인 기능은 백혈구의 모집으로 알레르기 염증의 발생에 중요한 역할을 한다[49]. NF-κB는 세포질에서 I-κB와 결합하여 비활성형으로 존재하다가 염증반응 시

I-κB가 인산화 되면 NF-κB가 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 등의 전사를 유도하게 된다[50,51]. 이와 같이 활성화된 대식세포는 염증촉진성 Cytokine 이외에 효소의 발현을 통해 염증매개 분자들을 생성하게 되고 염증 매개 분자들의 과도한 생성이 만성염증성 질환의 발병에 일조하고 있는 것으로 알려져 있다.

항염증 효능평가 중 NO 생성량을 측정하여 대조군과 비교한 결과 EST는 모든 농도에서 감소하였으며, SCT와 WDT는 고농도에서만 감소하였다. 염증촉진성 Cytokine 생성량 중 IL-1β 생성량은 SCT 저농도를 제외한 모든 처방에서 감소하였으며, IL-2 생성량은 EST 고농도에서만, IL-6 생성량은 EST에서만 감소하였다. TNF-α 생성량은 SCT 저농도를 제외한 모든 처방에서, PGE_2 생성량은 WDT 저농도를 제외한 모든 처방에서 감소하였으며, LTB_4 생성량은 3가지 처방 모두 고농도에서 감소하였다. 유전자 발현량을 측정한 결과 NF-κB와 iNOS는 3가지 처방의 모든 농도에서, COX-2는 EST에서만 모든 농도에서 감소하였으며, SCT와 WDT는 고농도에서 감소하였다. Immunoblot 분석 결과 p-IκB-α/IκB-α 및 NF-κB p65 발현량은 3가지 처방에서 모두 감소하였다. 따라서 본 실험 결과를 볼 때 EST의 항염증 효능이 우수했으며 그 다음이 WDT, SCT 순으로 항염증 효능이 나타났다.

항소양증 효능을 평가하기 위하여 MC/9 세포와 PC12 세포를 가지고 histamine, Acetylcholine, Acetylcholinesterase, Substance P의 생성량을 측정하였다. MC/9 세포는 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포로서 자극원에 의해 활성화되면 arachidonic acid 대사물질과 염증반응성 cytokine을 분비하여 염증반응을 촉진할 뿐만 아니라 histamine과 같은 소양감 유발물질을 방출한다[52]. PC12 세포는 흰쥐 부신수질 갈색세포종양에서 유래된 세포로서 신경세포로 분화된다. 신경전달물질 중 하나인 Acetylcholine은 C-fiber를 자극하여 소양감 유발물질이 C-fiber의 단백질 수용체에 붙으면 신경전달을 통해 뇌로 전달되어 소양감을 느끼게 되며 Acetylcholinesterase에 의해 분해된다[53]. 소양감을 유발하는 염증매개인자인 Substance P는 피부세포에서 분비되는 신경전달물질로서, 피부의 신경섬유를 직접 자극하거나 비만세포의 histamine 분비를 촉진해서 피부에서 소양감을 느끼게 한다[54].

항소양증 효능 평가 중 Histamine 생성량을 측정한 결과, EST는 모든 농도에서 대조군에 비해 감소하였고, Acetylcholine 생성량은 모든 처방이 고농도에서만 감소하였다. Acetylcholinesterase 생성량은 3가지 처방 모두 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. Substance P는 WDT 저농도를 제외한 모든 농도에서 유의성 있게 감소하였다. 항소양증 효능 역시 EST에서 항히스타민 효과가 우수하였다.

항균 효능을 평가하기 위하여 세균 중 통상 혐기성 세균으로 불리는 그람양성균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 그람음성균인 대장균(*Escherichia coli*)과 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 진균 중 효모인 칸디다 효모(*Candida albicans*), 사상균인 흑국균(*Aspergillus niger*)을 선정하여 생장 억제 효과를 비교하였다. 이들은 인체 피부점막에 상재하며 쉽게 이환되는 균종으로 특히 외음부 및 질의 염증을 일으키는 원인균들 중 일부이다[55].

