

大韓外官科學會誌：第14卷 第1號
The Journal of Oriental Medical Surgery,
Ophthalmology & Otolaryngology
Vol. 14, No 1, May 2001.

楡白皮의 抗炎 및 組織再生에 對한 實驗的 研究

申延祥 · 李竣成 · 盧石善*

* 大田大學校 韓醫科大學 外官科學教室

I. 緒 論

瘡瘍의 發生에 對하여 《黃帝內經》¹⁾에서는 膏梁厚味, 營衛不和 및 運氣의인 原因으로 보았으며 또한, 寒氣가 經絡에 侵犯하면 血凝이 되고 血이 不通되어서 衛氣가 循環되지 않으므로 腫이 發生되고 寒氣가 熱로 變하여 熱이 많으면 肉이 腐蝕되어 膿이 形成된다고 하였다. 華²⁾는 營衛壅塞이나 五臟六腑의 蓄毒으로 因한다고 보았으며, 劉³⁾를 포함한 大部分의 醫家^{4,5)}는 火와 熱을 瘡瘍의 主된 原因으로 보았다.

瘡瘍의 治法은 初期, 成膿期, 後期의 三段階로 分類하고 治法도 이에 따라서 消, 托, 補의 세가지로 分類되는데, 그 중 消法은 消散하는 作用이 있는 藥物을 使用하여 病變의 損傷을 膿이 없는 狀態에서 消散시키며, 托法은 透膿法과 補托法으로 나누어서 透托의 作用을 가진 藥物을 使用해서 迅速히 化膿, 消退시키거나 또는 化膿되어 있지 않은 것을 消退시키도록하며, 補法은 補益하는 藥物을 使用하여 損을 益하고 虛를 補하여 瘡瘍의 後期에 사용한다⁶⁾.

生肌란 肌肉의 生長이나 瘡瘍에서 腐肉이 없어지고 新肉이 생기는 過程을 뜻하는 것으로 解釋할 수 있는데 生肌와 關係되는 內容으로는 《素問·平人氣象論》¹⁾에서 “脾臟肌肉之氣也”라 하여 肌肉의 生長健壯이 脾와 關聯이 있음을 說明하였고, 《靈樞·五閱五使篇》¹⁾에서는 “血氣有餘 肌肉堅治”라 하여 氣血의 充養이 肌肉과 密接한 關係가 있음을 說明하였다.

榆白皮는 참느릅나무의 樹皮로서 味는 甘하고 性은 平·無毒하여 주로 胃, 大腸, 小腸經으로 歸經하며 利水, 通淋, 消癰腫, 滲濕熱, 行津液 등의 效果가 있어서 小便不通, 淋濁, 癰疽發背, 丹毒, 疥癬 등을 治療하며 水道를 잘 通하게 하고 邪氣와 腸胃의 邪熱을 없애며 부은 것을 빠지게 하는 效

能이 있다⁷⁻¹⁰⁾.

最近 消炎 및 抗菌作用에 對한 實驗的 研究로는 姜¹¹⁾의 “托裏消毒飲의 消炎作用에 對한 實驗的 研究”, 金¹²⁾의 “回春涼膈散이 抗알레르기 및 消炎, 鎮痛, 解熱效果에 미치는 影響” 등이 있고, 組織再生에 對한 研究로는 黃¹³⁾의 “艾灸 損傷皮膚의 治愈過程에 關한 組織學的 研究”, 辛¹⁴⁾의 “十全大補湯이 生肌作用에 미치는 影響” 등이 있으나, 榆白皮의 抗炎作用, 免疫反應 및 組織再生에 對한 實驗的 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 in vivo로 廣範圍한 韓方 및 植物抽出物을 利用한 MMP活性에 對한 抑制效果를 研究하였고, 特히 榆白皮(Ulmi cortex)의 抗炎症 및 組織再生에 對한 實驗的 研究를 위하여 in vitro 모델로 人體의 纖維芽細胞, 單核細胞, 中性白血球와 흰쥐의 單核細胞를 利用한 細胞毒性實驗, superoxide 生成 抑制效果, immunoassay를 利用한 prostaglandins(PGE₂) 및 interleukins(IL-1 β) 生成 抑制效果, ¹⁴C-proline를 利用한 collagen 合成 및 ³H-thymidine를 利用한 細胞增殖 促進效果인 DNA 合成, collagenase 活性 抑制效果를 測定하는 實驗을 하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 人體

單核細胞 및 中性白血球의 分離培養은 全身疾患이 없는 成人으로 부터 구연산을 抗凝固劑로 使用하여 320ml의 靜脈血液을 採集하였고, 纖維芽細胞 分離培養은 產婦人科에서 生後 3日된 幼兒의 包莖手術時 切開된 袍皮組織을 直徑 3.5mm petri dish에서 無菌的으로 細密하게 切開하여 使用하였다.

2) 動物

生後 8週齡의 female hairless mouse(LG화학 기술원 바이오텍 연구소) 18마리를 溫度 24±3℃, 相對濕度 55±5%, 換氣回數 10-12回/hr, 照明 (07:00-19:00), 照度 150-200 lux로 設定된 動物室에서 마우스용 固形飼料(퓨리나사료(주))를 自由 給食시켰고 飲水는 상수도 물을 자유롭게 攝取시켰다. 動物入手 後 약 1週日間 動物室에서 順化시켰으며 順化期間中 一般狀態를 觀察하여 健康한 動物만을 實驗에 使用하였다.

3) 藥材

實驗에 使用한 藥劑는 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였다.

Prescription of Ulmus parvifolia(UP)

韓藥材名	生藥名	重量(g)
楡白皮	Ulmus parvifolia	150

單味劑

韓藥材名	生藥名	重量(g)
白檀香		100
桃仁		100
細辛		100
麥芽糖		100
沒藥		100
覆盆子		100
連翹		100
玄蔘		100
楡白皮		100
Total amount		900

2. 實驗方法

1) 韓藥抽出物과 Collagenase Kilt를 利用한 Collagenase 酵素 活性

삼각 플라스크에 Gelatin 0.1g(0.1%)과 Agar 1g(1%)를 100 의 Collagenase buffer(50mM tris-HCl buffer, CaCl₂, 0.15M NaCl)에 분산시킨

후 전자레인지에 2분간 가열하여 완전히 용해시켰다. 2개의 6-Well Plate를 준비하여 10%, 5%, 1%, 0.5%의 Doxycycline과 천연물 Soln를 각 Well에 10씩 첨가하고(Blank와 Control군에는 DMSO만 10씩 첨가) 용해시킨 Gelatin-Agar 용액을 Well 당 1 되게 첨가하여 Final Concentration이 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005% 가 되게 잘 혼합하고, Gelatin-Agar 용액이 응고된 후에 핀셋으로 직경 60 의 paper disc를 중앙에 놓고 100 ppm의 Bacterial Collagenase(from Clostridium histolyticum, Sigma)를 30 씩 떨어뜨린다. 상온에서 1시간 동안 6-Well Plate를 유지시켜 Collagenase가 충분히 확산되도록 한 후에 37에서 Overnight Incubation시켰다. Paper disc를 제거한 후 1ml의 Coomassie Blue(1.78g in 45%Ethanol and 10% CH₃COOH)용액에 15분 동안 염색한후 염색용액을 버리고, 2ml의 Destain용액(30% Ethanol and 10% CH₃COOH)을 添加하여 30분 동안 脫色시켰다.

2) 檢液調劑

楡白皮를 HBSS 緩衝溶液에 溶解시켜 試驗濃度는 各 試驗方法에 따라 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001% 濃度を 製造하여 實驗에 使用하였다.

3) 採血 및 血清과 細胞分離培養

① 單核細胞의 分離培養

全身疾患이 없는 健康한 成人으로부터 구연산을 抗凝固劑로 使用하여 320ml의 靜脈血液을 採集하였다. 採集된 靜脈血液을 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離한 後에 一次的으로 中層의 白血球 濃縮液을 回收하여 二次的으로 RPMI 1640 培地와 1:1의 比率로 稀釋한 後에 50ml의 遠心分離管에 ficoll-paque(pharmacia biotech) 12ml을 添加한 後에 稀釋된 血液 30ml을 中層이 되도록 주의깊게 添加하여 1600rpm에서 30分 동안 遠心分離한 後

에 血清이 包含된 上層을 除去하고 單核細胞가 含有된 中層을 주의깊게 稀釋한 다음에 3배의 RPMI 1640 培地를 添加하고 800rpm에서 10分 동안 遠心分離 시킨 다음 上騰液을 버리고 RPMI 1640 培地를 10ml 添加하고 부드럽게 pipetting 한 다음에 800rpm에서 10分 동안 遠心分離한 後에 上騰液을 버리고 RPMI 1640 培地를 添加하여 pipetting 한 後에 24-well plate에 10^6 cell/well로 분주하고 95% 공기, 5% CO_2 , 100% 濕度 條件下에서 無菌的으로 培養하였다.

