

清熱解毒化瘀湯의 抗血栓 및 抗炎효과에 관한 實驗的 研究

김성란 · 안상우* · 유동열**

대전대학교 한의과대학, *한국한의학회연구원, **교신저자

Abstract

The Experimental Study on Anti-thrombotic and Anti-inflammatory Effect of ChungyeolHaedogHwaeoTang (CHHT)

Kim Sungran, Ahn Sangwoo*, Yoo Dongyoul**

College of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

* Korea Institute of Oriental Medicine

** Corresponding Author

This study was performed to evaluate anti-thrombotic activities and anti-inflammatory effects of ChungyeolHaedogHwaeoTang water extract (CHHT).

The results were summarized as follows.

In experiment of anti-thrombotic effect:

1. CHHT inhibited human platelet aggregation induced by ADP and epinephrine as compared with the control group, and inhibited pulmonary embolism induced by collagen and epinephrine (inhibitory rate is 37.5 %).
2. CHHT increased platelet number significantly, and also CHHT shortened PT and APTT significantly as compared with the control group in thrombus model induced by dextran.

In experiment of anti-inflammatory effect:

3. CHHT inhibited IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 and NOS-II mRNA expression as compared with the control group in a concentration-dependent degree, and inhibited NO production significantly at 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and also inhibited ROS production in a concentration-dependent degree as compared with the control group in RAW 264.7 cell line.

4. CHHT inhibited IL-1 β , IL-6 and TNF- α production significantly in serum of acute inflammation-induced mice, and decreased IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in spleen tissue, and also decreased IL-1 β and IL-6 production in liver tissue, but increased TNF- α production in liver tissue of acute inflammation-induced Balb/c mice.

5. CHHT increased survival rate from the 3rd day in ICR mice with lethal endotoxemia induced by LPS.

These results suggest that CHHT can be useful in treating diverse female diseases caused by thrombosis and inflammation such as menstrual pain, menstrual disorder, leukorrhea, vaginitis, cervicitis, pelvic inflammatory disease and so on.

Keywords: ChungyeollhaedoghwaeoTang (CHHT), anti-thrombotic activities, anti-inflammatory effect

I. 緒 論

清熱解毒化瘀湯¹⁾은 魚腥草, 土茯苓, 忍冬藤, 薏苡仁, 當歸, 赤芍藥, 枳殼, 川芎, 香附子, 連翹, 桃仁, 莪朮, 甘草로 구성된 처방으로, 濕熱과 瘀血로 인해 발생하는 帶下를 치료할 목적으로 立方되었다.

帶下는 出血 이외의 陰 分泌에 적용되는 말로, 正常 분비물의 量이 지나치거나, 生殖 內腔의 어느 부위에 病的인 상황이 진행되어 생기는 異常 滲出物을 의미한다²⁾.

서양의학적으로 帶下는 여성생식기 감염으로 볼 수 있다^{3,4)}. 炎症은 發赤, 發熱, 腫脹, 疼痛, 機能喪失이 대표적인 證狀이라고 할 수 있는데^{5,6)}, 이러한 염증의 일련의 증상은 瘀血의 病態와 유사함을 알 수 있다⁷⁾.

瘀血은 病理學의 概念에서 血栓의 범주에서 다루어진다⁸⁻¹⁰⁾. 血栓症이란 血管이나 心臟 內에서 血液成分인 固形塊가 形成되어 혈관강의 狹窄, 閉塞을 惹起하는 것으로, 이는 瘀血로 인한 증상인

刺痛, 出血, 腫塊 등과 밀접한 相關性을 보여준다^{5,11-13)}.

항혈전 및 항염증 작용에 대한 실험적 연구로 김¹⁴⁻¹⁷⁾ 등의 清熱消毒飲, 秘方奪命散, 少腹逐瘀湯, 加味通經湯등에 항염증 및 항혈전 작용이 있음을 보고하였으나, 清熱解毒化瘀湯의 항혈전 및 항염증 작용에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者는 清熱解毒化瘀湯의 항혈전 작용을 究明하기 위해 ADP와 epinephrine에 의한 혈소판 응집 억제 효과, in vivo에서 폐색전 유발 및 dextran에 의한 혈전증 병태 모형¹⁸⁾을 이용하여 실험을 수행하였다.

또한 항염증 작용을 究明하기 위해서 염증 관련 cytokine의 유전자 발현에 미치는 영향, NO 및 ROS의 생산량에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내, 그리고 비장과 간 조직 내 cytokine 변화에 미치는 영향 등을 알아본 결과, 항혈전작용 및 항염증작용에서 모두 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

물을 충분히 공급하였다.

1. 재료

1) 동물

실험 동물은 ICR계 mouse, SD계 rat, Balb/c계 mouse를 사용하였고, 12시간 소등과 점등 및 22±2 °C 조건의 사육실에서 사육하면서 사료와

2) 약물

실험에 사용된 清熱解毒化痰湯¹⁾의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다(Scheme 1).