항균 효능을 평가하기 위하여 생장억제환 크기를 측정한 결과, 3가지 처방 모두 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*의 생장은 억제하지 못하였으나 *Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Aspergillus niger*의 생장을 억제하는 효능이 나타났으며, EST, WDT, SCT 순으로 우수한 효능이 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, EST, SCT, WDT는 모두 NF-κB signaling을 조절하고 NF-κB 발현량을 감소시켰으며, 이로 인해 NO의 활성을 조절하는 iNOS와 PGE_2의 활성을 조절하는 COX-2의 유전자 발현량이 감소되었고 결과적으로 이들에 의해 조절되는 cytokine들(IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, PGE_2, LTB_4)의 생성량을 감소시키는 항염증 효능이 검증되었다. 또한 염증반응에 관여하고 소양증의 중재자로서 중요한 역할을 하는 histamine과 소양반응을 감지하여 뇌에 반응을 유도하는 신경전달물질인 acetylcholinesterase, acetylcholine, substance P들을 감소시켜 항소양증에 대한 효능 역시 검증이 되었다. 마지막으로 체내 세균성 질환을 유도하는 *Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Aspergillus niger*의 생장을 억제하는 항균 효능이 확인되었다.

따라서 항염증, 항소양증, 항균 효능은 EST가 세 가지 처방 중 가장 유의하였으며, WDT, SCT도 우수한 효능이 검증되었다. 따라서 감염으로 인하여 발생하는 염증 및 소양증 질환에 대한 *in vivo* 연구나 임상시험 등의 추가적인 연구를 통해 효능 근거가 보강된다면 가려움을 동반하는 생식기 감염성 질환에 위 세 가지 처방들의 더 많은 활용이 가능 할 것이라 사료된다.

Ⅴ. 결 론

EST, SCT, WDT의 항염증, 항소양증, 항균 효능을 객관적으로 검증하고 비교하기 위하여 다양한 세포들을 통해 다양한 인자를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포생존율을 측정한 결과, EST, SCT, WDT는 RAW264.7, MC/9, PC12 세포 모두 100 μg/ml 농도에서 98% 이상의 세포생존율을 나타내어 정상세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다.
2. 항염증 효능을 측정한 결과, EST, SCT, WDT는 대조군에 비해 NO, IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, PGE_2, LTB_4 생성량을 유의성 있게 감소시켰으며, 또한 NF-κB, iNOS, COX-2 유전자 발현량과 p-IκB-α/IκB-α 및 NF-κB p65 단백질 발현량을 유의하게 감소시켰다.
3. 항소양증 효능을 측정한 결과, EST, SCT, WDT는 대조군에 비해 histamine, acetylcholine, substance P 생성량을 유의하게 감소시켰으며, acetylcholinesterase 생성량의 경우 약간 감소하였으나 유의성은 없었다.
4. 항균 효능을 측정한 결과, EST, SCT, WDT 순으로 *Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Aspergillus niger*의 생장을 억제하는 효능이 나타났으며, *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*의 생장은 억제하지 못하였다.