② 中性白血球의 分離培養

全身疾患이 없는 健康한 成人으로부터 구연산을 抗凝固劑로 使用하여 320ml의 靜脈血液을 採集하였다. 採集된 靜脈血液을 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離한 後에 一次的으로 中層의 白血球 濃縮液을 回收하여 二次的으로 RPMI 1640 培地와 1:1의 比率로 稀釋한 後에 50ml의 遠心分離管에 ficoll-paque(pharmacia biotech) 12ml을 添加한 後에 稀釋된 血液 30ml을 中層이 되도록 주의깊게 添加하여 1600rpm에서 30分 동안 遠心分離한 後에 血清이 包含된 上層液과 單核細胞 및 ficoll-paque를 除去하고 沈澱된 赤血球 및 中性白血球에 同一量의 RPMI 1640를 添加하고 PBS 緩衝液에 溶解시킨 3% dextran 20ml을 添加하여 10分 동안 常溫에서 放置시킨 後에 中性白血球가 豊富한 上騰液을 取하여 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離 시키고 上騰液을 버린다. 남아있는 赤血球를 除去하기 위하여 먼저 0.2%의 PBS 緩衝液 10ml을 30秒 동안 處理한 後에 1.6% PBS 緩衝液을 즉시 添加하여 等張液으로 回復시킨 後에 細胞浮遊物을 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離 시킨 後에 上騰液을 버리는 方法으로 赤血球 溶血을 한번 더 反復한 後에 RPMI 1640 培地를 添加하여 pipetting 한 後에 24-well plate에 10^6 cell/well로 분주하고 95% 공기, 5% CO_2 , 100% 濕度 條件下에

서 無菌的으로 培養하였다.

③ 纖維芽細胞의 分離培養

産婦人科에서 生後 3日된 乳兒의 包莖手術時 切開된 袍皮組織을 直徑 3.5mm petri dish에서 無菌的으로 細密하게 切開하여 penicillin, streptomycin, fetal bovine serum 10%를 含有하는 DEME 培地에서 2週 동안 培養한 後에, 바닥에 붙은 纖維芽細胞를 trypsin 溶液을 2번 處理하여 버리고 血清含有 培地를 添加하여 여러번 pipetting 한 後에 새로운 culture bottle에 細胞를 분주하여 subculture 하였다.

4) Cytotoxicity test

生後 3日된 乳兒의 袍皮로 부터 primary culture한 纖維芽細胞 血液으로 부터 純粹分離 培養한 monocyte를 24-well plate에 10^6 cell/well 되도록 분주한 다음 10% FBS가 含有된 DEME 및 RPMI 1640 培地에서 하루동안 培養한 다음날 既存의 培地를 新鮮한 培地로 交替하여 24時間 동안 培養한 後에 HBSS 緩衝液으로 바닥에 붙은 細胞層을 洗滌한 다음 血清이 包含되지 않은 MEM 培地 0.9ml를 添加한 다음, 楡白皮를 試驗濃度 100 μ l를 添加한 다음 24時間 培養한 後에 HBSS 緩衝液에 溶解시킨 MTT(methyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)溶液 0.5ml을 各 well에 넣고 4時間 동안 培養한 後에 MTT 溶液을 除去하고 formazon 結晶을 溶解시키기 위하여 DMSO를 500 μ l씩 添加하였다. Plate를 잘 흔든 後에 microplate reader로 570nm에서 吸光度를 測定하였다. 對照群으로는 매 實驗마다 實驗溶液이 들어있지 않은 MEM 培養液 well을 使用하였다. 모든 實驗結果는 對照群에 對한 百分率로 計算하였다.

5) Macrophage 및 neutrophil의 superoxide

生成測定

24-well plate를 사용하여 각 well당 HBSS 緩衝溶液에 稀釋시킨 사람의 macrophage 혹은 neutrophil, mouse macrophage(ATCC TIB 67)를 10⁶cell/well 되게 아래와 같이 添加하고 FMLP를 處理하고 37°C에서 15分 동안 培養하여 細胞를 刺戟한 다음에

- *. macrophage 10⁶개 0.45ml
- *. FMLP 10⁻⁶M 0.05ml

cytochrome C, superoxide dismutase, HBSS를 다음과 같이 處理 한 後 37°C에서 10分間 保溫하고

- *. 試驗物質 ×10 濃縮 0.1ml
- *. cytochrome C 80 μM 0.1ml
- *. superoxide dismutase 30μg 0.1ml
- *. HBSS solution 1.01ml(總反應液)

刺戟物質인 opsonized zymosan A를 最終濃度 1.3 mg/ml 되게 1ml을 添加하고 振蕩하면서 37°C에서 90分間 保溫한 後에, 4°C에 10分間 넣어 反應을 停止시킨 다음에 4°C, 1500rpm, 10min. 동안 遠心分離한 後 上騰液을 550nm에서 optical density를 測定하고 superoxide anion의 生成量은 다음식에 의하여 計算된다.

$$\Delta O.D.$$

$$O^{-2} \equiv \frac{\Delta O.D.}{21.0} \times 10^3(\text{nmoles}/10^6 \text{ cell.min})$$

$$\Delta O.D. \equiv (B-D)-(A-C) \equiv (B+C)-(D+A)$$

	A	B(對照群)	B(藥效劑)	C	D
cells	0.5ml	0.45ml	0.45ml	0.5ml	0.45ml
cytochrome C	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
SOD	-	-	-	0.1ml	0.1ml
FMLP(10 ⁻⁶ M)		0.05ml	0.05ml		0.05ml
zymosan	-	0.1ml	0.1ml	-	0.1ml
新規藥效劑	-	-	0.1ml	-	
反應液	0.4ml	0.3ml	0.2ml	0.3ml	0.2ml
總合	1.00ml	1.00ml	1.00ml	1.00ml	1.00ml

6) 單核白血球의 prostaglandins(PGE₂) 生成에 미치는 影響

血液에서 分離한 血液 單核白血球를 24-well plate에 0.8ml 添加하여 10⁶cell/well 되도록 분주하고 RPMI 1640 培地 200μl를 添加한 well을 對照群, E. coli LPS(250 ppm) 100μl와 榆白皮(1, 0.1, 0.01, 0.001%) 100μl를 添加한 well을 實驗群으로 하여 24時間 동안 培養한 後, arachidonic acid 50 μl를 添加하여 30分 동안 더 培養한다. 염소의 항-마우스 IgG를 附着시킨 96-well plate의 blank well에 50μl 緩衝溶液(0.9% NaCl, 0.1% 소 血清 albumin, 0.5% kathon을 含有하는 0.1M 磷酸 緩衝溶液)을 添加하고, 標準(0, 1, 2, 4, 8, 16, 32pg/well)well에는 50μl의 適當 濃度の 標準溶液을 添加한 다음 實驗群 well에 上記의 細胞培養液 50μl 添加하고, blank well을 除外한 모든 well에 50μl의 prostaglandins(PGE₂)에 對한 抗體를 添加한 다음 4°C에서 3時間 동안 維持시킨 後 繼續해서 50μl의 prostaglandins(PGE₂) conjugate peroxidase를 blank well을 除外한 모든 well에 添加하여 다시 4°C에서 1時間 동안 維持시킨 後 洗滌緩衝溶液(0.05% 트윈 20을 含有하는 磷酸 緩衝溶液: ph7.5)로 4번 洗滌하고 常溫에서 150μl의 酵素機質(20%의 디메틸포르마이드에 溶解된 3, 3', 5, 5'-테트라메틸벤지딘/과산화수소)를 즉시 添加하고 25°C에서 30分 동안 維持시키고 1M 황산 100μl를 添加한 後 microplate reader로 450nm에서 吸光度를 測定하여 實施例 혹은 比較例의 吸光度 값(T)에 blank의 吸光度 값(B)를 나눈 다음 100을 곱하여 % 값으로 標示하여 나타내었다.

7) 單核白血球의 interleukins(IL-1β) 生成에 미치는 影響

血液에서 分離한 血液 單核白血球를 24-well plate에 0.8ml 添加하여 10⁶cell/well 되도록 분주하고 RPMI 1640 培地 200μl를 添加한 well을 對照

群, E. coli LPS(250 ppm) 100 μ l를 添加한 well 및 LPS(250 ppm) 100 μ l와 indomethacin, LPS(250ppm) 100 μ l와 楡白皮(1, 0.1, 0.01, 0.001%) 100 μ l를 添加한 well을 實驗群으로 하여 24時間 동안 培養한 後, arachidonic acid 50 μ l를 添加하여 30分 동안 더 培養한다. Interleukins(IL-1 β)의 抗體가 附着된 96-well plate의 well에 標準溶液(0, 10.24, 25.6, 64, 160, 400pg/well)을 50 μ l 添加한 다음 實驗群 well에 上記의 細胞 培養液 50 μ l 添加하고, 모든 well에 50 μ l의 biotinylated antibody reagent를 添加한 다음 25 $^{\circ}$ C에서 3時間 동안 維持시킨 後 洗滌緩衝溶液으로 3回 洗滌하고, streptavidin-HRP conjugate를 모든 well에 添加하여 다시 25 $^{\circ}$ C에서 30分 동안 維持시킨 後 다시 洗滌緩衝溶液으로 3번 洗滌하고 100 μ l의 酵素機質을 즉시 添加하고 25 $^{\circ}$ C 暗室에서 plate의 뚜껑을 열어둔 채로 30分 동안 維持시키고 0.18M 황산 100 μ l를 添加한 後 microplate reader 로 450nm에서 吸光度를 測定하여 標準溶液의 吸光度 값으로 standard curve를 作成하여 實驗群의 interleukins(IL-1 β) 生成량을 算定하였다.