Scheme 1. Prescription of ChungyeolHaedogHwaeoTang (CHHT)

韓藥名	生藥名	重量 (g)
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	24
土茯苓	<i>Smilacis Glabrae Rhizoma</i>	24
忍冬藤	<i>Lonicerae Caulis</i>	15
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	15
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	9
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	9
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	9
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	9
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	9
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	9
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	9
莪朮	<i>Zedoariae Rhizoma</i>	9
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
Total		156

2. 방법

1) 시료 추출물 분리

CHHT 2 첩 분량을 증류수 2,000 ml에 3시간 동안 얻은 액을 여과하여 농축하고, 동결 건조하여 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 혈소판 응집 (Platelet aggregation) 측정

3.8% sodium citrate 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣고 원심분리하여 상등액으로부터 PRP를 얻고 잔액을 다시 원심분리하

여 PPP를 얻었다.

약물의 항혈소판 응집 효과는 platelet aggregation profiler Model PAP-4를 사용하였으며, 최종 농도는 ADP 6 μM과 epinephrine 5 μM이 되도록 하였다. Micro magnetic bar를 넣은 silicon treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation 시킨 PRP 320 μl와 CHHT를 40 μl를 넣고 다시 incubation한 후 ADP 40 μl를 가하여 5 분간 반응시켰다.

약물에 의해 aggregation이 억제되는 정도를 다음 식에 의거하여 transmission maximum reduction percent를 산출하였다.

$$\text{Inhibition\%} = \frac{A-B}{A} \times 100 \text{ 단, } A = \text{대조군}$$

의 최대응집률%, B=실험군의 최대응집율%

3) 폐색전(Pulmonary thrombosis) 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura의 실험 방법¹⁹⁾에 준하여 실시하였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집 시약을 HBSS 200 μ l에 함유되도록 조제하였고, 미정맥에 주사하였다.

혈소판 응집 유발 시약의 정맥 주사 2시간 전에 CHHT를 ICR계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 1 mg/kg을 경구 투여하였다.

항혈전 효과는 혈소판 응집 시약의 투여로 발생하는 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였다.

4) Dextran 어혈 병태 유발 실험

(1) 어혈 병태 유발 및 약물 투여

백서 8마리를 1군으로 하여 정상군은 생리식염수를 공급하고, 대조군은 생리식염수를 투여한 지 1시간 후에 dextran 어혈 병태를 유발하였으며, CHHT 투여군은 CHHT를 실험 하루 전에 1회 경구 투여한 후 절식시키고, 실험하기 1시간 전에 다시 1회 경구 투여한 다음 대조군과 동일한 방법으로 dextran 어혈 병태를 유발하였다.

(2) 혈소판수, Prothrombin time(PT), Activated Partial Thromboplastin time(APTT), Fibrinogen 측정 혈소판수는 자동혈구계산기, Minos-ST를 사용하여 측정하였고, PT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였고, APTT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

5) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양

정상 Balb/c계 mouse의 폐조직(1g)을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거한 후, cool D-PBS로 3회 세척하여 conical tube (15 ml)에 넣고 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM을 넣고 37°C CO₂배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하여 연속 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

6) Quantitative real-time-PCR on RAW 264.7 cell line

(1) RAW 264.7 세포배양

Murine macrophage cell line RAW 264.7 세포주는 10% FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하는 작업을 3회 반복하여 살아있는 부착 세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

(2) 정량적 중합효소 연쇄반응

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다.

7) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포주에 CHHT(100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리하고, 1시간 후 LPS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A와 용액 B를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상등액 100 μl 를 96well plate에 분주하고 혼합 용액 100 μl 를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 세포 내 reactive oxygen species (ROS)의 분석

RAW 264.7 세포에 CHHT(100 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 후, 1 시간 후 다시 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 세포내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

9) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) 혈청 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량 측정
CHHT 투여군은 20g Balb/c계 mouse 1마리 당 검액 7.13 mg을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 7일후 LPS를 1 mg/kg을 복강에 주사한 다음, 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성량을 ELISA로 측정하였다.

(2) 간과 비장조직에서의 정량적 중합효소 연쇄반응

LPS로 유도된 실험 생쥐의 비장 및 간조직(0.1 g)과 RNAzoIB 500 μl 를 넣고 용해될 때까지 분

쇄하고, 이를 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 여기에 RNAzoIB 500 μl 를 넣고 용해될 때까지 혼합하였으며, 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl 를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 추출한 RNA는 diethyl phenyl carbonate (DEPC)를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 생명 연장율 측정

ICR계 mouse를 이용하여 실험군은 CHHT를, 대조군은 normal saline을 7일간 경구투여 한 후, LPS 3 mg/kg을 복강에 주사하고 5 일간 생쥐의 생존율을 관찰하여 생명 연장 곡선을 만들었다. 단, 실험군은 LPS 주입 1시간 전에 CHHT를 1 회 추가로 경구투여 하였다.

10) 통계처리

실험 결과는 mean \pm Standard Error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

III. 실험 성적

1. 항혈전 효과

1) 혈소판 응집(Platelet Aggregation) 억제 효과

(1) ADP에 의한 혈소판 응집 억제 효과

CHHT 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 및 0.15

mg/ml 농도에서 ADP(6 μM)에 의해서 유도된 혈소판 응집 억제율은 각각 100, 100, 100, 96.8, 88.15, 37.5, 12.4 및 50.4%로 나타났다.

