

홍국발효 柴胡가 Lipopolysaccharide로 유발된 급성 폐 손상에 미치는 영향

서영호¹ · 정태영² · 김종대³ · 최해윤^{3*}

경상북도 포항시 북구 천마로 75 서영호한의원¹

대구의한대학교 한의과대학 진단학교실²

대구의한대학교 한의과대학 내과학교실³

Effects of Red Koji-Fermented Bupleuri Radix Extracts on Lipopolysaccharide-Induced Rat Acute Lung Injury

Young-ho Seo¹ · Hae-yun Choi² · Jong-dea Kim² · Tae-young Jung³

Seo-Young-Ho Korean Medicine Clinic¹

Dept. of Diagnostics, College of Korean Medicine, Daegu Haany University²

Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University³

Objective : This study aimed to assess the preventive effect of Bupleuri Radix aqueous extracts (BR) and red koji-fermented BR (fBR) in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in a rat model.

Methods : Rats were administered 30, 60, or 120 mg/kg/day of fBR for 28 days before LPS treatments. All rats were sacrificed 5 h after LPS treatment (500 µg/head, intratracheal instillation). Body weights, lung weights, pulmonary transcapillary albumin transit, arterial gas parameters (pH, partial pressure [Pa] of O₂, PaCO₂), bronchoalveolar lavage fluid (BALF) protein, lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), total cell numbers, neutrophil/alveolar macrophage ratios, lung malondialdehyde (MDA), and myeloperoxidase (MPO) were measured. In addition, histopathological changes including the luminal surface of alveoli (LSA), thickness of alveolar septum, and number of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) were checked.

Results : LPS injection led to increases in lung weights, pulmonary transcapillary albumin transit, BALF protein, LDH, TNF-α and IL-1β contents, total cells, neutrophil and alveolar macrophage ratios, lung MDA, MPO, alveolar septum thickness, and PMNs, and decreases in PaCO₂ and pH of arterial blood and LSA. However, these LPS-induced acute lung injuries were inhibited by pretreatment of 30, 60, and 120 mg/kg of fBR. The most favorable effects

* Corresponding author : Hae-Yun Choi. Department of Korean Internal Medicine, Pohang Korean Medicine Hospital of Deagu Haany University, 411, Saecheonbyeon-daero, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea. E-mail : cauri@dhu.ac.kr

· Received : 2021/12/02 · Revised : 2021/12/31 · Accepted : 2021/12/31

were seen with 30 mg/kg fBR as compared with 60 mg/kg of α -lipoic acid and BR.

Conclusions : fBR showed preventive effects on LPS-induced acute lung injury, which resembles acute respiratory distress syndrome. The mechanisms of action were likely via antioxidant and anti-inflammatory means.

Key words : Red koji-fermented Bupleuri Radix, lipopolysaccharide, LPS, acute lung injury

서 론

급성 호흡곤란 증후군 (Acute Respiratory Distress Syndrome)은 급성적인 폐의 염증으로 폐포와 모세혈관이 손상되면서 투과성이 증가되어 폐부종이 유발되고 심각한 가스교환 장애가 발생하는 임상 증후군이다¹⁾. 1967년 Ashbaugh와 petty에 의해서 병태 생리 및 병리 소견이 신생아에서 생기는 신생아성 호흡곤란 증후군과 유사하여 성인형 호흡곤란 증후군 (Adult Respiratory Distress Syndrome)으로 명명되었으나 실제로는 모든 연령에서 일어나므로 현재는 급성 호흡곤란 증후군 (Acute Respiratory Distress syndrome, 이하 ARDS)으로 부르고 있으며²⁾, 폐혈증, 세균성 바이러스성 폐렴, 위 내용물의 흡인, 흉부 직접적인 외상, 오래 지속되거나 심한 쇼크, 화상, 지방 색전증, 익사할 뻔한 경우, 대량 수혈, 심폐우회술, 산소 독성, 급성 출혈성 췌장염, 연기나 독성 가스 흡입, 특정 약물 섭취 등 다양한 원인에 의해 초래 된다³⁾.

ARDS의 연간 발생 수는 100,000명당 60명이고 사망률은 41~65%로 추측 된다¹⁾. ARDS의 치료로는 원인 질환에 대한 치료, 기계 환기, 수액 공급, 영양공급 등 보존적

치료가 주가 되고 있으며^{3,4)}, 비교적 부작용이 적고 효과가 뛰어난 호흡기 증후군 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

柴胡는 산형과에 속한 다년생 초본인 柴胡 (*Bupleurum falcatum* Linne)의 뿌리를 건조한 약재로 和解退熱, 疏肝解鬱 및 升舉陽氣하는 효능이 있다⁵⁾. ARDS에서의 폐혈관 내피세포의 손상은 활성화된 호중구가 폐혈관 내피세포에 유착된 후 분비되는 free radical에 의해 발생하는데²⁾, 시호 추출물은 free radical 억제 효과⁶⁻⁸⁾와 항염 효과^{9,10)}가 알려져 있으며, 60 mg/kg 전후에서 유의성 있는 효과가 인정된 바 있다¹¹⁾.

발효한약은 한약재를 미생물이 잘 이용할 수 있게 일정한 처리를 한 다음 미생물을 이용하여 발효한 한약재를 말한다¹²⁾. 홍국균의 경우 홍국균을 이용한 홍국색소는 이미 식품첨가물로 이용되고 있으며, 홍국균 자체는 혈압상승 억제, 항산화 활성을 가지고 있으며, 콜레스테롤 생합성 효소 활성 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다^{13,14)}. 또한 인삼의 항고지혈증 및 항산화 활성이 홍국 발효에 의해 증가되는 것이 보고되었으¹⁵⁾, 황금의 항산화 및 항염 효과가 홍국발효에 의해 증가되는 것이 관찰된 바 있다¹⁶⁾.

이에 저자는 시호 추출물의 홍국발효에

의한 생리활성 변화를 관찰하기 위해, 홍국균 (*Monascus purpureus* 12002; 한국식품개발연구원 서울. 한국)으로 발효시킨 홍국발효 시호의 효과를 LPS 유발 랫트 급성 폐 손상 모델을 이용하여, 시호 물 추출물과 비교 평가 하여 얻은 유의한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험에 사용된 모든 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Department of Health, Education, and Welfare Publication (National Institute of Health) 85-23, 1985] 및 대구한의대학교 실험동물윤리위원회의 기준에 준하여 취급하였다.

1. 홍국발효 시호 추출물

본 실험에 사용된 시호 (*Bupleurum falcatum* Linne)는 Omniherb 약업사에서 매입하였으며, 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실 관능검사를 통과한 것을 사용하였다. 정제수 10 l로 시호 1000 g을 80℃에서 1시간씩 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 후 programmable-freeze dryer (Labconco Freezone1, Labconco Corp, MO, USA)를 사용하여 동결 건조시켜, 총 165.2 g (수율 약 16.52%)의 연갈색 시호 물 추출물을 얻었다. PDA (potato dextrose

agar: Difco Co, USA) 배지를 사용하여 4일간 24℃에서 홍국균을 고체 배양한 후, 배지 중량의 10%에 상당하는 멸균수를 배지에 첨가하고, 분쇄한 홍국균 1.15% (1.90 g)를 시호 물 추출물에 첨가하여, 40℃에서 3일간 배양하여, 홍국발효 시호 추출물을 준비하였다. 홍국발효 시호 추출물은 고압 멸균기 (Hanback ST. Co, Korea)로 멸균하였고, 이후 전기 미세분쇄기 (Sungchang Machine Co, Sungnam, Korea)로 세말하여, 갈색의 분말을 얻은 다음 -20℃의 냉장고에 보관 후 증류수에 24 mg/ml의 농도까지 용해하여 실험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 사양관리

112마리의 암컷 Sprague-Dawley 랫트 (6 weeks old upon receipt, SLC, Japan)를 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였다. 온도 (20-25℃)와 습도 (30-35%)가 조절된 사육실에서 랫트용 polycarbonate 사육 상자에 5마리씩 수용하여 순화과정 및 실험 전 기간동안 사육하였다. 사육 기간 동안 음수와 사료 (Samyang, Korea)는 자유롭게 공급하였고, 명암 주기 (light-dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 이중 96마리는 LPS로 급성 폐 손상을 유발하였고, 16마리는 정상 대조군으로 사용하였으며, picric acid로 개체를 식별하였다. 모든 실험동물은 실험 시작일 및 최종 부검일 (LPS 투여일)에 각각 18시간 정도 금식을 실행하였으며 (이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), 실험동물의 약 반수 정도는 폐 모세혈관 투과율 측정에 사용하였고, 나머지 반 정도의 실험

동물은 기관 폐 세정액 (broncho alveolar lavage fluid 이하 BALF) 등 다른 검사 항목에 사용하였다.