8) 纖維芽細胞의 total protein 및 collagen 合成 測定

生後 3日된 乳兒의 袍皮로부터 primary culture 한 纖維芽細胞를 24-well plate에 10⁶cell/well 되도록 분주한 다음 10% FBS가 含有된 DMEM 培地에서 하루 동안 培養한 다음날 既存의 培地를 新鮮한 培地로 交替하여 24時間 동안 培養한 後에 HBSS 緩衝溶液으로 바닥에 붙은 細胞層을 洗滌한 다음 血清과 proline이 包含되지 않은 MEM 培地 0.8ml를 添加한 다음 藥效劑로 ascorbic acid 및 楡白皮를 各各 試驗濃度 添加한 다음 C¹⁴-proline(10 μ Ci)100 μ l를 包含한 培養液으로 細胞를 培養하였다. 24時間이 經過한 後에 總蛋白質과 collagen 蛋白質을 測定하였다. 먼저 細胞外

總蛋白質의 合成량을 測定하기 위하여 각 well의 培養液을 한쪽 끝이 封印된 透石管에 넣고 다른쪽 끝을 封印하여 cold buffer(Tris-Hcl 0.05mol/L, NaCl₂ 0.05mol/L, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.3mN)로 24時間 透石을 完了한 다음 各各 100 μ l를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 liquid scintillation counter(LSC)로 1分間 방사능을 測定하였다. 細胞內 總蛋白質의 合成량을 測定하기 위하여 細胞培養液을 除去한 各 well에 0.1N NaOH 및 phenylmethylsulfonyl fluoride 0.3mN를 添加한 다음 60 $^{\circ}$ C에서 30分 동안 維持하여 細胞膜을 破壞시킨 後 細胞均質液을 한쪽 끝이 封印된 透石管에 넣고 다른쪽 끝을 封印하여 cold buffer(Tris-Hcl 0.05mol/L, NaCl 0.2mol/L, CaCl₂ 0.05mol/L, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.3mN)로 24時間 透石을 完了한 다음 各各 100 μ l를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 LSC로 1分間 방사능을 測定하였다. 細胞內·外 collagen 蛋白質의 合成량을 測定하기 위하여 透石을 完了한 細胞培養液 및 細胞均質液을 各各 100 μ l 取하여 1.5ml microtube에 넣고 collagenase buffer(0.05M Tris-Hcl, 1mM CaCl₂, 0.3mM phenylmethylsulfonyl fluoride), collagenase酵素(100ppm) 100 μ l를 添加한 後에 3時間 동안 37 $^{\circ}$ C에서 維持시켜 collagen을 완전히 分解시킨 다음에 分解되지 않은 蛋白質을 除去하기 위하여 50%의 trichloroacetic acid 및 1% tannic acid를 含有하는 溶液을 500 μ l 添加한 다음에 4 $^{\circ}$ C에서 30分 동안 沈澱시킨 後에 1000xg에서 5分間 遠心分離 시킨 다음에 上騰液을 取한 다음에 100 μ l를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 LSC로 1分間 방사능을 測定하였다.

9) 細胞의 成長速度 測定

生後 3日된 乳兒의 袍皮로부터 primary culture 한 纖維芽細胞를 24-well plate에 10^6 cell/well 되도록 분주한 다음 10% FBS가 含有된 DMEM 培地에서 하루 동안 培養한 다음날 既存의 培地를 新鮮한 培地로 交替하여 24時間 동안 培養한 後에 HBSS 緩衝溶液으로 바닥에 붙은 細胞層을 洗滌한 다음 血清과 proline이 包含되지 않은 MEM 培地 0.8ml를 添加한 後 藥效劑로 ascorbic acid 과 楡白皮를 各各 試驗濃度 $100\mu\text{l}$ 를 添加한 다음 H^3 -thymidine($10\mu\text{Ci}$) $100\mu\text{l}$ 를 包含한 培養液으로 細胞를 培養하였다. 24時間이 經過한 後에 各 well에 0.1N NaOH를 添加한 다음 60°C 에서 30分 동안 維持하여 細胞膜을 破壞시킨 後 各各 $100\mu\text{l}$ 를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 LSC로 1分間 방사능을 測定하여 細胞의 成長速度를 測定하였다.

10) Collagenase 活性 測定

25개의 1.5ml 에펜돌프튜브(ependorf)에 2%의 赤色 collagen 機質인 아조콜(azocoll)溶液 $100\mu\text{l}$ 를 各各 添加하여 한개의 에펜돌프튜브는 blank로 使用하고, 標準 活性度 曲線을 作成하기 위하여 3개의 튜브에는 Sigma로 부터 購入한 collagenase type I 인 標準酵素溶液(collagen 分解活性度: 315 units/mg)을 10, 100, 200ppm되게 添加하고 實驗群으로 tetracycline 과 楡白皮를 各各 試驗濃度 $100\mu\text{l}$ 씩 處理하고 collagenase(100ppm) $100\mu\text{l}$ 씩 處理한 後 緩衝溶液(0.05M Tris-HCl, 1nM CaCl_2 , 7.8)를 總反應液이 $500\mu\text{l}$ 되게 添加하여 37°C 恒溫器에서 18時間 동안 反應시키고 에펜돌프튜브를 10000g에서 5分 동안 遠心分離시켜 分解되지 않은 collagen은 沈澱시키고 分解된 collagen을 含有하는 上騰液을 取하여 520nm에서 吸光度를 測定하여 標準活性度 曲線을 作成하고 標準曲線으로부터 酵素의 活性濃度를 換算하여 實驗群과 對照群의 酵素活性度를 比較評價하였다.

III. 實驗成績

1. Collagenase 효소 활성에 대한 약효제의 억제효과

염증질환에 효능이 있다고 알려진 한방추출물을 대상으로 Collagenase activity에 대한 억제효과를 시험한 결과, 유백피의 효능이 가장 탁월한 것으로 나타났다.

Table I.

Treatment Group	Optical Density (at 540nm)		Activity of control(%)
	평균	표준편차	
백단향	0.312	0.015	57.41
도인	0.322	0.010	62.45
세신	0.317	0.005	59.94
맥아당	0.336	0.008	69.90
몰약	0.319	0.008	60.80
복분자	0.316	0.004	59.21
연교	0.271	0.017	41.11
현삼	0.340	0.008	71.93
유백피	0.287	0.010	45.78
에엽	0.314	0.005	56.89

2. Collagenase Kilt (CLN-100, Tokyo, Japan)를 이용한 Collagenase activity 실험.

Collagenase 활성억제 효능이 있다고 알려진 Tetracycline, Minocycline 및 Doxycycline과의 비교실험에서도 HPU=Doxycycline > Minocycline > Tetracycline순으로 효능효과가 나타났다.

Table II.

Treatment Group	Tetracycline	Minocycline	Doxycycline	Ulmı radıcıs cortex
Control	0	0	0	0
0.01%	9	4	7	30
0.02%	18	16	60	47
0.03%	30	26	84	84
0.05%	30	37	96	97
0.07%	30	37	96	97

3. Cytotoxicity

1) 楡白皮의 human fibroblast에 對한 細胞毒性에 미치는 影響

사람의 纖維芽細胞의 增殖에 對한 楡白皮의 抑制效果를 研究하기 위하여 0.001, 0.01, 0.1%의 濃度로 24時間 동안 處理한 結果, 實驗群은 모든 濃度에서 對照群과 纖維芽細胞의 增殖에서 차이가 없는 것으로 나타나 楡白皮는 細胞毒性이 없는 것으로 나타났다.

Table III. The effect of HGS on the cell cytotoxicity

Concentration Test Group	0.1%	0.01%	0.001%
control	0.118±0.028		
UP*	0.147±0.028	0.137±0.010	0.131±0.010

P-value > 0.05

* UP : Ulmus parvifolia

2) 楡白皮가 human monocyte의 cytotoxicity에 미치는 影響

사람의 單核細胞 增殖에 對한 楡白皮의 抑制效果를 研究하기 위하여 0.001, 0.01, 0.1%의 濃度로 90分 동안 處理한 結果, 實驗群은 모든 濃度에서 對照群과 monocyte의 cell viability에서 차이가 없는 것으로 나타나 楡白皮는 細胞毒性이 없는 것으로 나타났다.