(2) Epinephrine에 의한 혈소판 응집 억제 효과

CHHT 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 및 0.15 mg/ml 농도에서 epinephrine(5 μM)에 의해서 유도된 혈소판 응집 억제율은 100, 100, 100, 100, 76.4, 55.2, 9.7 및 2.4%로 나타났다.

(3) ADP와 epinephrine에 대한 Emax, EC50 및 γ값

응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 Emax는 100.32 %로 나타났고, EC50은 0.68 mg/ml로 나타났다. Epinephrine의 경우는 Emax가 100.07%,

EC50은 0.61 mg/ml로 나타났다. Sigmoidal Emax model에서 곡선의 sigmoidicity를 나타내는 γ은 ADP와 epinephrine이 각각 2.95와 2.40으로 나타났다.

2) 폐색전(Pulmonary embolism) 억제 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분 이상 마비가 지속이 되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8 마리중 3 마리만이 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되었다. 이에 반하여 CHHT 투여군은 8 마리중 5 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 대조군에 비해 37.5%의 억제 효과를 나타냈다(Table 1).

Table 1. Effect of CHHT on Pulmonary Embolism Mice

	Dose (mg/20 g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control	-	8/8	0
Aspirin	2	3/8	62.5
CHHT	7.13	5/8	37.5

Control : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group.

Aspirin : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group after oral administration of 100 mg/kg of aspirin.

CHHT : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group after oral administration of 7.13 mg/20 g of CHHT extract.

3) Dextran 어혈 병태에 미치는 영향

혈소판수 변화에서는 정상군이 658.7 ± 18.5 (×103/mm³)인데 비하여, 대조군이 508 ± 15.9 (×103/mm³), CHHT 투여군이 594.2 ± 22.6 (×103/mm³)로 대조군에 비하여 유의성(P<0.01) 있게 증가하였다(Table 2).

Prothrombin time은 정상군이 19.8 ± 1.51

초인데 비하여, 대조군은 28.4 ± 2.1 초, CHHT 투여군은 22.4 ± 1.04 초로 대조군에 비하여 유의성(P<0.01) 있게 단축되었다(Table 2).

APTT는 정상군이 38.5 ± 2.4 초, 대조군이 52.7 ± 1.58 초, CHHT 투여군이 41.8 ± 3.7 초로 대조군에 비하여 유의성(P<0.01) 있게 단축되었다(Table 2).

Table 2. Effect of CHHT on Platelet, Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Platelet($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Prothrombin time (sec)	APTT(sec)
Normal	8	658.7 \pm 18.5 ^{a)}	19.8 \pm 1.51 ^{a)}	38.5 \pm 2.4 ^{a)}
Control	8	508 \pm 15.9 ⁺⁺⁺	28.4 \pm 2.1 ⁺⁺	52.7 \pm 1.58 ⁺⁺⁺
CHHT	8	594.2 \pm 22.6 ^{**}	22.4 \pm 1.04 ^{**}	41.8 \pm 3.7 ^{**}

Normal : oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

CHHT : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 71.3 mg/200 g of CHHT extract.

a) : Mean \pm Standard Error

+: Statistically significant value compared with normal data(+:P<0.05, ++: P<0.01, +++:P<0.001)

: Statistically significant value compared with control data(: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001)

2. 항염증 효과

1) 염증 관련 cytokine에 미치는 영향

(1) IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.125, 대조군이 1.00로 나타났으며, CHHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서는 각각 0.477, 0.545, 0.78로 나타나, 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-A).

(2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.121, 대조군이 1.00로 나타났으며, CHHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군이 각각 0.278, 0.601, 0.698로 나타나, 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다 (Fig. 1-B).

(3) TNF- α 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현

의 RQ 값은, 정상군이 0.041, 대조군이 1.00로 나타났으며, CHHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서는 각각 0.799, 0.989, 1.045로 대조군에 비해 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-C).

(4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군 값이 0.242, 대조군이 1.00로 나타났으며, CHHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 각각 0.387, 0.464, 0.759로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-D).

(5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.048, 대조군이 1.00로 나타났으며, CHHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군이 각각 0.547, 0.589, 0.948로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-E).

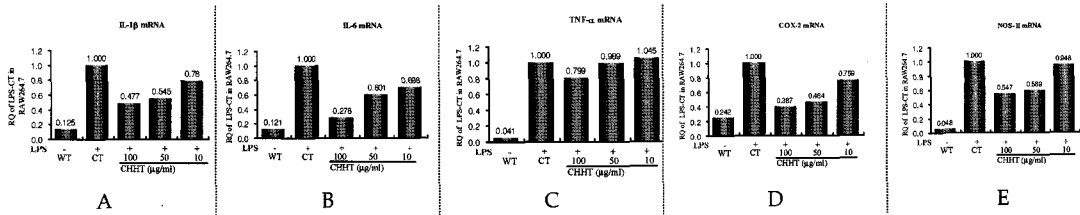


Fig. 1. Inhibitory effects of CHHT extract on cytokine mRNA expression in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of CHHT extract (100, 50 and 10 μg/ml) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 μg/ml) for 6 hr. IL-1β mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1β mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration

2) Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 NO 생성량은, 정상군의 OD 값이 0.054 ± 0.012, 대조군이 1.458 ± 0.236로 나타났으며, CHHT 100, 50 및 10 μg/ml 농도 처리군이 각각 0.667 ± 0.201, 0.721 ± 0.141, 1.245 ± 0.112로 나타나 대조군에 비하여 100, 50 μg/ml의 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다.