3. 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 16마리씩 멸균 증류수를 투여한 정상 대조군, 멸균 증류수 및 LPS를 투여한 LPS 대조군, α-lipoic acid (Sigma; St. Louis, MO, USA) 60 mg/kg 및 LPS 투여군, 시호 물 추출물 60 mg/kg 및 LPS 투여군, 홍국발효 시호 추출물 30, 60, 120 mg/kg 및 LPS 투여군의 7개 그룹으로 구분하여 실험하였다 (Tab. 1).

LPS 투여 전 28일 동안, α-lipoic acid와 시호 물 추출물은 각각 멸균 증류수에 용해시켜, 5 ml/kg 용량으로 매일 1회씩 금속제 sonde가 부착된 3 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여 하였다. 이전의 실험¹⁷⁾을 참고하여 α-lipoic acid의 투여 용량을 60 mg/kg 농도로 선정하였고, 홍국발효 시호 추출물 및 일반 시호 물 추출물의 투여 용량 역시 이전의 실험¹¹⁾에서 LPS 유발 폐 손상을 유의성 있게 억제하는 60 mg/kg 농도로 선정하였다.

Table 1. Experimental Design Used in This Study

Groups		Reagents/LPS
Control	Intact	Distilled water, normal saline
	LPS	Distilled water, LPS
Referen ce	α-lipoic acid	α-lipoic acid 60 mg/kg, LPS
	BR	BR 60 mg/kg, LPS
	fBR	fBR 30 mg/kg, LPS
fBR	fBR 30	fBR 30 mg/kg, LPS
	fBR 60	fBR 60 mg/kg, LPS
	fBR 120	fBR 120 mg/kg, LPS

LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500µg/head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR All the reagents were administered at 5 ml/kg volume, once a day for 28 days before LPS treatment; Sixteen rats per group were used this study; Acute lung injuries were induced by single intratracheal instillation of LPS, 500µg/head. All animals were sacrificed 5 hours after of LPS treatment

4. 급성 폐 손상 유발

멸균 증류수, α-lipoic acid, 시호 물 추출물 또는 홍국발효 시호 물 추출물을 28일간 前 투여한 후, 18시간 이상 절식한 다음, Nathens 등¹⁸⁾의 방법에 따라, 모든 실험동물에서 Zoletile mixture (Zoletile 50; Virbac Lab, France) 25 mg/kg을 복강 주사하여 마취 시키고, 기관 절제술을 실시하여 500 µg/head 농도의 LPS(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 0.5 ml의 생리식염수에 용해시켜, 기관내로 주입 (intratracheal instillation) 하였다. 정상 대조군에서는 0.5 ml/head 농도의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다.

5. 체중 측정

실험동물의 체중은 검액 투여 시작 1일 전, 검액 투여 시작일, 검액 투여 1, 7, 14, 21, 27 및 최종 희생일인 28일째 각각 측정하였다. 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 투여 시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 금식시켰으며, 실험 시작 시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 아래의 공식 [1]을 이용하여 실험 전 기간인 4주 동안의 체중 변화량인 체중증가량 (body weight gains)을 측정

하였다.

EQUATION [1]. Body Weight Gains (g)

Through out the whole experimental periods = Body weight gains of 4 weeks of experiments (At start of administration ~ at sacrifice, the end of 28 days of reagents treatments)

6. 폐 중량 측정

최종 희생일에 모든 실험동물의 폐를 적출하여 분리한 다음 각각의 중량을 측정하여, 절대 중량으로 하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 폐 절대 중량의 비율인 상대 중량을 아래의 공식 [2]을 이용하여 산출하였다.

EQUATION [2]. Relative Lung Weights (%)

= (Absolute lung weight / Body weight at sacrifice) × 100

7. 폐혈관 투과율 측정

폐혈관 투과율을 Nathens¹⁸⁾ 등과 Hybertson¹⁹⁾ 등의 방법에 따라 [¹²⁵I] albumin (Montreal, Quebec, Canada)을 이용하여 측정하였다. 1 μCi 의 [¹²⁵I]albumin을 최종 희생 30분전에 하대정맥(inferior vena cava)에 투여하고, heparin(100 U; Sigma, MO, USA)을 우측 심방에 주입한 다음 심장 천자로 1 ml의 혈액을 채취하였다. 모든 실험동물을 방혈 한 다음, 폐정맥으로 삽관하고, 10 ml의 0.5 mg/ℓ prostaglandin E1 을 포함한 low-potassium dextran solution을 infusion 하여 폐를 세척한 다음, 폐를 적출하였다.

채취한 혈액과 좌엽과 우하엽에서 [¹²⁵I]albumin 량을 각각 측정하여, 투과율(permeability index)를 아래의 공식 [3]을 이용하여 산출하였다.

EQUATION [3]. Permeability Index (%)
= (Lung cpm / Blood cpm/ml)

8. 동맥혈 가스 지표 측정

최종 희생일에 LPS 투여 5시간 후, 복부 대동맥(abdominal aorta)에서 0.5ml의 동맥혈을 채혈하여, 혈액 가스 분석장치, blood gas analyzer(OMNI S6, Roche Diagnostics, Switzerland)를 이용하여 pH, 산소 분압(partial pressure of arterial oxygen; PaO₂) 및 이산화탄소 분압(partial pressure of arterial oxygen; PaCO₂)을 각각 측정하였다.

9. BALF 수집

LPS 투여 5시간 후, Dunn²⁰⁾ 등의 방법에 따라, 경부와 흉부를 열어, 조직병리학적 검사에 사용할 좌측 폐를 보호하기 위해, 좌측 주 기관지를 결찰한 다음, 기관에 삽관하고 2번에 걸쳐 inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, USA) 용액을 0.5 ml을 주입하여, 30초간 흉부를 마사지한 후 폐로부터 세포 부유액, 즉 BALF를 얻어냈다.

10. BALF 내 단백질 및 LDH 측정

BALF 내 단백질 함량은 bovine serum albumin(Sigma, MO, USA)을 standard로 이용하여, Lowry²¹⁾ 등에 따라, bicinchoninic acid assay로 측정하였으며, LDH 함량은 Bergmeyer²²⁾의 방법에 따라, enzymatic

analysis로 측정하였다.

11. BALF 내 총 세포 수, 호중구 및 폐포 대식세포 비율 측정

BALF를 1:1의 비율로 Trypan blue와 혼합한 다음 hemocytometer(Fisher Scientific, PA, USA)를 이용하여 총 세포 수를 $\times 10^4$ /BALF 1 ml로 계산하였다. 준비된 BALF를 slide glass에 도말한 후 Giemsa(Fischer, MO, USA) 염색 하여 현미경 하에서 총 100개의 세포 중 호중구 및 폐포 대식세포의 수를 기록하였다.

12. 폐 내 MDA 및 MPO 측정

모든 실험동물은 최종 희생일에 18시간 이상 절식 후 개흉하여 폐 조직을 적출한 다음, 멸균 생리 식염수로 세척하고 주변 지방 조직을 제거하였다. 이후 Kavutcu²³⁾ 등의 방법으로 in 9 vols ice-cold 0.15 M/l KCl 및 1.9 mM/l ethylenediaminetetraacetic acid 가 함유된 용액에서 homogenize하고, 상층액을 분리하여 MDA를 측정하였다. 폐 내 단백질 함량은 Lowry²²⁾ 등의 방법으로 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화 정도는 Asakawa 와 Matsushita²⁴⁾의 방법으로 2-thiobarbituric acid를 이용하여, 흡광도 525nm에서 측정하여, MDA nmol/mg protein 단위로 측정하였다. 또한 염증 지표인 MPO 함량을 Liu²⁵⁾ 등의 방법에 따라, 측정 Kit(Nanjing Jiancheng Biochemistry Co., Nanjing, China)를 이용하여 흡광도 620 nm에서 MPO U/mg protein 단위로 측정하였다.

13. Proinflammatory cytokine 측정

Gamze²⁶⁾ 등의 방법에 따라, BALF 수거 직후 $4,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 준비하였으며, 폐 조직을 Ultra Turrax T25 basic homogenizer (IKA Labortechnik, Janke and Kunkel GmbH, Co. Germany)로 homogenize 하여, $4,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 이후 BALF 및 폐 homogenize 상층액에서 ELISA kits (Med-Systems Diagnostics GmbH, Vienna, Austria)를 이용하여, Proinflammatory cytokine인 TNF- α 와 IL-1 β 의 함량을 각각 측정하였다.