Table IV. The effect of HGS on the cell cytotoxicity in the human monocyte

Concentration Test Group	0.1%	0.01%	0.001%
control	0.286±0.037		
UP	0.458±0.012	0.146±0.005	0.393±0.009

P-value > 0.05

4. Macrophage 및 neutrophil의 superoxide의 생성측정

1) 楡白皮가 mouse monocyte의 superoxide 生成에 미치는 影響

Zymosan A로 刺戟한 mouse monocyte의 superoxide 生成에 對한 楡白皮의 效果를 0.01%와 0.001%의 濃度에서 實驗한 結果 楡白皮는 22%와 52%의 抑制效果를 나타냈다.

Table V. The effect of HGS on the formation of superoxide in mouse monocyte

NO	Treatment Group(%)	A (O.D.)	B (O.D.)	C (O.D.)	D (O.D.)	superoxide (nmoles)	%
1	control	0.136	0.192	0.137	0.142	2.429	100
2	UP 0.01	0.136	0.181	0.137	0.142	1.905	78
3	UP 0.001	0.136	0.166	0.137	0.142	1.190	48

2) 楡白皮가 human monocyte의 superoxide 生成에 미치는 影響

Zymosan A로 刺戟한 human monocyte의 superoxide 生成에 對한 楡白皮의 效果를 0.001%와 0.0001%의 濃度에서 實驗한 結果 楡白皮는 0.001% 濃度에서만 6%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났다.

Table VI. The effect of HGS on the formation of superoxide in human monocyte

NO	Treatment Group(%)	A (O.D.)	B (O.D.)	C (O.D.)	D (O.D.)	superoxide (nmoles)	%
1	control	0.566	0.692	0.540	0.488	8.476	100
2	UP 0.001	0.566	0.682	0.540	0.488	8.000	94
3	UP 0.0001	0.566	0.717	0.540	0.488	9.667	114

3) 楡白皮가 human neutrophil의 superoxide 生成에 미치는 影響

Zymosan A로 刺戟한 human neutrophil superoxide 生成에 對한 楡白皮의 效果를 0.001%와 0.0001%의 濃度에서 實驗한 結果 모든 濃度에서 superoxide 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났다.

Table VII. The effect of HGS on the formation of superoxide in human neutrophil

NO	Treatment Group(%)	A (O.D.)	B (O.D.)	C (O.D.)	D (O.D.)	superoxide (nmoles)	%
1	control	0.555	0.694	0.515	0.536	5.619	100
2	UP 0.001	0.555	0.738	0.515	0.536	7.714	137
3	UP 0.0001	0.555	0.719	0.515	0.536	6.810	121

Table IX. The effect of HGS on interleukins of human monocyte stimulated with E. coli LPS

Treatment Group(%)	平均 (O.D.)	標準偏差 (S.D.)	IL-1 β (pg)	%
blank	0.194	0.019	624.889	33
control	0.579	0.023	1908.222	100
indomethacin 0.01	0.665	0.019	2196.000	114
indomethacin 0.001	0.571	0.011	1881.556	99
indomethacin 0.0001	0.530	0.011	1746.000	91
UP 0.01	0.568	0.013	1871.556	98
UP 0.001	0.523	0.026	1721.556	90
UP 0.0001	0.547	0.003	1801.556	94

5. 楡白皮의 單核白血球의 prostaglandins(PGE₂) 生成에 미치는 影響

E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 prostaglandins(PGE₂)의 生成에 對한 楡白皮의 效能·效果를 試驗한 結果, 모든 濃度에서 prostaglandins(PGE₂) 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났다.

Table VIII. The effect of HGS on prostaglandins of human monocyte stimulated with E. coli LPS

Treatment Group(%)	平均 (O.D.)	標準偏差 (S.D.)	PGE ₂ (pg)	%
blank	0.010	0.018	240.534	101
control	0.012	0.011	236.670	100
indomethacin 0.01	0.187	0.030	57.223	24
indomethacin 0.001	0.046	0.012	179.229	76
indomethacin 0.0001	0.033	0.012	199.124	84
UP 0.01	0.002	0.010	255.249	107
UP 0.001	0.003	0.006	254.875	107
UP 0.0001	0.001	0.005	257.324	108

P-value < 0.0005

6. 楡白皮의 單核白血球의 interleukins(IL-1 β) 生成에 미치는 影響

E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 interleukins(IL-1 β) 生成에 對한 楡白皮의 效能·效果를 試驗한 結果, 楡白皮 모든 濃度에서 탁월하지는 않지만 약간의 interleukins(IL-1 β) 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났다.

7. 楡白皮가 纖維芽細胞의 total protein 및 collagen 合成에 미치는 影響

人體의 纖維芽細胞에서 total protein 및 collagen 合成에 對한 楡白皮의 效能·效果를 研究하기 위하여 ¹⁴C-proline를 包含한 細胞培養液에 楡白皮를 0.01, 0.05, 0.2%의 濃度에서 24時間 處理한 結果 0.05%의 濃度에서는 약간의 合成을 促進시키는 效果가 있었고 특히 0.2%의 濃度에서는 ascorbic acid 0.05, 0.2%농도에서 보다 탁월한 效果가 있는 것으로 나타났다.

Table X. The effect of HGS on the synthesis of total protein and collagen in human fibroblast

Treatment Group(%)	total protein (cpm/10 ⁶ cell)	total protein (%)	collagen (cpm/10 ⁶ cell)	collagen (%)
control	3320	100	266	100
ascorbic acid 0.01	4046	121	324	121
ascorbic acid 0.05	2988	90	247	92
ascorbic acid 0.2	1457	43	124	40
UP 0.01	3306	99	286	99
UP 0.05	3506	106	317	106
UP 0.2	5858	176	529	176

8. 楡白皮가 collagenase 活性에 미치는 影響

Collagenase 活性에 對한 抑制效果를 研究하기 위하여 楡白皮를 0.01, 0.1, 0.2, 0.5%의 試驗濃度에

서 18時間 동안 處理한 結果, positive control로 使用한 tetracycline은 0.1%의 濃度에서 80%의 抑制效果를 나타내어 가장 높았고, 楡白皮는 0.5%의 濃度에서 45%의 抑制效果를 나타냈으며, 0.2%의 濃度에서는 31%, 0.1%의 濃度에서는 20%의 抑制效果를 나타냈으며, 0.01%의 濃度에서는 楡白皮가 24%의 抑制效果를 나타냈다.

Table XI. The effect of HGS on the viability of collagenase in human fibroblast

Treatment Group(%)	平均 (O.D)	標準偏差 (S.D)	% activity of control	%
blank	0.005	0.004		
control	0.134	0.002	100.00	100
tetracycline 0.1	0.027	0.004	38.87	20
tetracycline 0.01	0.105	0.006	73.66	35
UP 0.5	0.048	0.006	45.98 ^a	55
UP 0.2	0.074	0.002	56.90 ^a	69
UP 0.1	0.093	0.009	66.90 ^a	80
UP 0.01	0.108	0.002	75.34 ^c	76

a : P-value < 0.0005

b : P-value < 0.001

c : P-value < 0.01

IV. 考 察

瘡瘍의 原因에 對하여 《黃帝內經·靈樞》¹⁾에서 運氣學의 歲木不及으로 炎暑流火할 때 歲水不及으로 司天에 熱氣가 不臨할 때 發生되며 또는 寒邪가 經絡 內에 侵犯하면 血泣이 되고 血泣이 不通되면 衛氣가 循環하지 않으므로 腫이 發生하고 寒氣가 熱로 變하여 熱이 많으면 肉이 腐蝕되어 膿이 形成된다 하였고, 華²⁾는 營衛壅塞으로 發病하거나 五臟六腑의 蓄毒이 原因이 된다 하였으며, 王等^{15,16)}은 虛邪가 犯하거나 營衛가 經絡에 停留되거나 喜怒가 不斂하거나 飲食不節, 五臟六腑不和, 九竅不通 등으로 發生된다 하였다. 또한 陳¹⁷⁾은 外因은 六淫으로 經絡에서 나타나 臟腑로 전해지고, 內因은 七情鬱結로 臟腑가 損傷되어

肢體로 나타나고 不內外因은 飲食飢飽, 呼吸傷氣, 虎狼毒蟲, 金瘡 등에 나타나 三因이 形成된다 하였으며, 嚴¹⁸⁾은 五臟六腑의 不和와 陰陽相滯를 原因으로 보았고, 危¹⁹⁾는 冷熱不調, 喜怒不常, 飲食不節, 張은 心火上炎, 陳은 七情, 六淫, 六慾, 膏粱厚味, 勞傷, 五臟六腑九竅不通 등에 의해 發生된다고 하였다.