3) 세포내 reactive oxygen species(ROS) 생성량에 미치는 영향

ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, CHHT 투여군(100 μg/ml C, 50 μg/ml D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 2).

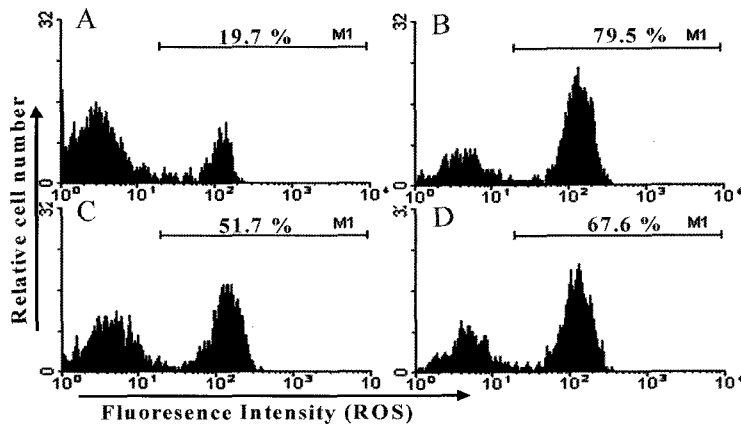


Fig. 2. Inhibitory effect of CHHT extract on the ROS production in RAW 264.7 cell line.

RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of CHHT extract (C: 100 μg/ml, D: 50 μg/ml) in the presence (control, B) or absence (A) of LPS, (2 μg/ml) for 48 hr. After culture, cells were treated with DCFH-DA reagent (50 mM), harvested, and assayed for ROS positive cells (M1) by flow cytometry.

4) 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokine 변화에 미치는 영향

(1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.3 ± 0.7 ng/ml, 대조군은 57.4 ± 5.2 ng/ml로 나타난 반면, CHHT 투여군에서는 44.2 ± 3.2 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 감소하였다(Fig. 3-A).

(2) IL-6 생성량에 미치는 영향

급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-6 생성

량을 측정한 결과, 정상군은 3.7 ± 1.4 ng/ml, 대조군은 326.4 ± 27.4 ng/ml로 나타난 반면, CHHT 투여군에서는 211.3 ± 17.6 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다(Fig. 3-B).

(3) TNF-α 생성량에 미치는 영향 급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.1 ± 0.6 ng/ml, 대조군은 77.8 ± 4.7 ng/ml로 나타난 반면, CHHT 투여군에서는 62 ± 6.2 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 감소하였다(Fig. 3-C).

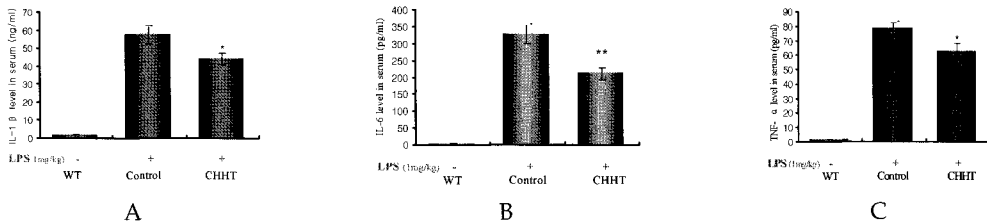


Fig. 3. The effect of CHHT extract on cytokine production in sera following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with CHHT extract (7.13 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Total IL-1β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. The data are expressed as the mean ± SE.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+: P<0.05, ++: P<0.01, +++: P<0.001)

* : Statistically significant value compared with control data (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

5) 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간조직 내 cytokine 변화에 미치는 영향

(1) IL-1β mRNA 발현량에 미치는 영향

비장 조직에서 IL-1β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.012, 대조군이 1.000로 나타난 반면, CHHT 투여군은 0.721로 대조군에 비하여 감소하였다. 간 조직에서는 정상군이 0.021, 대조군이 1.000로 나타난 반면, CHHT 투여군은 0.898로

역시 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 4-A).

(2) IL-6 mRNA 발현량에 미치는 영향

비장 조직에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.175, 대조군이 1.000로 나타난 반면, CHHT 투여군은 0.687로 대조군에 비하여 감소하였다. 간 조직에서는 정상군이 0.214, 대조군이 1.000로 나타난 반면, CHHT 투여군은 0.986로 대조군과 별 차이가 없었다(Fig. 4-B).

(3) TNF- α mRNA 발현량에 미치는 영향
 비장 조직에서 TNF- α 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.078, 대조군이 1.000로 나타난 반면, CHHT 투여군은 0.792로 대조군에 비하여

감소하였다. 간 조직에서는 정상군이 0.112, 대조군이 1.000로 나타난 반면, CHHT 투여군은 1.072로 대조군에 비하여 증가 하였다(Fig. 4-C).