14. 조직 병리학적 관찰

좌측 폐 조직을 분리하여 10% neutral buffered formalin에 고정된 후, 탈수, 포매를 거쳐 파라핀 block을 준비하고, 3 μ m의 조직 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다. 또한 폐포공간비율 (luminal surface of alveolus 이하 LSA), 폐포 벽의 두께 및 다형핵 백혈구 (polymorphonuclear neutrophils 이하 PMNs)의 수를 각각 CCD imageanalyzer (DMI-300, DMI, Korea)를 이용하여, %, μ m 및 $\times 5/1 \text{ mm}^2$ of filed 로 측정하였다.

15. 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음

least-significant differences(LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U test를 실시하여 군 간의 유의성을 검증하였다.

모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다. 또한 LPS에 의한 급성 폐 손상의 유발 정도를 파악하기 위하여 정상 대조군과 LPS 유발 대조군과의 percent change를 아래의 공식 [4]을 이용하여 측정하였으며, 투여 물질의 약효를 좀 더 명확하게 하기 위하여 검액 투여군과 LPS 대조군과의 percent change를 아래의 공식 [5]를 이용하여 각각 측정하였다.

EQUATION [4]. Percentage Changes as Compared with Intact Control (%)

$$= ((\text{Data of LPS control} - \text{Data of intact control}) / \text{Data of intact control}) \times 100$$

EQUATION [5]. Percentage Changes as Compared LPS Control (%)

$$= ((\text{Data of administered groups} - \text{Data of LPS control}) / \text{Data of LPS control}) \times 100$$

결 과

1. 체중 변화

α-lipoic acid 투여군, 시호 물 추출물 및 홍국발효 시호 추출물에서, 정상 및 LPS 대

조군에 비해 의미 있는 체중 및 체중증가량의 변화는 인정되지 않았으며, LPS 대조군에서도 정상 대조군과 비교하여, 의미 있는 체중 및 체중증가량의 변화는 실험 전 기간 동안 인정되지 않았다 (Fig. 1, 2).

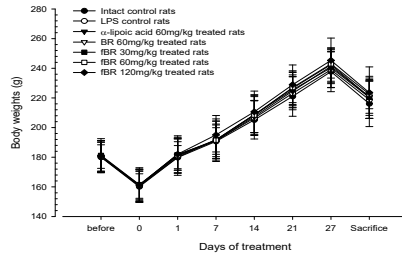


Figure 1. Body weight changes. No meaningful changes on the body weights were detected in all LPS treated groups as compared with intact control throughout 28 days of experimental periods, respectively. Values are expressed mean ± SD of 16 rats. LPS; Escherichia coli 0111:B4 lipopolysaccharide(500 μg/head), BR; Bupleuri Radix aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. Day 0 means at start of test article administration. All animals at LPS treatment day, sacrifice and Day 0 were overnight fasted.

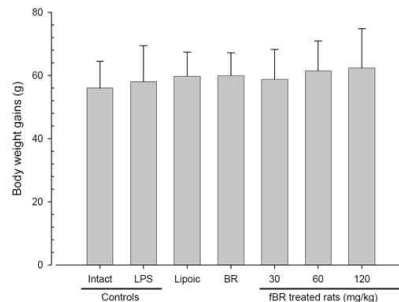


Figure 2. Body weight gains. No meaningful changes on the body weight gains during 028 days of experimental periods were detected in all LPS treated groups as compared with intact control, respectively. Values are expressed mean ± SD of 16 rats. LPS; Escherichia coli 0111:B4 lipopolysaccharide(500 μg/head), Lipoic; α-lipoic acid 60 mg/kg treated rats. BR; Bupleuri Radix aqueous extracts 60 mg/kg treated rats. fBR; Red-Koji fermented Bupleuri Radix aqueous extract.

2. 폐 중량 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 폐 상대 및 절대 중량치가 각각 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 발효시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 폐 상대 및 절대 중량치의 유의성 있는($p<0.01$) 감소가

각각 인정되었다.

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 폐 중량 증가 억제 효과를 나타내었다(Tab. 2).

Table 2. Changes on the Lung Weights.

Groups		Lung Weights	
		Absolute (g)	Relative (%) of Body Weights
Controls	Intact	1.455±0.142	0.696±0.118
	LPS	2.208±0.147 ^a	1.036±0.079 ^d
Reference	α -lipoic acid	1.730±0.104 ^{ac}	0.778±0.072 ^f
	BR	1.751±0.093 ^{ac}	0.791±0.028 ^{ef}
fBR	30 mg/kg	1.676±0.129 ^{ac}	0.754±0.047 ^f
	60 mg/kg	1.605±0.078 ^{bc}	0.726±0.040 ^f
	120 mg/kg	1.516±0.098 ^c	0.697±0.065 ^f

Values are expressed Mean ± SD of eight rats. LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide(500 μ g/head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. ^a $p<0.01$ and ^b $p<0.05$ as compared with intact control by LSD test. ^c $p<0.01$ as compared with LPS control by LSD test. ^d $p<0.01$ and ^e $p<0.05$ as compared with intact control by MW test. ^f $p<0.01$ as compared with LPS control by MW test.

3. 폐혈관 투과도 변화

모든 시험군에서 서로 유사한 혈중 투여 albumin 농도를 나타내었고, LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 폐 내 잔존 albumin 농도의 증가를 나타내어, 폐혈관 투과도의 증가를 확인할 수 있었다.

한편, α -lipoic acid, 시호 물 추출물 30, 60, 120 mg/kg 용량의 홍국발효 시호 추출물

투여군에서 LPS 대조군에 비해 폐 내 잔존 albumin 함량이 유의성 있게 감소하였고 ($p<0.01$), 폐 혈관 투과도 또한 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 폐혈관 투과도 증가 억제 효과를 나타내었다 (Tab. 3).

Table 3. Changes on the Pulmonary Transcapillary Albumin Transit Test

Groups		Intensity of [¹²⁵ I] Albumin (cpm)		Permeability Index (B/A)
		Blood (A)	Lung (B)	
Controls	Intact	0.552±0.092	0.008±0.003	0.014±0.007
	LPS	0.546±0.069	0.101±0.016 ^a	0.185±0.030 ^a
Reference	α-lipoic acid 60 mg/kg	0.560±0.078	0.052±0.014 ^{ab}	0.093±0.026 ^{ab}
	BR 60 mg/kg	0.545±0.069	0.052±0.013 ^{ab}	0.097±0.032 ^{ab}
fBR	30 mg/kg	0.547±0.069	0.046±0.012 ^{ab}	0.085±0.024 ^{ab}
	60 mg/kg	0.546±0.077	0.040±0.011 ^{ab}	0.075±0.023 ^{ab}
	120 mg/kg	0.553±0.034	0.028±0.011 ^{ab}	0.050±0.018 ^{ab}

Values are expressed Mean ± SD of eight rats. LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharid (500 μg/head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. ^ap<0.01 as compared with intact control by LSD test. ^bp<0.01 as compared with LPS control by LSD test.

4. 동맥혈 가스 지표 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 동맥혈의 pH 및 PaO₂가 유의성 있게 감소하였고, PaCO₂가 유의성 있게 증가하였다 (p<0.01). α-lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투

여군에서 LPS 대조군에 비해 pH 및 PaO₂가 유의성 있게 증가하였고, PaCO₂가 유의성 있게 감소하였다(p<0.01).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 동맥혈 가스 지표 변화 억제 효과를 나타내었다 (Tab. 4).

Table 4. Changes on the Arterial Blood Gas Parameters

Groups		pH	Partial Pressure	
			PaO ₂	PaCO ₂
Controls	Intact	7.48±0.11	110.38±10.69	30.25±2.05
	LPS	7.04±0.11 ^a	62.38±11.21 ^a	45.00±4.90 ^a
Reference	α-lipoic acid 60 mg/kg	0.560±0.078	0.052±0.014 ^{ab}	0.093±0.026 ^{ab}
	BR 60 mg/kg	0.545±0.069	0.052±0.013 ^{ab}	0.097±0.032 ^{ab}
fBR	30 mg/kg	0.547±0.069	0.046±0.012 ^{ab}	0.085±0.024 ^{ab}
	60 mg/kg	0.546±0.077	0.040±0.011 ^{ab}	0.075±0.023 ^{ab}
	120 mg/kg	0.553±0.034	0.028±0.011 ^{ab}	0.050±0.018 ^{ab}

Values are expressed Mean ± SD of eight rats. LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μg/head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. ^ap<0.01 and ^bp<0.05 as compared with intact control by LSD test. ^cp<0.01 as compared with LPS control by LSD test.