瘡瘍의 治療法에 對하여 陳²⁰⁾을 代表로 하는 正宗派는 消, 托, 補의 三法으로 腫瘍을 治療할 것을 主張하였는데 腫瘍의 初期에는 消法 卽 汗, 下, 溫, 清, 行, 氣, 和, 營 등의 方法을 爲主로 하고, 腫瘍의 後期와 潰瘍의 早期에는 托法, 卽 扶正托毒, 透膿托毒, 排膿托毒 등의 方法을 爲主로 하고, 潰瘍後期에는 補法, 卽 補氣血, 調脾胃, 益肝腎 등의 方法을 爲主로 한다고 하였다. 最近의 韓醫書인 《外科·皮膚科의 辨證論治》⁶⁾에서도 瘡瘍의 治療法으로 一般의 初期, 成膿, 潰後의 三段階로 分類하였는데 治療法則도 이에 따라 消, 托, 補의 세가지의 基本法則으로 分類하였다. 그 중 消法은 消散하는 作用이 있는 藥物을 使用하여 病變의 損傷을 早期에 消散하는 것을 말하는 것이고, 托法이란 透托의 作用이 있는 藥物을 使用하여 邪氣를 外部로 排出시키거나 毒熱과 腐弊한 肉을 迅速히 化膿시켜 消退시키는 것을 促進하거나 또는 毒邪를 局限시키거나 化膿되어 있지 않은 것을 消退시키도록 하고 이미 膿이 생겨 있는 것에는 쉽게 破潰할 수 있는 方法을 取하는 것을 말한다. 補法은 補益하는 作用이 있는 藥物을 使用하여 損을 益하고 虛를 補하며 正氣를 도와 餘分의 邪를 除去하는 方法으로 瘡瘍의 後期에 局所的으로 破潰된 後 瘡口가 長期間에 걸쳐 愈合되지 않고 全身에 陰虛, 陽虛, 氣虛, 血虛, 血燥, 陰虛 등의 症으로서 火가 盛하기 때문에 惹起되는 皮膚病症에 使用한다고 하였다.

炎症의 韓方的인 定義에 對하여 明確하게 定立되지는 않았으나 대체로 火와 熱의 概念으로 보고

있으며 生肌散 韓方의 肌肉의 生長이나 瘡瘍에서 腐肉이 없어지고 新肉이 생기는 過程을 뜻하는 것으로 《素問·平人氣象論》¹⁾에서 “脾臟肌肉之氣也”라 하여 肌肉의 生長健壯이 脾와 關聯이 있음을 說明하였고, 《靈樞·五閱五使篇》¹⁾에서는 “血氣有餘 肌肉堅治”라 하여 氣血의 充養이 肌肉과 密接한 關係가 있음을 說明하였다.

西洋醫學의 으로는 損傷받은 組織의 治愈過程은 損傷直後 즉시 始作하여 損傷받은 組織을 健康한 다른 細胞들이 代替되어 收復되는 것이다. 收復의 過程은 대개 結合組織의 癍痕을 隨伴하므로 이러한 收復過程이 組織의 缺損을 채우면서 形態學的 連續性을 喪失하게도 된다. 그러므로 組織의 收復過程上에 癍痕을 많이 남기지 않고 원상태로 回復하는 것은 治療의 過程에서 重要な 과제이다. 그러나 大部分의 身體損傷의 收復은 實質細胞의 再生과 함께 結合組織에 의한 多少의 癍痕을 남기게 된다. 어느 組織의 損傷이든지 收復過程의 質과 適當함을 決定하는 要因은 損傷된 細胞의 再生力, 損傷程度 및 간질결합조직의 增殖力에 依存하게 되는데 損傷으로 인한 組織骨格의 破壞與否가 實質細胞의 再生에 重要하므로 損傷程度가 문제가 되며 實質細胞의 再生이 中止된 後에 남게되는 組織缺損의 部位는 結合組織으로 채워지기 때문에 간질결합조직의 增殖力도 決定要因으로 作用한다²¹⁻²⁵⁾.

榆白皮는 一名 零榆라 하여 참느릅나무의 樹皮로서, 味는 甘하고 性은 平·無毒하다. 산골짜기에 서 자라며 陰曆 2월에 흰 속껍질을 벗겨 햇볕에 말린다. 열매는 陰曆 8월에 따는데 모두 濕氣를 받지 않도록 해야한다. 藥理成分上 β-sitosterol, phytosterol, stigmasterol 등의 sterol類와 樹膠 및 脂肪油 등이 含有되어 있다. 主로 胃, 大腸, 小腸經으로 歸經하며, 利水, 通淋, 消癰腫, 滲濕熱, 行津液 등의 效果가 있어서 小便不通, 淋濁, 癰疽發背, 丹毒, 疥癬 등을 治療하며 水道를 잘 通하게

하고, 邪氣와 腸胃의 邪熱을 없애며 부은 것을 빠지게 한다¹⁻⁴⁾. 以上과 같이 榆白皮는 消癰腫, 滲濕熱, 利水하는 效能 때문에 瘡瘍, 癰疹, 瘡疹 등을 治療하는데 活用될 수 있으리라고 思慮된다⁷⁻¹⁰⁾.

本 實驗에서는 MMP(Matrix metalloproteinase)의 활성과 관련된 Periodontal disease, Metastasis, Rheumatic arthritis, Inflammation, Diabetes, Osteoporosis, Stomach tumor, Wrinkle와 같은 疾患을 豫防 및 治療하기 위하여 in vivo로 廣範圍한 韓方 및 植物抽出物을 利用하여 Collagenase activity에 對한 抑制效果 實驗, 榆白皮와 Tetracycline, Minocycline 및 Doxycycline과의 比較實驗을 하였고 특히 느릅나무(Ulmus macrocarpa)의 코르크층을 벗긴 수피인 榆白皮(Ulmi cortex)에 대한 實驗的 研究를 위하여 in vitro 모델로 人體의 纖維芽細胞, 單核細胞, 中性白血球와 흰쥐의 單核細胞를 利用한 細胞毒性實驗, superoxide 生成 抑制效果, immunoassay를 利用한 prostaglandins(PGE₂) 및 interleukins(IL-1β) 生成 抑制效果, ¹⁴C-proline를 利用한 collagen 合成 및 ³H-thymidine를 利用한 細胞增殖 促進效果인 DNA 合成, collagenase 活性 抑制效果를 測定하는 實驗을 하여 그 效能을 比較 檢討하였다.

Matrix metalloproteinase(MMP)는 Polymorphonuclear neutrophil, Macrophage, Fibroblast, Bone cell과 같은 세포로부터 분비되는 Ca 및 Zn-dependent Endopeptidase로 Neutral pH에서 작용하며, Substrate로서 여러 가지 Extracellular matrix를 이용한다. 이러한 Priotein 분해효소는 Embryodevelopment, Organogenesis, Salivary gland formation, Teeth development와 같은 생리학적 과정 뿐만 아니라 Periodontal diseases, wound healing, Metastasis, Rheumatic arthritis, Inflammation, Diabetes, Osteoporosis, Stomach tumor, Wrinkle와 같은 병리학적 과정과 각종 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 효소는 12개의 군으로 나누어지

며, Growth factor 및 Cytokine에 의하여 유전자가 발현되어 효소가 분비되는 것으로 알려져 있다²⁶⁻²⁹⁾.

또한 Blood vessel, Connective tissue 및 Lymph vessel으로 발생하는 Mesoderm tissue의 Mesodermal cell과 Epithelial cell에서는 Growth factors 및 Intereukin- 1β , TNF- α , PDGF와 같은 Cytikine이 MMP의 유전자 발현을 촉진하는 반면, Interferon- α 와 Glucocorticoid 및 TGF- β 는 MMP의 유전자 발현을 억제시킨다. 글루코코르티코이드와 관련하여 Parathormone 및 Endotxin, Prostaglandins은 MMP의 활성을 증가 시키는 것으로 알려져 있다³⁰⁻³¹⁾.

MMP 효소의 활성을 유발시키는 데는 세정제, 산화제, 유기 금속물질 및 Trypsin 및 Plasmin과 같은 효소가 관여하여 효소 촉매 부위의 Zinc를 Cystein으로부터 떨어져 나가게 하며, 유리된 Zine는 물과 상호작용하여 기질을 가수 분해시킨다. Neutrophil 및 Polymorphonuclear leucocyte의 MMP는 산화적 과정에 의하여 일차적으로 활성화되는데 그 과정은 먼저 세포내에서 Hydrogen peroxide가 발생되면 Chloride 이온의 존재하에서 Myeloperoxidase에 의하여 Hypochloric acid로 전환되고 이것을 MMP를 활성화시킨다.

Fibroblast의 MMP는 Trypsin 및 Plasmin과 같은 Protease에 의하여 활성화된다. 이렇게 활성화된 효소는 불과 소량만이 정해진 생리학적 기능을 수행하는데 과량으로 분비되어 활성화되면 앞에서 언급한 각종 질환을 유발시키게 된다.

특히 MMP중에서 TypeIV Collagenase인 72-KD 및 92-KD Collagenase는 암전이 첫 번째 장벽인 Basement memberane의 주요 구조적인 성분인 TypeIV Collagenase을 분해하는 효소로, 암세포의 침윤과 전이에 있어서 가장 중요한 효소라 할 수 있다.