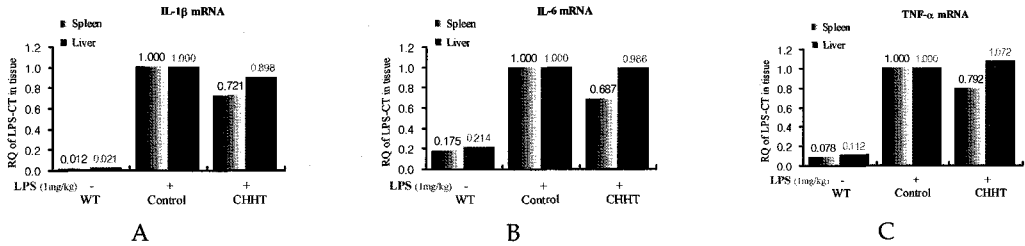


Fig. 4. Inhibitory effects of CHHT extract on cytokine mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with CHHT extract(7.13 mg/20 g) and LPS(1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-1 β mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration.

6) LPS로 유도된 lethal endotoxemia에 대한 생명 연장 효과

일간 생명연장을 관찰한 결과, CHHT 투여군은 LPS 투여 후 3일째부터 대조군에 비하여 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

생쥐의 복강에 LPS 3 mg/kg을 주사하여 5

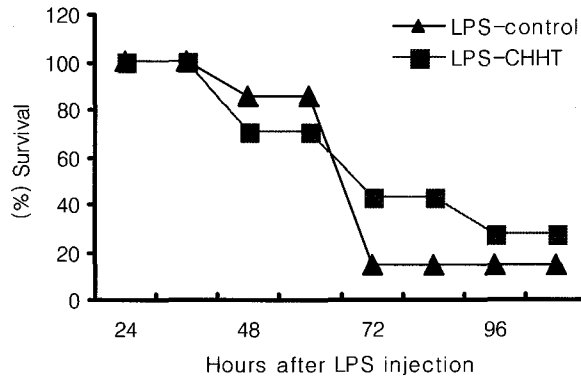


Fig. 5. CHHT protects mice from LPS-induced lethality.

Groups of 7 ICR mice were injected i.v. with 100 μ g of LPS(3 mg/kg) after oral administration of normal saline(control) or CHHT(7.13 mg/20 g) for 7 days. Another group of mice received 100 μ g of LPS together with CHHT(7.13 mg/20 g) to serve as a positive control for 100 % protection from LPS-induced lethality. Survival was monitored over the next 5 days. Similar results were obtained in five identical independent experiments. The survival curves from all five experiments were analyzed by the Kaplan-Meier method.

IV. 考 察

女性生殖器炎症疾患의 가장 큰 영역인 帶下는 출혈 이외의 腔 분비에 적용되는 말로, 正常 분비물의 양이 지나치거나, 生殖 內腔의 어느 부위에 病的인 상황이 진행되어 생기는 異常 滲出物을 의미한다²⁾.

帶下の 원인에 대하여, 여러 가지가 있지만, 종합하면 風冷, 寒濕, 濕熱, 瘀血, 癥瘕, 濕痰, 食毒, 七情, 肝鬱風濕, 脾虛濕勝, 肝腎兩虛, 肝鬱濕熱, 腎虛火旺, 肝脾氣鬱, 心經有熱, 氣血虛寒 등으로 구분할 수 있다.

이에 따라 帶下の 치료는 逐寒溫經, 清熱除濕, 散寒溫中收澁, 疏肝開鬱燥濕, 活血化瘀, 補脾胃, 升陽氣, 補任脈, 瀉火利水 등의 치법이 應用되고 있다^{2,20,26)}.

서양의학적으로 대하는 여성생식기 감염으로 볼 수 있으며 외음염, 질염, 경관염, 골반 염증성 질환, 성 전파성질환 등이 대하의 범주에 속한다^{2,3,4)}.

이러한 염증반응은 생체 조직이 생물학적, 물리적, 화학적, 면역학적인 원인에 의하여 손상을 받았을 때, 이 손상을 국소화시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 고도로 발달된 자기방어체계인 면역과정의 일부분이다. 염증의 증상은 세균감염 부위에 혈관이 확장되어 발적과 발열을 유발하며 모세혈관의 투과성이 증가되어 조직으로 체액과 세포들이 나와 삼출액이 축적되어 부종을 유발하게 된다^{5,6,27)}.

부인은 남자와 달리 자궁이라는 奇恒之腑를 갖고 있으며, 이로 인하여 월경, 임신, 출산 및 이에 따른 고유한 생리적 특징을 갖는다. 따라서 부인의 생리, 병리는 血을 위주로 하게 되며, 婦人病證의 대강을 이루고 있는 월경, 임신, 출산과 관련된 질병 및, 대하 등의 부인잡병에서 瘀血은 병인으로서 중요한 위치를 차지하게 된다^{2,20)}.