5. BALF 내 단백질 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 BALF 내 단백질 함량이 유의성 있게 증가하였다(p<0.01). α-lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서는 LPS 대조군에 비해 BALF

내 단백질 함량이 유의성 있게 감소하였다 (p<0.01).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 BALF 내 단백질 함량 증가 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

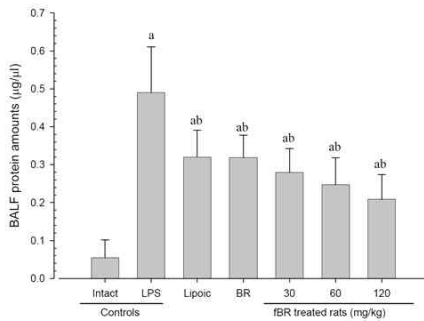


Figure 3. Changes of BALF protein levels. Note that the BALF protein levels were significantly ($p<0.01$) increased in LPS control as compared with intact control. However, these BALF protein level increases were significantly ($p<0.01$) inhibited by treatment of α -lipoic acid, BR, fBR 30, 60 and 120 mg/kg, respectively; More favorable inhibitions on the BALF protein level increases were detected in fBR 30 mg/kg as compared with 60 mg/kg of α -lipoic acid and BR treated rats in the present study. Values are expressed mean \pm SD of 8 rats. BALF; brochoalveolar lavgae fluid. LPS; Escherichia coli 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). Lipoic; α -lipoic acid 60 mg/kg treated rats. BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts 60 mg/kg treated rats. fBR; Red-Koji fermented *Bupleuri Radix* aqueous extract. ^a $p<0.01$ as compared with intact control by LSD test. ^b $p<0.01$ as compared with LPS control by LSD test.

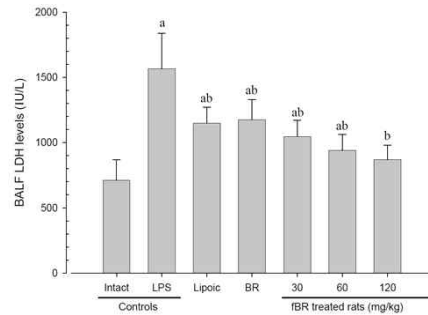


Figure 4. Changes of BALF LDH levels. Note that the BALF LDH levels were significantly ($p<0.01$) increased in LPS control as compared with intact control. It means lung cellular damages were induced by treatment of LPS. However, these BALF LDH level increases were significantly ($p<0.01$) inhibited by treatment of α -lipoic acid, BR, fBR 30, 60 and 120mg/kg, respectively; More favorable inhibitions on the BALF LDH increases were detected in fBR 30mg/kg as compared with 60mg/kg of α -lipoic acid and BR treated rats in the present study. Values are expressed mean \pm SD of 8 rats. BALF; brochoalveolar lavgae fluid. LDH; lactate dehydrogenase. LPS; Escherichia coli 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). Lipoic; α -lipoic acid 60 mg/kg treated rats. BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts 60 mg/kg treated rats. fBR; Red-Koji fermented *Bupleuri Radix* aqueous extract. ^a $p<0.01$ as compared with intact control by MW test. ^b $p<0.01$ as compared with LPS control by MW test

6. BALF 내 LDH 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 BALF 내 LDH 함량이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120mg/kg 투여군에서는 LPS 대조군에 비해 BALF 내 LDH 함량이 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적으로 BALF 내 LDH 함량 증가 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 4).

7. BALF 내 총 세포 수 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 BALF 내 총 세포 수가 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 BALF 내 총 세포 수가 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.01$ 또는 $p<0.05$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 BALF 내 세포의 수적 증가 억제 효과를 나타내었다(Tab. 5).

8. BALF 내 호중구 및 폐포 대식세포 비율 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 BALF 내 호중구 및 폐포 대식세포 비율이 각각 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS

대조군에 비해 BALF 내 호중구 및 폐포 대식세포 비율이 각각 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 호중구 및 폐포 대식세포 비율 증가 억제 효과를 나타내었다(Tab. 5).

Table 5. Changes on the Cellular Components of BALF

Groups		Total cells ($\times 10^4$ cells)	Cell Classification : Ratio(%/100 cells)	
			Neutrophil granulocytes	Alveolar macrophages
			Controls	Intact
	LPS	105.50 \pm 19.73 ^c	24.38 \pm 5.42 ^c	68.38 \pm 7.78 ^a
Reference	α -lipoic acid 60 mg/kg	79.00 \pm 17.14 ^{cf}	14.00 \pm 3.55 ^{ce}	53.25 \pm 9.00 ^{ab}
	BR 60 mg/kg	79.13 \pm 16.65 ^{cf}	14.13 \pm 3.64 ^{ce}	53.50 \pm 6.02 ^{ab}
	30 mg/kg	69.88 \pm 10.06 ^{ce}	11.88 \pm 1.55 ^{de}	47.50 \pm 6.02 ^{ab}
fBR	60 mg/kg	62.50 \pm 20.67 ^{ce}	10.50 \pm 1.41 ^e	43.75 \pm 6.56 ^b
	120 mg/kg	45.25 \pm 17.12 ^{ce}	9.38 \pm 1.69 ^e	38.50 \pm 6.99 ^b

Values are expressed Mean \pm SD of eight rats. LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). BR;

Bupleuri Radix aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. ^a $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test.

^b $p < 0.01$ as compared with LPS control by LSD test. ^c $p < 0.01$ and ^d $p < 0.05$ as compared with intact control by MW test.

^e $p < 0.01$ and ^f $p < 0.05$ as compared with LPS control by MW test.

9. 폐 내 MDA 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 폐 내 MDA 함량이 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 폐 내 MDA 함량이 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 폐 내 MDA 함량 증가 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 5).

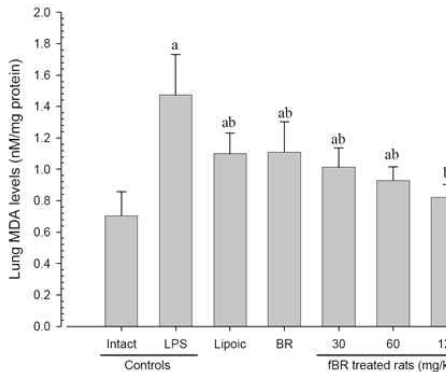


Figure 5. Changes of lung MDA levels.

Note that the lung MDA levels were significantly ($p < 0.01$) increased in LPS control as compared with intact control. It means lung LPS-induced acute lung injuries were partially mediated by oxidative stress. However, these lung MDA level increases were significantly ($p < 0.01$) inhibited by treatment of α -lipoic acid, BR, fBR 30, 60 and 120 mg/kg, respectively; More favorable inhibitions on the lung MDA increases were detected in fBR 30 mg/kg as compared with 60 mg/kg of α -lipoic acid and BR treated rats in the present study. Values are expressed mean \pm SD of 8 rats. MDA; malondialdehyde. LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). Lipoic; α -lipoic acid 60 mg/kg treated rats. BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts 60 mg/kg treated rats. fBR; Red-Koji fermented *Bupleuri Radix* aqueous extract. ^a $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test. ^b $p < 0.01$ as compared with LPS control by LSD test

10. 폐 내 MPO 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 폐 내 MPO 함량이 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 폐 내 MPO 함

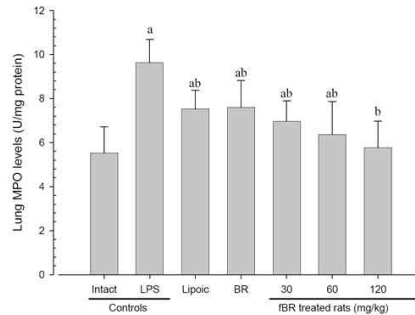


Figure 6. Changes of lung MPO levels.

Note that the lung MPO levels were significantly ($p < 0.01$) increased in LPS control as compared with intact control. It means lung inflammatory responses were induced by treatment of LPS mediated by increases neutrophil activities. However, these lung MPO level increases were significantly ($p < 0.01$) inhibited by treatment of α -lipoic acid, BR, fBR 30, 60 and 120 mg/kg, respectively; More favorable inhibitions on the lung MPO increases were detected in fBR 30 mg/kg as compared with 60 mg/kg of α -lipoic acid and BR treated rats in the present study. Values are expressed mean \pm SD of 8 rats. MPO; myeloperoxidase. LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). Lipoic; α -lipoic acid 60 mg/kg treated rats. BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts 60 mg/kg treated rats. fBR; Red-Koji fermented *Bupleuri Radix* aqueous extract. ^a $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test. ^b $p < 0.01$ as compared with LPS control by LSD test.

량이 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$)
 홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 폐 내 MPO 함량 증가 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 6).