□ Received : Jul 18, 2019
□ Revised : Aug 01, 2019
□ Accepted : Aug 29, 2019

References

1. The Society of Korean Medicine Obstetrics & Gynecology. Korean Medicine Obstetrics and Gynecology (下). 3rd rev. ed. Seoul: Euiseongdang. 2016:277-90.
2. Jang MG, Lee GS, Song BG. Comparison for Leukorrhea through East and West Medical Science. J Korean Obstet Gynecol. 1998;11(2):83-92.
3. Korean Society of Obsterics & Gynecology. Gynecology. 5th rev. ed. Seoul:Goryeouihak. 2018:147-54.
4. Choi ES, Lee IS. Literature Review on the Cause of Fluor Genitalis. J Korean Obstet Gynecol. 1994;7(1):47-68.
5. Song BK. Anti-inflammatory, Antipyretic, Analgesic, Diuretic and Antibacterial Effects of *Yongdamsangan-tang* and *Eunhwasagan-tang*. The Journal of Korean Oriental Medicine. 1981;2(2):84-5.
6. Yang SY, Lee KS, Song BK. A Clinical Study on Dae-Ha (leukorrhea). The Journal of Korean Oriental Medicine. 1992;13(2):179-86.
7. Kim JS, et al. Experimental Studies on Antitumor Effects and Immune Responses of *Eunwhasagan-tang* and *Eunwhasagan-tang-ga-nokyong*. The Journal of Korean Oriental Oncology. 1997;3(1):1-27.
8. Lee EM. A Study on the Analgesic, Antipyretic, Anti-inflammatory, Diuretic, Muscular Atonic, Antibiotic, Antioxidative Effects of *Eunhwasagan-tang* Herbal-Acupuncture. J Korean Obstet Gynecol. 2001;14(1):157-71.
9. Wang XC(王勳臣). Yilingaicuo(醫林改錯). Taipei:Tailianguofeng-chubanshe(台聯國風出版社). 1975:61.
10. Park BR, Lee SS. The Effect of *Sobokchuckou-tang* in Antithrombotic, Antiflammation, and Analgesia. J Korean Obstet Gynecol. 1996;9(1):81-96.
11. Bu CJ(傅靑主), Seop CS(葉天士). Bu Cheongju-namnyeokwa・Seop Cheonsa-yeokwa(傅靑主男女科・葉天士女科). Seoul:Daeseong-munhwasa. 1992:81.
12. Lee SH, Kim DC. *In Vitro* Antibacterial Effects of *Wandae-tang* Aqueous Extracts and Their Combination Effects with Clindamycin against *Gardnerella Vaginalis*. J Korean Obstet Gynecol. 2012;25(1):34-46.
13. Choi YD. Clinical Gynecology. Seoul: Goryeouihak. 1993:489-516.
14. Lee HC, Yom TH. Studies on the Pathogenesis of Gyneco-Fluor and the Effect of Gyneco-on Infertility. J Korean Obstet Gynecol. 1987;1(1):21-31.
15. Hong WS. Jeonggyo-hwangjaenaegyeong-somun(精校黃帝內經素問). Seoul:Dongyanguihak-yeonguwon-chulpanbu. 1985:209.
16. Yang SY, Lee KS, Song BK. The Experimental Study on *Folium Artemisiae Argyi* Applied in the Treatment of Women's Genital Disease and Fluor Genitalis. J Korean Obstet Gynecol. 1989;3(1):48-52.
17. Lim SM, Lee DN, Kim HJ. *In vitro* Activities of *Terminaliae Fructus*,