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 凝聚하여 형성된 일종의 병리적 산물인 동시에 발병인자가 되는 것으로, 괴사된 혈액인 惡血, 경맥관내나 기관내에 瘀積된 畜血 및 혈액순환장애와 혈액 속도감소의 병리상태를 포괄한다고 보고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

현재까지의 어혈에 관한 한의학적 연구를 살펴보면, 어혈의 개념과 혈전의 개념이 유사하다는 점을 이용하여, 血滯라는 순환 장애의 병리를 기반으로 하는 어혈증과, 혈행 장애의 병리를 특징으로 하는 혈전증에 대한 동서비교의학적 연구를 기반으로 하고 있다¹⁸⁾.

혈전은 생체내의 혈관내에서 응고된 혈액의 덩어리를 말하는 것으로, 크기와 발생부위에 따라 다양한 증상을 나타내고 혈전으로 인한 혈관폐쇄의 정도, 범위 및 기간에 따라 조직의 손상 정도가 결정된다⁷⁾.

혈전은 혈액순환장애, 혈액 성분의 변화 및 결체 조직의 증식 변성으로 인식되어지는 어혈과 병리 및 증상이 상호 유사하여, 어혈이 부인과영역에서 매우 높은 중요성을 차지하고 있는 만큼 상당수의 부인과 어혈처방들의 항혈전 효과에 대한 실험적 연구가 진행되어, 이미 通經四物湯, 歸朮破癥湯, 生化湯, 少腹逐瘀湯 등²⁸⁻³⁴⁾이 혈전증 병태모형에 대해 유의한 효과가 있음이 보고된 바 있다.

清熱解毒化瘀湯은 魚腥草, 土茯苓, 忍冬藤, 薏苡仁, 當歸, 赤芍藥, 枳殼, 川芎, 香附子, 連翹, 桃仁, 莪朮, 甘草로 구성되어 있는데, 각각 구성 약물의 효능을 살펴보면 魚腥草는 清熱解毒 消癰排膿 利尿通淋, 土茯苓은 除濕 解毒 通利關節, 忍冬藤은 清熱解毒 疏風通絡, 薏苡仁은 健脾滲濕 除痺止瀉 清熱排膿, 當歸는 補血和血 調經止痛, 赤芍藥은 清熱涼血 散瘀止痛, 枳殼은 破氣 行痰 消積, 川芎은 活血行氣 祛風止痛, 香附子는 理氣解鬱 止

痛調經, 連翹는 清熱解毒 消腫散結, 桃仁은 活血祛瘀 潤腸通便, 莪朮은 行氣破血 消積止痛, 甘草는 和中緩急, 解毒, 調和諸藥하는 효능을 가지고 있다^{35,36}.

이상으로 보아 清熱解毒化瘀湯은 清熱利濕하고 消癰排膿, 活血化瘀하는 효능이 있어, 濕熱과 瘀血로 인한 여성 생식기 염증질환에 광범위하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 清熱解毒化瘀湯의 抗血栓作用과 抗炎作用을 究明하고자 실험에 착수하였다.

ADP(6 μ M)와 epinephrine(5 μ M)에 의해서 각각 유도된 혈소판 응집의 CHHT 억제력은 다음과 같다. CHHT 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 및 0.15 mg/ml의 농도에서 ADP(6 μ M)에 의해서 유도된 혈소판 응집 억제율은 각각 100, 100, 100, 96.8, 88.15, 37.5, 12.4 및 5.4 %로 나타났고, epinephrine(5 μ M)에 의해 유도된 혈소판 응집 억제율은 CHHT 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 및 0.15 mg/ml의 농도에서 100, 100, 100, 100, 76.4, 55.2, 9.7 및 2.4 %로 나타났다.

응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 Emax는 100.32 %로 나타났고, EC50은 0.68 mg/ml로 나타났다. Epinephrine의 경우는 Emax가 100.07 %, EC50은 0.61 mg/ml로 나타났다. Sigmoide Emax model에서 곡선의 sigmoidicity를 나타내는 γ 은 ADP와 epinephrine이 각각 2.95와 2.40으로 epinephrine의 sigmoidicity가 약간 작게 나타났다.

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전(Pulmonary embolism) 실험에서 대조군은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8 마리 중 3 마리만이 죽거나 15 분 이상 마비가 지속 되었다. 이에 반하여 CHHT 투여군은 8 마

리 중 5 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 37.5 %의 억제 효과를 나타냈다(Table 1).

Dextran을 이용해 瘀血을 유발시킨 후 CHHT extract를 투여하여 혈소판수, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT)를 측정하였다.

본 연구의 혈소판 수 변화에서는 정상군이 $658.7 \pm 18.5(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 인데 비하여, 대조군이 $508 \pm 15.9(\times 10^3/\text{mm}^3)$, CHHT 투여군은 $594.2 \pm 22.6(\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 증가하였다(Table 2).

Prothrombin time에 미치는 효과에서는 정상군이 $19.8 \pm 1.51(\text{sec})$ 인데 비하여, 대조군이 $28.4 \pm 2.1(\text{sec})$, CHHT 투여군은 $22.4 \pm 1.04(\text{sec})$ 로 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 단축되었다(Table 2).