11. Proinflammatory cytokine 변화

1) 폐 내 TNF- α 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 폐 내 TNF- α 함량이 유의성 있게 증가하였다 ($p<0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국 발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 폐 내 TNF- α 함량이 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 폐 내 TNF- α 함량 증가 억제 효과를 나타내었다(Tab. 6).

2) 폐 내 IL-1 β 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 폐 내 IL-1 β 함량이 유의성 있게 증가하였다 ($p<0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국 발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 폐 내 IL-1 β 함량이 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 폐 내 IL-1 β 함량 증가 억제 효과를 나타내었다(Tab. 6).

Table 6. Changes on the Lung Proinflammatory Cytokines Contents

Groups	Lung Proinflammatory Cytokine Contents		
	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	
Controls	Intact	99.13 \pm 13.86	149.88 \pm 32.98
	LPS	159.88 \pm 15.30 ^a	253.38 \pm 23.93 ^d
Reference	α -lipoic acid 60 mg/kg	125.25 \pm 6.02 ^{ac}	200.38 \pm 13.46 ^{de}
	BR 60 mg/kg	125.63 \pm 9.87 ^{ac}	203.50 \pm 12.18 ^{de}
fBR	30 mg/kg	117.88 \pm 8.18 ^{ac}	187.00 \pm 11.75 ^{de}
	60 mg/kg	112.25 \pm 7.80 ^{bc}	171.38 \pm 16.85 ^e
	120 mg/kg	100.63 \pm 11.53 ^c	158.88 \pm 18.98 ^e

Values are expressed Mean \pm SD of eight rats. TNF- α ; tumor necrosis factor- α . IL-1 β ; interleukin-1 β . LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. ^a $p<0.01$ and ^b $p<0.05$ as compared with intact control by LSD test. ^c $p<0.01$ as compared with LPS control by LSD test. ^d $p<0.01$ as compared with intact control by MW test. ^e $p<0.01$ as compared with LPS control by MW test

3) BALF 내 TNF- α 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 BALF 내 TNF- α 함량이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 BALF 내 TNF- α 함량이 유의성 있게 감소하였다. 감소가 유의성 있는($p<0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적으로 BALF 내 TNF- α 함량 증가 억제 효과를 나타내었다(Tab. 7).

4) BALF 내 IL-1 β 변화

LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 BALF 내 IL-1 β 함량이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 BALF 내 IL-1 β 함량이 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적으로 BALF 내 IL-1 β 함량 증가 억제 효과를 나타내었다(Tab. 7).

Table 7. Changes on the Brochoalveolar Lavage Fluid Contents

Groups		Brochoalveolar Lavage Fluid Proinflammatory Cytokine Levels	
		TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
Controls	Intact	28.13 \pm 7.53	26.25 \pm 4.06
	LPS	47.75 \pm 7.32 ^a	41.75 \pm 5.87 ^a
Reference	α -lipoic acid 60 mg/kg	38.75 \pm 3.45 ^{ab}	33.38 \pm 4.10 ^{ab}
	BR 60 mg/kg	39.00 \pm 3.85 ^{ab}	33.63 \pm 3.89 ^{ab}
fBR	30 mg/kg	35.13 \pm 3.68 ^{ab}	28.50 \pm 5.48 ^b
	60 mg/kg	32.38 \pm 3.62 ^b	26.75 \pm 4.10 ^b
	120 mg/kg	29.75 \pm 4.17 ^b	24.50 \pm 3.82 ^b

Values are expressed Mean \pm SD of eight rats. TNF- α ; tumor necrosis factor- α . IL-1 β ; interleukin-1 β . LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. ^ap<0.01 as compared with intact control by LSD test. ^bp<0.01 as compared with LPS control by LSD test

12. 폐 조직병리학적 변화

LPS 투여에 의해 염증세포의 침윤 및 폐포 벽의 비후와 이로 인한 폐포 내강의 협소화 등 전형적인 급성 염증성 폐 손상이 초래되었다. 이러한 폐 손상은 LPS 대조군에 비해 α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 감소되었다.

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 급성 염증성 폐 손상 억제 효과를 나타내었다(Fig. 7).

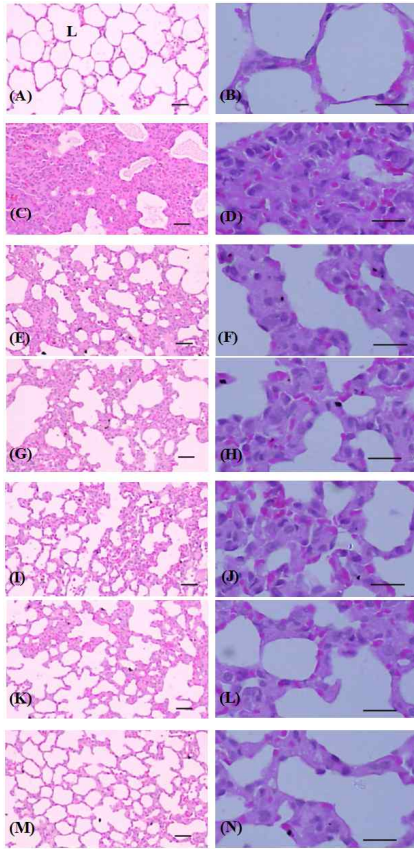


Figure 8. Changes on the lung histopathological profiles

Note that the severe PMNs infiltrations were detected in the alveolar septum of LPS control and consequently, the luminal surface (L) were decreased but the alveolar septum were increased. It is general histopathological features of LPS-induced lung acute injuries. However, these lung histopathological changes were markedly inhibited by treatment of α -lipoic acid, BR, fBR 30, 60 and 120 mg/kg, respectively; More favorable inhibitions on the LPS-induced lung histopathological changes were detected in fBR 30 mg/kg as compared with 60 mg/kg of α -lipoic acid and BR treated rats in the present study. LPS; Escherichia coli 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μ g/head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. PMNs; polymorphonuclear neutrophils. A, B: Intact control; C, D: LPS control; E, F: α -lipoic acid 60 mg/kg treated group; G, H: BR 60 mg/kg treated group; I, J: fBR 30 mg/kg treated group; K, L: fBR 60 mg/kg treated group; M, N: fBR 120 mg/kg treated group. All hematoxylin-eosin stain; scale bars = 40 μ m

1) LSA 변화

폐 호흡 기능을 나타내는 LSA가 LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 LSA가 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 LSA 감소 억제 효과를 나타내었다(Tab. 8).

2) 폐포 벽 두께 변화

폐포 벽 두께가 LPS 대조군에서 정상 대조군에 비해 유의성 있게 현저히 증가 하였다($p < 0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 폐포 벽 두께가 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 폐포 비후 억제 효과를 나타내었다(Tab. 8).

3) PMNs 수적 변화

폐 내 PMNs 수가 LPS 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가 하였다($p < 0.01$). α -lipoic acid, 시호 물 추출물, 홍국발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg 투여군에서 LPS 대조군에 비해 PMNs의 수가 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$).

홍국발효 시호 추출물은 투여 용량 의존적인 LPS에 의한 PMNs 침윤을 억제하는 효과를 나타내었다(Tab. 8).

Table 8. Changes on the Histopathological Index

Groups		Luminal Surface Area (%)	Thickness of Alveolar Septum (μm)	Number of Polymorphonuclear Neutrophils ($\times 5/\text{mm}^2$ field)
Controls	Intact	81.47 \pm 8.01	16.27 \pm 6.76	17.75 \pm 4.06
	LPS	33.34 \pm 6.18a	103.50 \pm 15.70 c	254.63 \pm 39.64c
Reference	α -lipoic acid 60mg/kg	46.83 \pm 4.52ab	71.15 \pm 22.07ce	170.00 \pm 21.31cd
	BR 60mg/kg	45.70 \pm 6.20ab	71.49 \pm 12.83cd	170.75 \pm 22.58cd
	30mg/kg	53.68 \pm 10.11ab	61.53 \pm 10.00cd	145.75 \pm 28.04cd
fBR	60mg/kg	65.37 \pm 7.76ab	45.37 \pm 6.75cd	96.25 \pm 13.48cd
	120mg/kg	69.57 \pm 10.04ab	38.75 \pm 7.50cd	73.25 \pm 7.80cd

Values are expressed Mean \pm SD of eight rats. LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (500 μg /head). BR; *Bupleuri Radix* aqueous extracts. fBR; Red-Koji fermented BR. ^ap<0.01 as compared with intact control by LSD test. ^bp<0.01 as compared with LPS control by LSD test. ^cp<0.01 as compared with intact control by MW test. ^dp<0.01 and ^ep<0.05 as compared with LPS control by MW test.