TypeIV Collagenase에 대한 저해제의 탐색 및 개발은 암의 침윤과 전이 그리고 Collagenase성 결합 조직의 분해가 원인이 되는 Rheumatic arthritis와

Periodontal disease의 치료를 위한 하나의 접근 방법이 될수 있다.

치주 질환에서 중요한 MMP는 Fibroblast Polymorphonuclear neutrophil, Epithelial cell 및 Macropdage에 의하여 분비되는 Collagenase로 이들 효소의 생성 기작을 살펴보면 먼저 Bactoroids와 Actinovacillus와 같은 Anaerobic Gram-negative bacteria의 cell wall의 구성분인 Lipopolusaccharide와 같은 Endotoxin에 의하여 직접 조직이 파괴되거나 생체 면역계가 자극을 받아 Preactive sxygen species(ROS), Prostaglandins 혹은 Interleukins과 같은 여러 종류의 Cytokine 등을 세포 외부로 분비한다.

세포 외부로 분비된 ROS와 Cytokine은 잇몸 염증을 유발하고, 이들 염증 매개체의 자극에 의하여 분비된 Collagen 및 세균으로부터 분비된 Collagen에 의하여 치주조직의 기질인 Collagen이 분해되어 잇몸 퇴축이 일어나고 계속 방치하게 되면 치주질환으로 진행된다³²⁻³⁵⁾.

현재까지 MMP의 활성을 억제시킬 수 있는 Inhibitors로는 Endogenous Inhibitors가 알려져 있는데 Tetracycline계열, Bis-phosphonates 및 Peptide 유도체, Tea Catchins가 있다³⁶⁻³⁷⁾.

炎症疾患에 效能이 있다고 알려진 韓方抽出物을 對象으로 Collagenase activity에 對한 抑制效果를 試驗한 結果, 櫛白皮의 效能이 가장 卓越한 것으로 나타났으며(Table I), Collagenase 活性抑制 效能이 있다고 알려진 Tetracycline, Minocycline 및 Doxycycline과의 比較實驗에서도 HPU=Doxycycline > Minocycline > Tetracycline 순으로 效能效果가 나타났다(Table II).

櫛白皮의 細胞毒性을 알아보기 위하여 human fibroblast와 human monocyte 增殖에 대한 抑制效果를 測定하였는데 對照群과 實驗群의 모든 濃度에서 차이가 없는 것으로 나타나 細胞毒性이 없는 것으로 나타났다(TableIII, TableIV).

炎症(inflammation)은 흔히 볼 수 있는 病變으로 局所에 加해진 炎症誘發性 刺戟과 組織傷害에 對한 血管 및 結合組織系의 自己防禦體系인 免疫過程의 一部分이다. 外部로부터 物理的, 化學的, 生物學的 損傷을 復舊하는 生體의 反應에 의하여 組織의 損傷과 더불어 炎症反應 즉 浮腫, 發熱, 疼痛이 나타나게 된다. 炎症이 일어난 組織에서는 먼저 血管反應이 나타나서 毛細血管이 擴張되고 血流가 增加하며 이어서 血管壁의 透過性이 增加하여 血漿 成分과 蛋白質 成分이 血管壁을 通해 間質組織으로 滲出된다. 이때에 細菌이나 傷害된 局所組織에서 由來하는 化學因子의 誘導에 의해 好中球, 多型核 白血球와 單核球가 아메바 運動을 通해 間質組織으로 나오고 이들에게서 遊離된 大食細胞가 滲出되어서 炎症 刺戟物을 貪食하게 되며, 炎症이 오래되면 림프구 및 形質細胞도 많이 나타나게 된다³⁸⁻⁴⁰⁾.

炎症을 抑制하기 위해 使用되는 藥劑를 廣義의 抗炎症劑라 하며 嚴密히 細分하여 말한다면 浮腫에 對해 anti-inflammatory, 發熱에 對해 antipyretic, 疼痛에 對해 analgesic drug로 表現되어진다. 炎症反應時 細胞性 및 體液性 免疫反應이 關與되는데 이때 關與되는 物質에 對해서는 많은 研究가 되어 왔으며 superoxide, prostaglandins(PGE₂), interleukins(IL-1 β), collagenase 외에 histamin, bradykinin, plateletactivating factor, tumor necrosis factor 등이 關與하는 것으로 알려져 있다^{30,41-43)}.

炎症 및 免疫反應 誘發物質의 生産 抑制를 위하여 過去에는 스테로이드性 抗炎症劑를 使用한 結果 많

은 副作用이 誘發되어 最近에는 비스테로이드性 抗炎症劑가 廣範圍하게 使用되고 있다. 이러한 비스테로이드性 抗炎症劑는 주로 纖維芽細胞 및 單核細胞와 多型核 白血球의 cyclooxygenase 酵素에 의하여 合成되는 prostaglandins(PGE₂)의 生産을

抑制하는데 基本을 두고 있다⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

最近의 研究에서는 prostaglandins(PGE₂)의 生産이 細菌의 內毒素인 lipopolysaccharide에 의하여 誘發되는 interleukins(IL-1 β)에 의하여 刺戟되는 것이 알려져 interleukins(IL-1 β)의 細胞生産을 抑制하는 研究가 활발히 進行되고 있다⁴⁸⁻⁵⁰⁾. 그리고 prostaglandins(PGE₂)는 大食細胞와 多型核 白血球를 刺戟하여 結合組織의 基質인 collagen 蛋白質을 分解시키는 collagenase의 合成을 誘發시켜 結合組織을 破壞시킨다^{27,31)}.

炎症發生 過程에서 損傷된 組織의 再生에는 collagen의 合成이 중요한 役割을 하는 것으로 알려져 있는데, collagen 合成은 纖維芽細胞의 活性과 密接한 關聯이 있으며 年齡에 따라 collagen 合成이 減少하게 된다. Collagen이 合成되는 過程은 먼저 collagen 遺傳子의 발현에 의하여 mRNA가 전사되고, mRNA는 細胞質內에서 procollagen peptide를 만들고 바로 hydroxylation과 glycosylation 過程을 거쳐 triple helix를 形成하게 된다. Procollagen 다발은 細胞 外部로 分泌되어 procollagen peptide 加水分解酵素에 의하여 除去되고 形成된 tropocollagen 分子들은 서로 엇갈린 配列로 組立되어 collagen 纖維를 形成하고, 이 纖維들은 lysin과 hydroxylation 殘期들의 交叉結合에 의하여 強化되어 組織의 再生에 중요한 collagen 蛋白質이 合成된다^{51,52)}.

Superoxide는 macrophage로 分化되는 monocyte 및 neutrophil의 phagocytosis 過程에서 發生되는 代謝産物로 高度의 反應性임으로 組織內에 많이 存在할 경우에 collagen, hyaluronic acid 및 proteoglycan과 같은 細胞外 基質成分의 depolymerization에 影響을 미칠 뿐만아니라, 細胞의 蛋白質, 核酸, 그리고 細胞膜 脂質 構成分의 破壞에 活性을 나타낼 수 있다⁵³⁾. 특히 口腔에서는 細菌에 의해 形成된 프라그가 蓄積되어 10-20일이 經過하면 口內炎이 發生되어 齒齦이 붉어지고 그

結果 浮腫이 發生하며 軟組織에서 出血이 增加되어 齒齦上皮 아래의 結合組織에 血漿細胞, 림프구, 大食細胞로 分化되는 單核細胞, 中性白血球 등을 包含하는 炎症細胞가 增加하게 된다. 이중 單核細胞 및 中性白血球는 炎症誘發物質에 의하여 活性化되어 superoxide를 細胞外部로 放出하여 生體組織을 破壞시키는 主要한 原因으로 밝혀져 superoxide를 抑制할 수 있는 superoxide dismutase와 같은 抗酸化劑의 開發이 활발하게 進行되고 있다^{54,55}.

Zymosan A로 刺戟한 mouse monocyte의 superoxide 生成에 對한 楡白皮의 效果를 0.01%와 0.001%의 濃度에서 實驗한 結果 楡白皮는 22%와 52%의 抑制效果를 나타냈다(Table V). 또한 human monocyte의 superoxide 生成에 對한 楡白皮의 效果는 楡白皮는 0.001% 濃度에서만 6%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table VI). 또한 human neutrophil superoxide 生成에 對한 楡白皮의 效果를 0.001%와 0.0001%의 濃度에서 實驗한 結果 모든 濃度에서 superoxide 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났다(Table VII).

Prostaglandins(PGE₂) 중에서 특히 PGE₂는 細胞膜에 損傷을 입을시 arachidonic acid 代謝物의 一種으로 뼈의 吸收에 깊이 關與하는 物質로 알려져 있다. Aspirin과 indomethacin은 cyclooxygenase-2의 強力한 抑制作用으로 prostaglandins(PGE₂)의 生成을 抑制하는 것으로 알려져 있다^{46,47,56}.