APTT에 미치는 효과에서는 정상군이 $38.5 \pm 2.4(\text{sec})$ 인데 비하여, 대조군이 $52.7 \pm 1.58(\text{sec})$, CHHT 투여군은 $41.8 \pm 3.7(\text{sec})$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 단축되었다(Table 2).

본 연구에서 CHHT 투여군의 platelets 수치 함량이 대조군에 비해 증가된 것은, CHHT가 직접 혹은 간접적으로 응고계의 활성을 억제시키거나 또는 항응고 인자의 활성을 유도하여 platelet 및 fibrinogen의 소비를 억제시킨 결과라고 추정할 수 있다.

염증의 화학적 매개체(Chemical mediators)는 그 자신이 염증의 원인이 되는 것이 아니고 염증의 여러 가지 현상들 사이에 개재하여 염증반응을 증대하는 물질이다. 화학적 매개체로는 혈관활성 아민류, 혈장단백 분해효소, 아라키돈산 대사물(prostaglandin, leukotriene), 산소유래유리기(Oxygen-derived free radical), 혈소판활성인자, 산화질소(NO), cytokine 등이 있다^{5,6}).

CHHT의 항염증 효과에 대한 연구에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, IL-1 β 와 IL-6의 유전자 발현을 CHHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 각각 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였으며, TNF- α 의 유전자 발현을 CHHT 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 대조군에 비해 억제하였다(Fig. 1).

CHHT의 RAW 264.7 세포주에서 COX-2와 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향에서는 CHHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 각각 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1).

RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide(NO) 생성량은 CHHT 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였고(Fig. 2), 세포 내 reactive oxygen species(ROS) 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, CHHT 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 2).

급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokine 변화에 미치는 영향에서, 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 측정된 결과, CHHT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게($p<0.01$) 감소하였다(Fig. 3).

급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간 조직 내 cytokine 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해, 비장 조직에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 측정된 결과, 정상군의 RQ 값이 각각 0.012, 0.175, 0.078이었고, 대조군은 모두 1.000으로 나타난 반면, CHHT 투여군은 각각 0.721, 0.687, 0.792로 RQ 값이 감소하였다. 간 조직에서는 정상군의 RQ 값이 각각 0.021, 0.214, 0.112이었고, 대조군은 모두 1.000으로 나타난 반

면, CHHT 투여군은 각각 0.898, 0.986, 1.072로 IL-1 β , IL-6의 생성량은 감소하였으나 TNF- α 의 생성량은 증가하였다(Fig. 4).

LPS 3 mg/kg을 ICR계 mouse의 복강에 주사하여 lethal endotoxemia를 유도한 후 CHHT의 생명연장 효과를 5일간 관찰한 결과, 대조군에 비해 CHHT 투여군은 LPS 투여 3일째부터 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

이상의 실험적 연구 결과를 종합해 볼 때, 淸熱解毒化癍湯은 抗血栓 및 抗炎症 효과가 인정되므로, 癍血과 濕熱로 인해 발생하는 여성 生殖器의 癍血症과 炎症疾患에 유효하게 應用될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

淸熱解毒化癍湯(CHHT)의 抗血栓作用을 실험적으로 究明하기 위하여 血小板 凝集 억제 효과와 血栓誘發에 따른 혈류속도를 측정하고, in vivo에서 肺塞栓 誘發 및 dextran에 의한 혈전증 병태 모형을 이용하여 실험을 수행하였고, 抗炎症作用을 究明하기 위하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, NOS-II의 유전자 발현과 NO 및 ROS의 생산량에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청, 그리고 비장 및 간 조직 내 cytokines 변화에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 淸熱解毒化癍湯은 ADP와 epinephrine에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하였으며, collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 37.5% 억제했다.
2. 淸熱解毒化癍湯은 dextran 어혈 병태를 유발한 흰쥐의 혈소판수를 대조군에 비하여 유의성($P<0.01$) 있게 증가시켰으며, PT 및 APTT

를 대조군에 비하여 유의성($P < 0.001$, $P < 0.01$) 있게 단축시켰다.

3. 清熱解毒化瘀湯은 RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, 및 NOS-II의 유전자 발현을 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였으며, NO 생성량을 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 유의성($P < 0.01$, $P < 0.05$) 있게 억제하였고, ROS 생성량을 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다.
4. 清熱解毒化瘀湯은 급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 유의성 있게($p < 0.01$) 억제하였으며, 비장 조직에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 모두 감소시켰고, 간 조직에서 IL-1 β 및 IL-6의

생성량을 감소시켰으나 TNF- α 의 생성량은 증가시켰다.

5. 清熱解毒化瘀湯은 LPS 투여 후 3일째부터 대조군에 비하여 생쥐의 생존율을 증가시켰다.

이상의 실험 결과로 보아 清熱解毒化瘀湯은 抗血栓 및 抗炎症 효과가 인정되므로, 瘀血과 濕熱로 인해 발생하는 月經痛, 月經障礙, 帶下, 陰炎, 子宮 頸部炎, 骨盤炎 등 여성 生殖器의 瘀血症과 炎症疾患에 有效하게 應用될 수 있을 것으로 사료된다.