고 찰

ARDS는 양측 폐에 전반적인 심각한 손상이 급성으로 발생하는 임상 증후군으로, 심한 저산소증, 고투과성 폐부종, 폐혈관의 저항 증가, 폐탄성 감소, 호중구 침윤 등의 특징을 나타낸다¹⁾. 심한 ARDS환자를 적절히 치료하면 생존율이 60%정도이며, ARDS에 의한 심한 저산소혈증을 발견하고 치료하지 않으면 90%에서 심폐정지가 온다^{1,3)}.

ARDS에서 폐포 상피세포와 모세혈관 내피세포로 구성된 폐포-모세혈관 장벽(alveolar-capillary barrier)의 손상은 가장 중요한 병태생리학적 특징이다. 급성기에 내피세포의 손상과 혈관 투과성이 증가하게

되면 폐포-모세혈관 장벽의 투과성이 증가하게 되어 단백질이 풍부한 삼투액이 폐포 안으로 들어오게 되는데 그렇게 되면 삼투압 경사가 사라져 폐부종이 빨리 악화된다. 즉, 폐포 상피세포의 손상 정도는 환자의 예후에 영향을 준다. 또한 폐포 상피세포의 손상은 제2형 폐포 세포에서 생산되는 계면활성제의 이상을 초래하여 폐포 허탈은 더욱 악화된다^{3,27,28)}.

폐혈관 내피세포의 손상은 활성화된 호중구가 폐혈관 내피세포에 유착된 후 분비되는 free radical에 의해 발생하는데²⁾, 실험동물에서 급성 폐 손상의 정도가 호중구 작용 억제에 의해 감소되며²⁹⁾, 또한 급성 폐 손상이 항산화제 투여에 의해 완화되는 것이 보고 되었다¹⁹⁾.

柴胡는 산형과에 속한 다년생 초본인

柴胡 (*Bupleurum falcatum* Linne)의 뿌리를 건조 한 약재로 菝 山菜, 茹草, 柴草 등의 異名이 있고, 性味가 微寒, 苦하고 和解退熱, 疏肝解鬱 및 升舉陽氣하는 효능이 있어서⁹⁾, 半表半裏의 邪氣를 치료하기에 적합하므로 傷寒의 寒熱往來, 胸脇苦滿, 肝氣鬱結 및 久瀉脫肛, 月經不調 에 사용되고 있는 대표적인 解表藥의 하나다³⁰⁾. 또한 saponin, sapogenin, sterol, fatty acid, carbohydrate 와 flavonoids 등이 있으며 그 중에서 saponin이 주성분으로 알려져 있고 saikosaponin a,c,d 등으로 이들이 중추신경 계통 작용이 현저하여 진정, 진통, 해열, 체온저하 및 진해작용, 간 장애 개선작용^{6,31)} 이 있다고 알려져 있으며, 이외에도 면역증강 효과³²⁾, 친식 억제 효과³³⁾, 항궤양 효과³⁴⁾, 항암 효과³⁵⁾, 항염¹⁰⁾, 항 우울증 효과³⁶⁾ 등이 보고 되어있다. 현재 시호 추출물은 free radical 억제 효과⁶⁻⁸⁾와 항염 효과^{9,10)}가 알려져 있으며, 60mg/kg 전후 에서 급성 폐 손상에 유의성 있는 효과가 인정된바 있다¹¹⁾.

발효(fermentation)는 미생물의 효소작용으로 유기물을 전환시키는 것을 뜻 한다³⁷⁾. 최근 들어 여러 가지 유용한 미생물, 즉 유산균, 효모, 고초균 등을 이용하여 식품의 생리활성효능을 증가시키는 연구들이 활발히 진행되고 있다³⁸⁻⁴¹⁾. 또한 2000년 이후 발효한약에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는데, 주로 한약처방이나 단일 한약제를 전탕하여 추출한 후 발효하여 그 독성이나 약

리 효능의 변화를 연구하였다^{16,42-4)}.

Monascus 속의 홍국균의 경우 홍국균이 생산하는 홍국색소는 이미 식품첨가물로 이용되고 있을 정도로 안정성이 확보되어 있고, 홍국균 자체가 혈압상승 억제, 항산화 활성을 가지고 있으며, 콜레스테롤 생합성 효소 활성 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다^{13,14)}. 또한 인삼의 항산화 및 항 고지혈 증 활성이 홍국 발효에 의해 증가되는 것이 보고되었고¹⁵⁾, 황금의 항산화 및 항염 효과가 홍국 발효에 의해 증가되는 것이 보고된 바 있다¹⁶⁾.

본 연구에서는 시호 추출물의 홍국발효에 의한 생리활성변화를 관찰하기 위해 LPS 유발 랫트 급성 폐 손상 모델을 이용하여, 시호 물 추출물과 홍국균 (*Monascus purpureus* 12002; 한국식품개발연구원 서울. 한국)으로 발효시킨 홍국발효 시호추출물의 ARDS에 대한 효과를 비교 평가하였다. 홍국발효 시호추출물을 매일 30, 60 및 120 mg/kg의 농도로 각각 28일간 경구 투여한 이후 LPS를 투여하였고, 5시간 지난 후 모든 동물을 희생시켜 체중, 폐 중량, 폐혈관 투과도, 동맥혈의 가스 지표인 혈중 pH, PaO₂, PaCO₂를 측정하였고, BALF 내 단백질, LDH, TNF- α , IL-1 β , 총 세포 수, 호중구 및 폐포 대식세포의 비율을 측정하였다. 또한, 폐내 MDA, MPO, TNF- α 및 IL-1 β 의 변화를 폐 조직병리학적 변화와 함께 관찰하였다. 실험결과는 항산화제인 α -lipoic acid, 60 mg/kg 투여군 및 시호 물 추출물 60 mg/kg

투여군과 각각 비교하였다.

본 실험의 결과, LPS 투여에 의해 현저한, 폐 중량의 증가, 폐혈관투과도의 증가, 동맥혈 pH, 산소 분압의 감소와 이산화 탄소분압의 증가가 관찰되었고, BALF 내 단백질, LDH, 총 세포 수, 호중구 및 폐포 대식세포의 비율의 증가와 폐 내 MDA, MPO, TNF- α 및 IL-1 β 의 증가, LSA의 감소, 폐포 벽의 비후와 PMN의 수적증가가 초래되었다. 이는 지질과산화에 의한 항산화 억제와 염증반응에 의해 LPS 에 의해 급성 폐손상이 초래된 것으로 판단된다.

실험 결과를 살펴보면, LPS 대조군을 포함한 모든 실험군에서 의미 있는 체중의 변화는 인정되지 않았으며, 모든 실험동물은 정상 랫트의 체중 범주 체중증가 범주^{45,46}에 포함되었다.

LPS 투여 시 혈관누출성이 증가하여 폐 중량이 현저히 증가하는데, LPS 유발 급성 폐 손상을 판단하는 기본적인 지표로 이 같은 폐 중량의 증가가 이용된다⁴⁷. 본 실험에서도 폐 중량(절대 및 체중에 대한 상대 중량)이 LPS 투여 후 증가 되었으며, 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호추출물 투여군의 경우 폐 중량의 증가가 억제되어, 홍국발효 시호추출물이 LPS 유발 급성 폐 손상을 예방하는데 일정 부분 영향을 끼치는 것으로 간접적으로나마 추정 할 수 있다.

본 실험에서 폐포-모세혈관 누수 지표인 폐혈관 투과도¹⁸)가 LPS 투여에 의해 증가가 초래되었으며, 30 mg/kg 이상의 홍국발효

시호추출물 투여군에서 폐혈관 투과도의 증가가 억제되어, LPS 유발 급성 폐 손상에 홍국발효 시호추출물이 비교적 유효한 효과를 나타낼 것으로 추측된다. 또한 LPS로 급성 폐 손상이 유발되면 폐의 가스교환작용이 억제되어 동맥혈의 이산화 탄소분압이 증가하고 산소분압이 감소하게 되며, 이산화탄소의 증가에 의해 pH는 감소된다. LPS 유발 급성 폐 손상을 판단하는 지표로 이러한 동맥혈 가스 지표의 변화가 사용되는데^{48,49}, 본 연구에서도 LPS 투여 후 동맥혈의 이산화 탄소분압이 증가하였고, 산소 분압 및 pH가 감소하였다. 이러한 동맥혈가스 지표의 변화는 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호 물 추출물 투여군에서 감소되는 것이 관찰되었다.