Plantaginis Semen, *Cnidii Rhizoma*, *Taraxaci Herba*, *Scutellarie Radix* Extracts Against Vaginosis-associated *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Gardnerella vaginalis*. J Korean Obstet Gynecol. 2004;17(4):34-45.
18. Lee CH, et al. Antimicrobial Effects of Astringent Medicinals Against Vaginal Microbe. J Korean Obstet Gynecol. 2006;19(2):127-40.
19. Lee CH, et al. Antibiotic Effects of Medicinals Resolving Dampness with Aroma on Vaginal Microorganisms. J Korean Obstet Gynecol. 2006;19(4):33-46.
20. Cho JH, et al. Antibiotic Effects of Blood-activating Stasis-dispelling Medicinals on Vaginal Microorganisms. J Korean Obstet Gynecol. 2006;19(4):17-32.
21. Cho JH, et al. Antibiotic Effect of Heat-Clearing Medicinals on Vaginal Microorganisms. J Korean Obstet Gynecol. 2006;19(3):175-90.
22. Lee JM, et al. Antimicrobial Effects of Herbs for Removing Dampness and Promoting Urination Against Vaginal Microbe. J Korean Obstet Gynecol. 2007;20(1):1-15.
23. Lee JM, et al. Antimicrobial Effects of the Interior Warming Herbs on Vaginal Microbe. J Korean Obstet Gynecol. 2007;20(2):124-38.
24. Song SH. A Study on the Effects of *Wandae-tang* on Diuretic, Antiinflammatory, Antimicrobial and Immune Response. The Kyung Hee University Oriental Medical Journal. 1989;12(1):337-47.
25. Yang SE, et al. A Study on the Effect of *Youkhwang-tang* on Diuretic Antitumorigenic, Anti-inflamatory and Anti-microbial Response. The Kyung Hee University Oriental Medical Journal. 1991;14(1):271-81.
26. Jung JH, Park BR. Antiphlogistic and Antibacterial Effects on the Lab Animals from *Biotae Folium* Medicine Fluids. J Korean Obstet Gynecol. 1991;4(1):7-22.
27. Oh JY, Kim DC. *In Vitro* Antibacterial Effects of *Gagam-seopyoung-jeon* Aqueous Extracts and Their Combination Effects with Clindamycin against *Gardnerella Vaginalis*. J Korean Obstet Gynecol. 2014;27(1):65-80.
28. Sung HA, Park YS, Kim DC. Antibacterial Effects of *Sasangja-saebang* Aqueous Extracts Against Gardnerella Vaginalis ATCC14018, and Combination Effects with Metronidazole. J Korean Obstet Gynecol. 2010;23(2):20-37.
29. Cho SY. The Clinic Effect of *Althaeae* (蜀葵) in the Morbid Leukorrhea Treatment. The Journal of Korean Oriental Medicine. 1989;10(1):13-7.
30. Park KI, et al. A Case Study on Korean Medicine Treatment for Chronic Leukorrhea Diagnosed with Qi Deficiency. J Korean Obstet Gynecol. 2015;28(3):107-18.
31. Sung WY, et al. A Case Report of a Patient with a Diagnosis of Pelvic Inflammation. The Journal of East-West medicine. 2009;34(4):55-64.
32. Lee DW(李東垣), et al. Dongwon-

sipjong-uiseo(東垣十種醫書). Seoul: Daeseong-munhwasa. 1983:219-20.
33. Heo J(許浚). Donguibogam(東醫寶鑑). Seoul:Donguibogam-chulpansa. 2005:823-4.
34. Yun YG. Oriental Herbal Formula and Prescription analysis. 3rd rev. ed. Seoul:Euiseongdang. 2011:711, 759.
35. Higuchi M, et al. Cytolytic Mechanism of Activated Macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 1990;144(4):1425-31.
36. McDaniel ML, et al. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med. 1996;211(1):24-32.
37. Posadas I, et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000;361(1):98-106.
38. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. Crit Rev Neurobiol. 1996;10(3-4):291-316.
39. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992;6(12):3051-64.
40. Lee BG, et al. Suppression of inducible nitricoxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol. 2000;406(3):301-9.
41. Seo WG, et al. The aqueous extract of Rhodiola sachalinensis root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 2001;76(1):119-23.
42. Kawamata H, et al. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 2000;28(2):217-26.
43. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal. 2001;13(2):85-94.
44. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance. P Neuropeptides. 2003;37(6):355-61.
45. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF-α -a primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol 7. 1989:625-55.
46. The Korean Society of Pathologists. Pathology. Seoul:KMS. 2007:76-108.
47. Jirik FR, et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. J Immunol. 1989;142(1):144-7.
48. Grösch S, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) -independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. J Natl Cancer Inst. 2006;98(11):736-47.
49. Kim SH. Leukotrienes and Allergic Inflammation. Korean J Asthma Allergy Clin Immunol. 2012;32(2):67-72.
50. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-

kappaB in cell growth regulation. Am J Pathol. 2001;159(2):387-97.
51. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. Annu Rev Immunol. 2002;20:55-72.
52. Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. J Allergy Clin Immunol. 1997;99(2):155-60.
53. Westerink R, Ewing A. The PC12 cell as model for neurosecretion. Acta Physiol (Oxf). 2008;192(2):273-85.
54. Yvette A, Richard M. Pruritus : An Updated Look at an Old Problem. J Clin Aesthetic Dermatol. 2009;2(7):30-6.
55. Lee KH, et al. Anti-Microbial and Anti-Wrinkle Effect of Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides isolated from *Hibiscus cannabinus L.* Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2012;20(6):454-60.