검색어 : 청염화어해독탕, 항혈전 작용, 항염효과

참 고 문 헌

1. 周鳳梧. 『實用中醫婦科學』. 山東:山東科技出版社. 1985: 345.
2. 한의부인과학 편찬위원회. 『한의부인과학(상)』. 서울:도서출판 정담. 2001:48,61,256-265,48.
3. 이경혜 외. 『여성건강간호학(하)』. 서울:현문사. 1977: 1333-1365.
4. 대한산부인과학회. 『부인과학』. 서울:칼빈서적. 1977: 256-283.
5. 대한병리학회. 『병리학 II』. 서울:高文社. 1995: 71-104, 112-120, 540-542.
6. 송계용 외. 『핵심 병리학』. 서울:고려의학. 1998: 62-94.
7. 전국한의과대학 병리학 교실 編. 『동의병리학』. 서울:一中社. 1999:152-165, 272-274, 424-426.
8. 金聖勳 외. 『東醫病理學』. 大田:도서출판 한림원. 1994:348-356.
9. 이증달. 『그림으로 보는 병리학』. 서울:고려의학. 1990:127-134.
10. 吉利和. 『內科診斷學』. 서울:第一醫學士. 1994:6-8.
11. 金琦顯, 嚴賢燮. 「實驗的 研究의 方向모색을 위한 考察(I)」. 『동의병리 학회지』. 1990;5(1):17-30.
12. 松岡建平(생활의학연구회 편역). 『성인병의 예방과 치료』. 서울:일월서각. 1987:133-134, 137-138, 154-155, 184-185.
13. Krupp M. A. and Chatton M. J. 『Current Medical Diagnosis and Treatment』, California Lange Medical Pub. 1978:266.
14. 김호민. 「清熱消毒飲이 실험적 염증 및 혈전에 미치는 영향」. 『동의병리학회지』. 1995;10:267-293.
15. 홍지우 등. 「秘方奪命散의 항염증효과 및 항응고작용에 대한 연구」. 『대한동의병리학회지』. 1998: 12(2).
16. 李相洙 외. 「少腹逐瘀湯이 항혈전 및 소염, 진통에 미치는 영향」. 『대한한방부인과학회지』. 1996;9(1): 81-96.
17. 이혜경. 「加味通經湯의 항혈전, 소염 및 진통작용에 대한 연구」. 『대한 한방부인과학회지』. 2003: 16(1) : 118-135.
18. 安圭錫, 朴種鉉, 朴耕模. 「瘀血病態모형 개발에 관한 연구」. 『대한동의병리학회지』. 1999:25-34.
19. Kimura, Y., Tani, T., and Watanabe, K. 『Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis.』. Arzneim. Forsch. /Drug Res. 35(II). 1985:1144-1149.
20. 宋炳基. 『韓方婦人科學』. 서울:행림출판. 1995: 230-239.
21. 巢元方. 『諸病源候論』. 북경:人民衛生出版社. 1982: 1059.

22. 肅 熏. 『女科經綸』. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1986: 290-308.
23. 周鴻範. 『白話中國秘方全書』. 臺北市:好兄弟出版社. 1983:296-299.
24. 葉 桂. 『葉天士女科』. 서울:大星文化社. 1989: 225-227.
25. 陳自明. 『婦人良方大全帶下論 第16』. 臺北:文光圖書有限公司. 1983:30-31.
26. 唐宗海. 『血證論』. 서울:一中社. 1992:107.
27. Stanley L. Robbins et al. 『Pathologic basis of disease』. 5th ed, philadelphia, Saunders. 1994: 99-114, 117-121, 318-319, 623-626.
28. 吳明澤, 嚴賢燮. 「通經四物湯이 endotoxin으로 유발된 흰쥐의 혈전증에 미치는 영향」. 『대한동의병리학회지』. 1997;11(1):77-81.
29. 李宰星, 嚴賢燮. 「歸朮破癥湯이 endotoxin으로 유발된 흰쥐의 혈전증에 미치는 영향」. 『대한동의병리학회지』. 1996;10(1):41-45.
30. 金正會 외. 「生化湯 및 加味生化湯이 endotoxin으로 유발된 백서의 혈전증에 미치는 영향」. 『대한한의학회지』. 1994;14(2):229-244.
31. 鄭學洙, 金亨俊, 徐一福. 「흰쥐에서 endotoxin으로 유발된 과중성 혈관내 응고증에 대한 도인탕의 항혈전 효과」. 『대한한방부인과학회지』. 2001;14(1): 133-145.
32. 김광겸. 『和血通經散의 抗炎, 抗血栓 및 鎮痛效果에 對한 研究』. 圓光大學校 大學院. 1996.
33. 윤현자. 『芎歸湯加味方의 抗血栓效果에 關한 研究』. 圓光大學校大學院. 1996.
34. 孫泰熏. 『加味生化湯의 抗血栓 및 鎮痛效果에 對한 研究』. 大田大學校大學院. 2001.
35. 李尙仁. 『本草學』, 서울:修書院. 1981:58, 101, 279, 287, 354, 369, 407, 430, 456, 466, 514.
36. 安德均. 『韓國本草圖鑑』. 서울:교학사. 1999: 108-110.