LPS 투여로 급성 염증성 폐 손상이 초래되면 염증세포의 증가와 함께 BALF 내 단백질 함량이 증가하게 된다^{50,51}. 여러 가지 조직에 존재하는 효소인 LDH는 조직의 손상 시 증가하며⁵², LPS로 급성 폐 손상이 유발 될 때에도 증가 된다⁵³. 본 연구에서도 BALF 내 단백질, LDH와 염증세포가 LPS 투여에 의해 증가 되었으며, 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호 물 추출물 투여군의 경우 BALF 내 단백질, LDH와 염증세포의 증가가 억제되는 것이 관찰 되었다.

호중구에서 형성되는 효소인 MPO 는 염증의 지표로 흔히 이용되고 있으며⁵⁴, LPS 유발급성 폐 손상 시에도 상승을 나타내어, 염증반응의 지표로 활발히 이용되고 있다

⁵⁵⁾ 본 실험에서도, 폐내 MPO 함량이 증가되었으며, 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호 물 추출물 투여군에서 폐내 MPO 함량의 증가가 억제되는 것이 관찰되었다.

LPS 투여로 폐포 모세혈관의 누출성이 증가하여 PMNs의 폐포 강이나 벽 내로의 유주가 증가하고, 폐포 벽이 비후된다. 그 결과 폐포 내강비율이 감소되어 호흡곤란이 초래되므로^{56,57)}, LPS 유발 급성 폐 손상을 나타내는 직접적인 지표로 폐의 조직병리학 적 소견이 사용된다⁵⁸⁾. 폐포의 내강비율인 LSA는 폐의 기능을 나타내는 지표이다⁵⁹⁾. 이번 실험에서도 LPS 투여 후 폐포 벽이 두꺼워졌고, PMNs의 수가 증가하였으며, LSA는 감소되었다. 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호추출물 투여군에서 이러한 조직병리학 적 변화가 억제 되는 것이 관찰되었다.

지질 과산화 지표인 MDA는 활성산소와 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨지는데⁶⁰⁾, 본 연구에서도 LPS 투여 시 MDA 함량이 증가되었으며, 폐내 MDA 함량의 증가가 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호추출물 투여군에서 억제되는 것이 관찰 되었다.

ARDS에서는 폐포 대식세포와 폐모세혈관 상피세포의 활성화에 의해 혈관부착인자^{56,57)}와 proinflammatory cytokines^{61,62)}이 활성화 되어 백혈구가 폐내 유주하게 된다. 본 실험에서도 LPS 투여 후 BALF 와 폐내의 proinflammatory cytokines인 TNF- α 와 IL-1 β 가 증가되었고, 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호추출물 투여에 의해 감소되었다.

시호 추출물은 free radical scavenger 효과⁶⁻⁸⁾ 즉, 항산화 효과와 항염 효과^{9,10)}가 있어서 LPS 유발 급성 폐 손상의 緩下에 큰 역할을 할 것으로 생각되는데, 홍국발효에 의해 이러한 시호의 항산화 및 항염 효과가 현저히 증가되는 것으로 관찰 되었다.

한편 시호는 saikosaponin a, c, d, bupleuran 2llb, 2llc, 기타 phenethyl alcohol 8-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, phenethylalchol 8-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -a-D-glucopyranoside와 isopent-enol 1-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, icariside D1, icariside F2 등을 함유하고 있어⁵⁾, 향후 홍국발효에 의해 변화 또는 증가되는 생리활성 화학성분의 세밀한 검색을 수행해야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 30 mg/kg이상의 홍국발효 시호 추출물은 항염 및 항산화 효과로 LPS 유발 급성 폐 손상에 유효한 것으로 판단되었으며, 특히 홍국발효 시호 추출물 30 mg/kg은 60 mg/kg의 시호 물 추출물 및 α -lipoic acid 보다 더 우수한 폐 보호 효과를 나타내었다. 이를 볼 때 시호의 약리활성이 홍국발효에 의해 증가되는 것으로 추측된다. 향후 홍국발효에 의해 변화 또는 증가되는 생리활성 화학성분에 대한 자세한 조사가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

LPS로 유발된 rat의 급성 폐 손상에 홍국 발효 시호 추출물 30, 60 및 120 mg/kg이 미치는 영향에 대해 실험 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

폐 중량과 폐 혈관 투과도 및 동맥혈 가스 지표 (PaCO₂)의 변화는 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호 추출물 투여에 의해서 증가가 억제되었고, BALF 내 단백질과 LDH 및 염증세포(호중구 및 대식세포)의 변화 역시 30 mg/kg 이상의 홍국발효 시호 추출물 투여에 의해서 증가가 억제되었다. 또한, 폐내 MDA, MPO 함량의 변화는 30 mg/kg 이상의 발효시호 추출물 투여에 의해 증가가 억제되었고, proinflammatory cytokine인 TNF- α 와 IL-1 β 가 30 mg/kg이상의 발효시호 추출물 투여에 의해 감소되었으며, 폐의 조직병리학적 변화인 LSA(%)의 감소, 폐포 벽 두께의 현저한 비후와 PMNs의 수적 증가가 30 mg/kg 이상의 발효시호 추출물 투여에 의해 억제되었다

Reference

1. Fauci AS, Brannwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal medicine. McGraw-Hill. 2008 : 1680-4.
2. Han YC. Clinical respiratory science.

Ilchokak. 2002 : 425-37.

3. Mark HB, Robert B. The merck manual. Hanwoori 2003 : 597-602.
4. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: A clinical review. Lancet. 2007 ; 369 : 1553-64.
5. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Im JP, Hong SH. Oriental medicine pharmacology. Sinilsangsa. 2010 : 187-93.
6. Abe H, Sakaguchi M, Odashima S, Arichi S. Protective effect of saikosaponin-d isolated from *Bupleurum falcatum* L. on CCl₄-induced liver injury in the rat. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1982 ; 320(3) : 266-71.
7. Hattori T, Ito M, Suzuki Y. Studies on antinephritic effects of plant components in rats (1). Effects of saikosaponins original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms. Nippon Yakurigaku Zasshi. 1991 ; 97(1) : 13-21.
8. Matsumoto T, Moriguchi R, Yamada H. Role of polymorphonuclear leucocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by HCl/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. J Pharm Pharmacol. 1993 ; 45(6) : 535-539.
9. Lin CC, Chiu HF, Yen MH, Wu CC, Chen MF. The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (III) : The effects of *Bupleurum kaoi* and cultivated *Bupleurum falcatum* var. *komarowi*. Am J Chin Med. 1990 ; 18(3-4) : 105-12.
10. Yamamoto M, Kumagai A, Yamamura Y.

- Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. II. Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneimittelforschung*. 1975 ; 25(8) : 1240-3.
11. Woo DS. Effects of *bupleuri radix* extracts on LPS-induced rat acute lung injury. Daegu Haany University. 2009 : 1-51.
 12. Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kin SH, Ham DH. Effect of Fermented Herbal Extracts, HP-1 on Enzyme Activities and Gene Expressions Related to Alcohol Metabolism in Ethanol-loaded Rats. *J Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2007 ; 21(2) : 387-91.
 13. Huang CF, Li TC, Lin CC, Liu CS, Shih HC, Lai MM. Efficacy of *Monascus purpureus* Went rice on lowering lipid ratios in hypercholesterolemic patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007 ; 14(3) : 438-40.
 14. Tsukahara M, Shinzato N, Tamaki Y, Namihira T, Matsui T. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009 ; 158(2) : 476-82.
 15. Cha JY, Park JC, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Lee CH, Cho YS. Effect of *Monascus purpureus*-Fermented Korean Red Ginseng Powder on the Serum Lipid Levels and Antioxidative Activity in Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009 ; 38(9) : 1153-60.
 16. Kim KL, Kwon KM, Yun YJ, Lee YJ, Park DI, Kim JD, Jung TY. Effect of *red-koji* fermented *scutellariae radix* extracts on lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2012 ; 26(6) : 874-85.
 17. Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Frei B. Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 ; 104(10) : 4077-82.
 18. Nathens AB, Bitar R, Davreux C, Bujard M, Marshall JC, Dackiw AP, Watson RW, Rotstein OD. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 ; 17(5) : 608-16.
 19. Hybertson BM, Leff JA, Beehler CJ, Barry PC, Repine JE. Effect of vitamin E deficiency and supercritical fluid aerosolized vitamin E supplementation on interleukin-1 induced oxidative lung injury in rats. *Free Radic Biol Med*. 1995 ; 18(3) : 537-42.
 20. Dunn CJ, Elliot GA, Oosteven JA, Richard IM. Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea pig asthmatic response to ovalbumin inhalation. *Am Rev Respir Dis*. 1988 ; 137(3) : 541-7.
 21. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 ; 193(1) : 265-75.
 22. Bergmeyer HU. Enzymes 1 : oxidoreductases, transferases. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, and Grass I M (eds). Verlag