Indomethacin을 positive control로 楡白皮의 prostaglandins(PGE₂)의 生成 抑制效果를 比較한 結果 楡白皮 0.01% 濃度에서 11%로 나타나 prostaglandins(PGE₂) 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table VIII).

Cytokines의 一種인 interleukins(IL-1 β)는 炎症部位의 細胞를 많이 모이게 하며 prostaglandins(PGE₂)의 生成을 刺戟하는 것으로

알려져 있어 炎症에 關與하는 主要한 cytokine으로 最近에 interleukins(IL-1 β)의 生成을 抑制하는 新規 藥效劑의 開發에 對한 研究가 활발히 進行되고 있으며⁴⁸⁻⁵⁰, 生藥製劑 중에서는 天門冬, 五味子, 五倍子 및 大棗 抽出物이 炎症의 媒介物質인 cytokine의 生成 抑制에 效果가 있다고 報告된 바 있다⁵⁷. E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 interleukins(IL-1 β)의 生成에 對한 楡白皮의 效能·效果를 實驗한 結果 모든 濃度에서 탁월하지는 않지만 약간의 interleukins(IL-1 β) 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table IX).

組織의 再生은 growth factor를 利用하여 細胞의 增殖을 促進하거나 collagen 蛋白質의 合成을 促進시키는 方向으로 研究되고 있다. 그러나 growth factor의 臨床適用段階는 아직 研究가 되어있지 않으며 다른 副作用에 대해서도 정확히 밝혀지지 않은 實情으로 上皮나 모든 種類의 組織의 成長을 促進시킴으로 組織 特異성이 약간 缺如되고 있다. 이에 長期的인 觀點에서 副作用이 적고 安全한 藥物의 必要性이 要求되고 있는 實情이다^{58,59}. 近來에 生藥에서 가장 널리 알려져 있는 centella asiatica의 asiaticoside로 齒周組織 再生劑로 使用되고 있으며⁶⁰, 大棗 抽出物이 collagen 蛋白質의 合成을 促進한다는 報告가 있다⁶¹.

人體의 纖維芽細胞에서 total protein 및 collagen 合成에 對한 楡白皮의 效果를 研究하기 위하여 ¹⁴C-proline를 包含한 細胞培養液에 楡白皮를 0.01, 0.05, 0.2%의 濃度에서 24時間 處理한 結果 0.05%의 濃度에서는 약간의 合成을 促進시키는 效果가 있었고 특히 0.2%의 濃度에서는 ascorbic acid 0.05, 0.2濃度에서 보다 탁월한 效果가 있는 것으로 나타났다(Table X).

Collagen 蛋白質을 分解시키는 collagenase는 炎症 뿐만아니라 老化和 關聯이 있으며, 主로 炎症 誘發 物質인 prostaglandins(PGE₂)에 의하여 collagenase 遺傳子가 活性化 되어 細胞內에서 合

成된 後 細胞外部로 分泌되는 collagenase는 metalloprotenase 중의 하나로 炎症部位에서 酵素活性이 增加되는 것으로 알려져 있으며, 특히 口腔 및 齒齦에 炎症이 있는 患者의 口腔粘膜과 齒齦裂溝液內에 酵素活性이 활발한 것으로 報告되고 있으며, 또한 年齡이 增加함에 따라 collagenase 活性이 增加되는 것으로 알려져 있다^{32,62,63}. Collagenase 活性 抑制劑로는 抗生劑인 tetracycline이 가장 널리 알려져 있으나⁶⁴, 長期間 使用할 때 抗生劑 耐性菌株의 出現 等 副作用이 報告되어 最近에는 韓方 및 生藥製劑에 對한 研究가 활발히 進行中에 있으며 黃芩에서 collagenase 의 抑制效果가 있는 것으로 나타났⁶⁵.

Collagenase 活性에 對한 抑制效果를 研究하기 위하여 楡白皮를 0.01, 0.1, 0.2, 0.5%의 試驗濃度에서 18時間 동안 處理한 結果 positive control로 使用한 tetracycline은 0.1%의 濃度에서 80%의 抑制效果를 나타내어 가장 높았고 positive control로 使用한 tetracycline은 0.1%의 濃度에서 80%의 抑制效果를 나타내어 가장 높았고, 楡白皮는 0.5%의 濃度에서 45%의 抑制效果를 나타냈으며, 0.2%의 濃度에서는 31%, 0.1%의 濃度에서는 20%의 抑制效果를 나타냈으며, 0.01%의 濃度에서는 楡白皮가 24%의 抑制效果를 나타냈다(Table XI).

以上の 結果를 綜合해 보면 楡白皮는 Collagenase activity에 對한 抑制效果가 卓越하고, 正常的인 纖維芽細胞에 毒性이 없는 것으로 나타났으며 macrophage 및 neutrophil, monocyte의 superoxide 生成抑制와 prostaglandins(PGE₂)과 interleukins(IL-1 β)의 生成을 抑制하는 것으로 보아 여러 가지 化學因子가 放出되어서 血管擴張이나 液性滲出이 일어나는 炎症 I 期과 炎症의 原因物質이나 破壞된 組織 等を 除去하기 위해 白血球가 血管外로 滲出되고 免疫系가 活動하기 始作하는 II 期⁶⁶에 效果가 있는 것으로 思慮된다. 특히 楡白皮가 total protein 및 collagen 合成을 促進

시키는 效果에서 0.2%의 濃도에서는 positive control인 ascorbic acid 0.05, 0.2%의 濃도에서 보다 탁월한 效果가 있는 것으로 나타났고, 또 collagen protein을 分解시키는 collagenase 活性을 抑制하는 것으로 보아 起炎物質이나 炎症으로 傷害를 입은 組織을 體外로 排出하기 위하여 纖維芽細胞의 增殖이 始作되고 肉芽가 增殖하여 炎症의 局所가 漸次的으로 收復되는 炎症 III 期⁶⁶에도 어느 정도의 效果가 있는 것으로 思慮된다.

以上の 實驗結果로 楡白皮는 消癰腫, 滲濕熱, 利水하는 效能이 있으므로 臨床에서 初期의 瘡瘍의 治療와 生肌作用에 좋은 效果가 있을 것으로 思慮된다.

V. 結 論

楡白皮의 生肌 및 抗炎作用에 미치는 效果를 糾明하기 위해서 in vivo로 廣範圍한 韓方 및 植物抽出物을 利用하여 MMP活性에 對한 抑制效果를 研究하였고 특히 楡白皮에 對하여 in vitro 모델로 人體의 纖維芽細胞, 單核細胞, 中性白血球와 흰쥐의 單核細胞를 利用한 cytotoxicity, superoxide 生成 抑制效果, immunoassay를 利用한 prostaglandins(PGE₂) 및 interleukins(IL-1 β) 生成 抑制效果, ¹⁴C-proline를 利用한 collagen 合成 및 ³H-thymidine를 利用한 細胞增殖 促進效果인 DNA 合成, collagenase 活性 抑制效果를 測定하는 實驗을 한 結果 아래와 같은 結論을 얻었다.

1. 韓方抽出物을 對象으로 Collagenase activity에 對한 抑制效果를 試驗한 結果 楡白皮의 效能이 가장 卓越한 것으로 나타났다.

2. Tetracycline, Minocycline 및 Doxycycline과

의 比較實驗에서도 유백피의 效能이 높은 것으로 나타났다.

3. 榆白皮는 모든 濃度에서 細胞毒性이 없는 것으로 나타났다.

4. Mouse monocyte의 superoxide 生成에 對하여 榆白皮는 0.01% 濃度에서 22%, 0.001%의 濃度에서 52%의 抑制效果를 나타냈다.

5. Human monocyte의 superoxide 生成에 對하여 榆白皮는 0.001% 濃度에서만 6%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났다.

6. Human neutrophil superoxide 生成에 對하여 榆白皮는 모든 濃度에서 superoxide 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났다.

7. E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 prostaglandins (PGE₂)의 生成에 對하여 榆白皮는 모든濃度에서 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났다

8. E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 interleukins(IL-1 β)의 生成에 對하여 모든 濃度에서 약간의 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났다.

9. 榆白皮는 纖維芽細胞의 total protein 및 collagen 合成을 0.05%의 농도에서는 약간의 合成을 促進시키는 效果가 있었고 특히 0.2%의 농도에서는 탁월한 效果가 있는 것으로 나타났다.

10. Collagenase 活性에 對해 榆白皮는 0.5%의 濃度에서 45%의 抑制效果를 나타냈으며, 0.2%의 濃度에서는 31%, 0.1%의 濃度에서는 20%의 抑制

效果를 나타냈으며, 0.01%의 濃度에서는 榆白皮가 24%의 抑制效果를 나타냈다.

以上の 結果를 綜合해 보면 榆白皮는 炎症의 I, II, III期의 抗炎作用과 生肌作用에 전반적으로 效果가 있으며 臨床에서도 初期의 瘡瘍에 널리 應用될 수 있을 것으로 思慮된다.