- Chemie, Wehneim, Deerfield Beach, FL. 1986 : 127-33.
23. Kavutcu M, Canbolat O, Oztürk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekinci C, Gökhuun IH, Durak I. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs : effects of vitamins E and C. *Nephron*. 1996 ; 72(2) : 269-274.
24. Asakawa T, Matsushita S. Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids*. 1974 ; 14 : 401-6.
25. Liu SH, Ma K, Xu B, Xu XR. Carbon monoxide inhalation protects lung from lipopolysaccharide-induced injury in rat. *Sheng Li Xue Bao*. 2006 ; 58(5) : 483-9.
26. Gamze K, Mehmet HM, Devenci F, Turgut T, İlhanF, Ozercan I. Effect of bosentan on the production of proinflammatory cytokines in a rat model of emphysema. *Exp Mol Med*. 2007 ; 39 : 614-20.
27. Goryeouihak editorial department. *Clinical internal medicine (I)*. Goryeouihak ; 2004 : 1076-89.
28. Yeh CC, Kao SJ, Lin CC, Wang SD, Liu CJ, Kao ST. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin In vivo and In vitro. *Life Sciences*. 2007 ; 80(20) : 1821-31.
29. Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, Murakami H, Itoh T, Harada, A, Nonami T, Takagi H. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. *Arch Surg*. 1995 ; 130(1) : 93-8.
30. Kim IR, Kim HC, Kook YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Song HJ, Sin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Im KH, Cho SI, Jung JK, Ju YS, Choi HY. *Herbology*. Younglimsa. 2007 : 186-8.
31. Jung KH, Kang HK. Effects of *bupleurum falcatum* extract on the acute acetaminophen-Induced hepatotoxicity. *pharmacological papers*. 1994 ; 5-6(1) : 27-34.
32. Matsumoto T, Guo YJ, Ikejima T, Yamada H. Induction of cell cycle regulatory proteins by murine B cell proliferating pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Immunol Lett*. 2003 ; 89(2-3) : 111-8.
33. Park KH, Park JM, Koh DS, Lim YH. Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum* on experimental allergic asthma. *Phytother Res*. 2002 ; 16(4) : 359-63.
34. Matsumoto T, Sun XB, Hanawa T, Kodaira H, Ishii K, Yamada H. Effect of the antiulcer polysaccharide fraction from *Bupleurum falcatum* L. on the healing of gastric ulcer induced by acetic acid in rats. *Phytother Res*. 2002 ; 16(1) : 91-3.
35. Hsu MJ, Cheng JS, Huang HC. Effect of saikosaponin, a triterpene saponin, on apoptosis in lymphocytes : association with c-myc, p53, and bcl-2 mRNA. *Br J Pharmacol*. 2000 ; 131(7) : 1285-93.
36. Hong SY, Park SD. The effect of *Bupleurum falcatum* L. on the catecholamines of depression rat model. *Kor J Herbology*. 2003 ; 18(4) : 245-53.
37. Sim SK, Son HS, Sim CH, Yun WH, Hwang JH, Bang BH. *Fermented food science*. Jinro. 2001 : 11.

38. Bae EA, Hyun YJ, Choo MK, Oh JK, Ryu JH, Kim DH. Protective effect of fermented red ginseng on transient focal ischemic rats. *Arch Pharm Res.* 2004 ; 27 : 1136-40.
39. Jung YM, Lee SH, Lee DS, You MJ, Chung IK, Cheon WH, Kwon YS, Lee YJ, Ku SK. Fermented garlic protects diabetic, obese mice when fed a high-fat diet by antioxidant effects. *Nutr Res.* 2011 ; 31(5) : 387-96.
40. Trinh HT, Han SJ, Kim SW, Lee YC, Kim DH. *Bifidus* fermentation increases hypolipidemic and hypoglycemic effects of red ginseng. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 ; 17(7) : 1127-33.
41. Lee SI, Shin JG, Kim SD. Effect of red ginseng-chungkukjang extracts on lipid profiles of serum in alcohol administered diabetes-induced rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2005 ; 34(9) : 1362-6.
42. Chung TH, Shin KS, Kim DS, Lee JH, Ma JY. Single dose oral toxicity and genotoxicological safety study of ssanghwa-tang fermented with lactobacillus acidophyllus. *J Korean Oriental Med.* 2011 ; 32(1) : 67-83.
43. Han JH, Lee SY. Comparing medical efficacy of socheongyoung-tang with lactic acid bacteria fermented socheongyoung-tang. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2011 ; 25(2) : 246-56.
44. Park JC, Choi HY, Kim JD. Mouse single oral dose toxicity test of *red koji* fermented *scutellariae radix* aqueous extracts. *Herbal Formula Science.* 2013 ; 21(1) : 186-99.
45. Fox JG, Cohen BJ, Loew FM. *Laboratory animal medicine.* Orlandoc Press. Inc. 1984.
46. Tajima Y (Ed). *Biological reference data book on experimental animals.* Soft Science Inc. 1989.
47. Huang KL, Chen CS, Hsu CW, Li MH, Chang H, Tsai SH, Chu SJ. Therapeutic effects of baicalin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Am J Chin Med.* 2008 ; 36(2) : 301-11.
48. Li-ying Z, Zhong-yuan X, Fang X, Bang-chang C. Effect of radix paeoniaerubra on expression of p38 MAPK/iNOS/HO-1 in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Chin J Traumatol.* 2007 ; 10(5) : 269-74.
49. Zhou GJ, Zhang H, Zhi SD, Jiang GP, Wang J, Zhang M, Gan JX, Xu SW, Jiang GY. Protective effect of raloxifene on lipopolysaccharide and acid- induced acute lung injury in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2007 ; 28(10) : 1585-90.
50. Yeh CC, Lin CC, Wang SD, Chen YS, Su BH, Kao ST. Protective and anti-inflammatory effect of a traditional Chinese medicine, Xia-Bai-San, by modulating lung local cytokine in a murine model of acute lung injury. *Int Immunopharmacol.* 2006 ; 6(9) : 1506-14.
51. Wang XD, Lu YL, Lai RC, Li YP, Huang W, Xu M. Protective effect of ketamine against acute rat lung injury induced by lipopolysaccharide and its mechanism. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007 ; 27(12) : 1848-50.
52. Chin JY, Koh YS, Kim MJ, Kim HS, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Lim CM. The effects of hypothermia on endotoxin-primed lung. *Anesth Analg.* 2007 ; 104(5) : 1171-8.

53. Xiao GL, Luo ZQ, Xiao G, Li C, Xiong XD, Yang Y, Liu HJ. High-density lipoprotein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Sheng Li Xue Bao.* 2008 ; 60(3) : 403-8.
54. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984 ; 87(6) : 1344-50.
55. Xu XL, Xie QM, Shen YH, Jiang JJ, Chen YY, Yao HY, Zhou JY. Mannose prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Inflamm Res.* 2008 ; 57 : 104-10.
56. Squadrito F, Altavilla D, Canale P, Ioculano M, Campo GM, Ammendolia L, Squadrito G, Saitta A, Calapai G, Caputi AP. Contribution of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) to the pathogenesis of splanchnic artery occlusion in the rat. *Br J Pharmacol.* 1994 ; 113(3) : 912-6.
57. Ulich TR, Howard SC, Remick DG, Yi ES, Collins T, Guo K, Yin S, Keene JL, Schmuke JJ, Steining CN, Welply JK, Williams JH. Intratracheal administration of endotoxin and cytokines VIII : LPS induces E-selectin expression. *Inflammation.* 1994 ; 18 : 389-98.
58. Marzocco S, Piccinelli AL, Rastrelli L, Mazzon E, Cuzzocrea S, Autore G. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo by a water-soluble extract of *Wendita calysina* leaves. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2007 ; 375 : 349-58.
59. Choi HY, Jung TY, Ku SK, Yang HB, Lee HS. Toxicopathological study of p, p-DDE after experimental aerosol exposure to ICR Mouse. *J Toxicol Pub Health.* 2005 ; 21(2) : 151-60.
60. Gebska A, Olszanecki R, Korbut R. Endotoxaemia in rats : role of leukocyte sequestration in rapid pulmonary nitric oxide synthase-2 expression. *J Physiol Pharmacol.* 2005 ; 56 : 299-311.
61. Berg JT, Lee ST, Thepen T, Lee CY, Tsan MF. Depletion of alveolar macrophages by liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *J Appl Physiol.* 1993 ; 74(6) : 2812-9.
62. Van Nhieu JT, Misset B, Lebargy F, Carlet J, Bernaudin JF. Expression of tumor necrosis factor-alpha gene in alveolar macrophages from patients with ARDS. *Am Rev Respir Dis.* 1993 ; 147(6) : 1585-1589.