參考文獻

1. 楊維傑 : 黃帝內經譯解, 서울, 成輔社, p.147, 210, 299, 349, 456, 1997.
2. 華 陀 : 中藏經, 서울, 三醫堂, p.5, 1977.
3. 劉完素 : 劉河間三六書, 서울, 成輔社, p.82, 1976.
4. 高秉鈞 : 瘍科心得集, 臺北, 旅風出版社, pp.1-3, 1976.
5. 顧世登 : 瘍醫大全, 서울, 太醫社, pp.158-187, 1975.
6. 柳志允 : 外科, 皮膚科의 辨證論治, 서울, 書苑堂, p.35, 1987.
7. 陶弘景 : 名醫別錄, 北京, 人民衛生出版社, p.65, 1986.
8. 辛民教 의 : 國譯鄉藥集成方(下), 서울, 永林社, p.1868, 1989.
9. 新文豐出版公司 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文豐出版公司, p.2186, 1972.
10. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 驪江出版社, 197, 476, 555, 2217, 2350, 1994
11. 姜允皓 : 托裏消毒飲의 消炎作用에 대한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌 Vol.3, No.1, 1982.
12. 金璟濬 의 : 回春涼膈散이 抗알레르기 및 消炎, 鎮痛, 解熱效果에 미치는 影響, 大韓外官科學會誌, Vol.7, No.1, 1994.

13. 黃忠淵 : 艾灸 損傷皮膚의 治愈過程에 關한 組織學的 研究, 이리, 圓光大學校 大學院 碩士學位 論文, 1981.
14. 辛美香 : 十全大補湯이 生肌作用에 미치는 影響, 大田, 大田大學校 大學院 碩士學位論文, 1993.
15. 王 燾 : 外臺秘要, 서울, 成輔社, pp.625-631, 1975.
16. 薛 己 : 薛己醫案(醫部全錄), 서울, 成輔社, pp.349-355, 1976.
17. 陳 言 : 三因方, 서울, 翰成社, p.325, 1977.
18. 嚴用和 : 濟生方, 서울, 東洋醫藥大學, pp.61-68, 1965.
19. 危亦林 : 得效方, 서울, 東洋醫藥大學, p.6130, 1965.
20. 陳實功 : 外科正宗, 天津, 天津科學技術出版社, p.47, 1993.
21. Spellman CW, Woodward JG, Daynes RA : Modification of immunological potential by ultraviolet radiation. I. Immune status of shorttem UV-irradiated mice. Transplantation. 24:112, 1977.
22. Nathan CF : secretory products of the macrophages, J.Clin.Invest, 79:319, 1987.
23. Folkman, J., Klagsburn, M : Angiogenic factors, Science, 235:442, 1987.
24. Ausprunk DH, : Tumor angiogenesis, In Houck J.C.(ed) : Chemical messengers of the inflammatory process, Amsterdam Elsevier/North Holland, p.317, 1979.
25. Schoefl, G.I. : Studies of infammation. III. Growing capillaries : Their stucture and permeability. Virchows Arch. Pathol. Anat. 337:97, 1963.
26. Peter A, HILL, et al. : Inhibition of bone resorption in vitro by selective inhibitors of gelatinase and collagenase. Biochem J 308:167-175, 1995.
27. LEE W, Aitken, Sodek J, McCulloch CAG : Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. J Peridont Res 30:23-33, 1995.
28. Ann F. Chambers and Lynn M. Matrisian : Review; Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. J National cancer Institute 89-17: 1260-1269, 1997.
29. L.M. Golub : A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult eriododtitis. Inflamm Res 46: 310-319, 1997.
30. Socransky SS and Haffajee AD : Microbial mechanism in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. J Periodont Res 26:195-212, 1991.
31. Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T : Salivary collagenase. Orign, characteristics and relationship to periodontal health. J Periodontal Res 25:135-142, 1990.
32. Richards D, Rutherford RB : Interleukin-1 regulation of procollagenase mRNA and protein in periodontal fibroblasts in vitro. J Periodontal Res 25:222-229, 1990.
33. Karen A. Hasty, et al. : Human Neutrophil collagenase. J. Biological Chemistry 265-20: 11421-11424, 1990.
34. Gangbar S, Overall CM, McCulloch CAG, Sodek J : Identification of polymorphonuclear neutrophil collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: Correlation with

- periodontal diseases activity in adult and juvenile periododtitis. J Peridont Res 25:257-267, 1990.
35. Vera KNAUPER, et al : Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. Eur J Biochem 235: 187-191, 1996.
36. Birkedal-Hansen H, et al. : Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med 4: 197-250, 1993.
37. Birkedal-Hansen H : Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontal diseases 64: 474-484, 1993.
38. 白充基 : 病理學, 서울, 高文社, p.23, 1988.
39. 이중달 : 그림으로 설명한 病理學, 서울, 고려의학, pp.27-34, 1990.
40. 李淵台 譯 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, pp.355-358, 1989.
41. Page RC. : Host response tests for diagnosing periodontal diseases. J. Periodontal 63: 356-366, 1992.
42. Lamster IB. : The host response in gingival crevicular fluid: potential applications in periodontitis clinical trials. J. Peridontol 63: 1117-1123, 1992.
43. Polson AM and Goodson JM. : Periodontal diagnosis current status and future needs. J. Peridontol 56-1: 25-34, 1985.
44. Gerritsen MJP, Rulo HFC, Arnold WP and Van De Kerkhof PCM. : Response of the clinically uninvolved skin of psoriatic patients to repeated tape stripping during cyclosporin A treatment. B. J. of Dermatol 130: 181-188, 1994.
45. Marx J. : How the glucocorticoid suppress immunity. Science 270: 222-233, 1995.
46. Lee DH and Choi. : The comparative study of immunosuppressive drugs on the periodontal condition in renal transplant patients. J. of Ker Academ. of Peridontol. 19-1: 1-8, 1989.
47. Ting PC, Kaminski JJ, Sherlock MH, Tom WC, Lee JF, Bryant RW, Watnick AS and Mcphail AT. : Substituted 1,3-dihydro-2h-pyrrolo [2,3-b] pyridin-2-ones as potential antiinflammatory agents. J. Med. Chem. 33:2697-2706, 1990.
48. Matsuki Y, Yamamoto T and Hara K. : Localization of interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. J. Peridont 28: 35-42, 1993.
49. Poore TK, Johnson GK, Reinhardt RA and Organ CC. : The effects of smokeless tobacco on clinical parameters of inflammation and gingival crevicular fluid prostaglandin E₂ Interleukin -1 α and Interleukin-1 β . J. Periodontal 66: 177-183, 1995.
50. Kupper TS and Groves RW. : The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. J. of Invest. Derm. 105-1:62s-66s, 1995.
51. Clark RAF : Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. J. Am Acad Dermatol 13:701-725, 1985.
52. Lynch Se, Colvin RB, Antoniades HN : Growth factors in wound healing: single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. J. Clin Invest 84: 640-646, 1989.
53. Shingu M, Isayama T, Yasutake C, et al. : Role of oxygen radicals and IL-6 in IL-1 dependent cartilage matrix degradation. Inflammation 18-6: 613-623, 1994.
54. Kim SJ, han DH, Moon KD and Rhee JS.

- : Measurement of Superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59-5:822-826, 1995.
55. Duval C, Lange P and Poelman MC. : Inhibition of cutaneous inflammation by free radical scavengers. *IF SCC* p56: 453-459, 1992.
56. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L and Isakson P. : Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12013-12017, 1994.
57. Cho KY, Lee YM, Choi SM and Chung CP. : The effects of herbal extracts on production and activity of interleukin 1 β . *The J. of Kor. Academy of Periodontol.* 25-2: 386-396, 1995.
58. Canalis E. : Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 30: 970, 1981.
59. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI and Genco RJ. : Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblast cells to polypeptide growth factors in vitro. *J. of Periodontol* 63: 515, 1992.
60. Rush WR, Murray GR and Graham DJM. : The comparative steady-state bioavailability of ingredients Madecassol. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 18-4:323-326, 1993.
61. Yang CH, Lee YM, Cho KY, Base KH and Chung CP. : Effect of Zizyphi Fructus extract on the biological activity of gingival fibroblast. *J. of Kor. Acade. of Periodontol* 24: 144-153, 1994.
62. Uitto J, Olsen DR and Fazio MJ. : Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J. of Invest. Dermatol* 92: 61s-77s, 1989.
63. Phillips CL, Combs SB and Pinnell SR. : Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblast. *J. of Invest. Dermatol* 103: 228-232, 1994.
64. Gilberston BS, Powers EA, Stamp CM, Scott PS, Wallac TL, Copeland J, Petzold G and Mitchell M, Ledbetter S, et al. : The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *CancerChemother. Pharmacol* 36-5: 418-424, 1995.
65. Chung CP, Park JB and Bae KH. : Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its Flavonoids on human gingival fibroblast. *Plant Med.* 61: 150-153, 1995.
66. 高本博天, 植木昭和, 岩田平太郎 : 圖解藥理學, 東京, 中外醫學社, pp.161-163, 1979.